



Péptidos miméticos con capacidad de atravesar barreras biológicas

Ximena Carolina Pulido Villamil

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
Programa de Doctorado en Biomedicina
Facultad de Farmacia

**PÉPTIDOS MIMÉTICOS CON CAPACIDAD DE ATRAVESAR
BARRERAS BIOLÓGICAS**

Ximena Carolina Pulido Villamil

Barcelona, 2014





Programa de Doctorado en Biomedicina

PÉPTIDOS MIMÉTICOS CON CAPACIDAD DE ATRAVESAR BARRERAS BIOLÓGICAS

Memoria presentada por **Ximena Carolina Pulido Villamil**
para optar al grado de Doctor en Biomedicina por la Universidad de Barcelona

Tesis doctoral realizada en el Parque Científico (PCB), Universidad de Barcelona

Ximena C. Pulido Villamil
Doctorando

Director/Tutor

Dr. Fernando Albericio
Catedrático
Dpto. Química Orgánica
Facultad de Química
Universidad de Barcelona

Director

Dra. Miriam Royo
Investigadora Principal
Unidad de Química Combinatoria
Parque Científico de Barcelona

Barcelona, 2014

ABREVIATURAS

	soporte polimérico
λ	longitud de onda
AA	aminoácido
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ACH	ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
ACN	acetonitrilo
ACQ	6-aminoquinolil- <i>N</i> -hidroxisuccinimidil carbamato
Alloc	aliloxicarbonilo
AMPs	péptidos catiónicos antibacterianos naturales
ATP	adenosina trifosfato
BHE	barrera hematoencefálica
BBMEC	<i>bovine brain microvessel endothelial cell</i>
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
Boc ₂ O	bicarbonato de di- <i>tert</i> -butilo
BODIPY	borodipirrometeno
CF	carboxifluoresceína
CPPs	<i>cell penetrating peptides</i>
DCM	diclorometano
Doxo	doxorubicina
DPCDI	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DIEA	<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
ECVAM	<i>European centre for the validation of alternative methods</i>
EMCa	endocitosis mediada por caveola

EMCI	endocitosis mediada por clatrina
eq	equivalente
Et ₂ O	dietiléter
FACS	<i>fluorescence -assisted cell sorting</i> , clasificación de células asistida por fluorescencia
FITC	fluoresceína
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonilo
Fmoc-(2S, 4S)-Abpc	ácido (2S,4S)-4-Fmoc-amino-1-Boc-pirrolidina-2-carboxílico
GP	glía perineural
GPI	glicosil fosfatidil inositol
GPCR	<i>G protein-coupled receptors</i> , receptores que se acoplan a la proteína G
HF	ácido fluorhídrico
HTS	<i>high throughput screening</i> , cribado de alto rendimiento
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
Hz	hertz
IAM	<i>immobilized artificial membrane</i> , membrana artificial inmovilizada
IDRI	infectious disease research Institute
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDLR	<i>low density Lipoprotein Receptor</i>
LPG	lipofosfoglicanos
LRP1/ LRP2	<i>low-density lipoprotein related proteins 1 and 2 receptors</i> , receptores de las proteínas 1 y 2 relacionadas con la lipoproteína de baja densidad
m/z	relación masa/carga
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionization/time of flight
MBHA	<i>p</i> -metilbenzhdrilamina
min	minuto
M1/M2	coeficiente de Manders
MRR	membrane repair response

MRP	<i>multidrug resistance-associated protein family</i>
MS (ES ⁺)	espectrometría de masas por electroespray
MTBE	<i>terc</i> -butil-metil-éter
MT	miltefosina
MTT	metiltiazoltetrazolio
Npys	3-nitro-2-piridina-sulfenilo
OAT	<i>organic anion transporter</i>
OATP	<i>organic anion-transporting polypeptide</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PAMPA	<i>parallel artificial membrane permeability assay</i> , ensayo de permeabilidad en membranas artificiales paralelas
PBS	tampón fosfato salino
P-gp	glicoproteína P-1
ppm	partes por millón
RP-HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa
Rho 123	rodamina 123
SCL	<i>solute carrier</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i> , ARN pequeño de interferencia
SCL	secuencia de localización celular
SMCC	éster 4-(<i>N</i> -Maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de <i>N</i> -hidroxisuccinimida)
SNC	sistema nervioso central
SPG	glía subperineural
SJ	<i>septate junctions</i> , uniones septadas
Tamb.	temperatura ambiente
TFA	ácido trifluoroacético
TfR	receptores de transferrina
TIS	triisopropilsilano

TJ	<i>tight junction</i> , uniones estrechas
TR-Dextrano	texas rojo dextrano
t_R	tiempo de retención
UV	ultravioleta
v/v	volumen/volumen
ZO	<i>zonula occludens</i>

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
<i>1.1 Péptidos con capacidad de atravesar la membrana celular (CPPs).</i>	<i>3</i>
<i>1.2 Péptidos con capacidad de atravesar la membrana celular (CPPs) en estudios clínicos.</i>	<i>6</i>
<i>1.3 Clasificación de los CPPs.....</i>	<i>7</i>
<i>1.3.1 CPPs catiónicos.....</i>	<i>7</i>
<i>1.3.2 CPPs hidrofóbicos.....</i>	<i>7</i>
<i>1.3.3 CPPs anfipáticos.....</i>	<i>8</i>
<i>1.3.3.1 Péptidos ricos en prolina como atractiva familia de CPPs anfipáticos.</i>	<i>8</i>
<i>i) CPPs lineales ricos en prolina compuestos por aminoácidos naturales.</i>	<i>10</i>
<i>ii) CPPs lineales miméticos de prolina: γpéptidos.....</i>	<i>10</i>
OBJETIVOS.....	13
METODOLOGÍA.....	17
<i>1.1 Disolventes y reactivos.....</i>	<i>19</i>
<i>1.2 Equipos.....</i>	<i>20</i>
<i>1.3 Síntesis de péptidos en fase sólida.....</i>	<i>20</i>
<i>1.3.1 Síntesis de γpéptidos (estrategia Fmoc/Boc).....</i>	<i>22</i>
<i>1.3.2 Síntesis de péptidos en fase sólida (estrategia Fmoc/tBu).....</i>	<i>24</i>
<i>1.3.3 Conjugación de los péptidos a la sonda fluorescente.....</i>	<i>25</i>
<i>1.3.4 Escisión de los péptidos de la resina MBHA.....</i>	<i>25</i>
<i>1.3.5 Escisión de los péptidos de la resina Rink amida MBHA.....</i>	<i>25</i>
<i>1.3.6 Ensayos cualitativos utilizados en síntesis en fase sólida.....</i>	<i>25</i>

1.3.6.1 Ensayo cualitativo de Kaiser (Ensayo de ninhidrina).....	25
1.3.6.2 Ensayo cualitativo de cloranilo.	26
1.3.7 Purificación de los péptidos.....	26
1.3.8 Caracterización de los péptidos.	26
1.3.8.1 HPLC-MS Analítico.....	26
1.3.8.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	27
1.3.8.4 Caracterización de γ Péptidos.	27
1.3.8.5 Caracterización de péptidos naturales.....	28
1.3.9 Síntesis de conjugados.....	29
1.3.9.1 Conjugado Doxo-Gp-11.	29
Síntesis de Ac-Cys-Gp-11.	29
Síntesis de Doxo-SMCC.....	29
Conjugación entre Ac-Cys-Gp-11 y Doxo-MCC.....	29
Caracterización de conjugado Doxo-Gp-11.....	29
1.3.9.2 Conjugado MT-BODIPY-Gp-11.....	30
Síntesis de Cys(Npys)-Gp-11.	30
Conjugación entre Cys(Npys)-Gp-11 y MT-BODIPY.....	30
Caracterización de conjugado MT-BODIPY-Gp-11.....	30
1.4 Ensayos biológicos.....	31
1.4.1 Cultivo celular y modelo <i>in vivo</i>	31
1.4.1.2 Cultivo de células HeLa.	31
1.4.1.3 Cultivo primario de células MAEC.....	31
1.4.1.4 <i>Drosophila melanogaster</i>	31
1.4.2 Internalización celular de los γ péptidos en células HeLa.....	32
1.4.3 Localización intracelular de los γ péptidos en las células HeLa.....	32
1.4.4 Inhibición de la endocitosis de los γ péptidos en las células HeLa.....	35

1.4.5 Ensayos de internalización de los γ péptidos en células MAEC.....	35
1.4.6 Ensayos de internalización de <i>Leishmania donovani</i>	35
1.4.7 Cuantificación de los péptidos a inyectar en <i>Drosophila melanogaster</i>	36
1.4.8 Inyección de <i>Drosophila melanogaster</i> con los diferentes péptidos.....	37
1.4.9 Microscopía de fluorescencia en <i>Drosophila melanogaster</i>	37
1.4.9.1 Epifluorescencia	37
1.4.9.2 Microscopía confocal de barrido de láser.....	37
1.4.9 Análisis Estadístico.....	39
RESULTADOS	41
CAPÍTULO 1. Estudio de la capacidad de entrada celular de γpéptidos basados en cis-γ-amino-L-prolina	43
1.1 Introducción.....	45
1.2 Resultados.	55
1.2.1 Capacidad de atravesar la membrana celular de nueve γ péptidos en células HeLa.....	55
1.2.2 Localización intracelular de los γ péptidos en células HeLa.	57
1.2.3 Efecto de los inhibidores de endocitosis frente a la entrada de γ péptidos en células HeLa.	62
1.2.4 Ensayos de internalización de los γ péptidos en células MAEC.....	63
1.3 Discusión.....	66
Conclusiones.....	70
CAPÍTULO 2. γpéptidos que atraviesan la membrana celular de <i>Leishmania donovani</i>	73
2.1 Introducción.	75
2.2 Resultados.	83
2.2.1 Síntesis de los péptidos derivados del CF-Gp-11.....	83
2.2.2 Capacidad de la familia del CF-Gp-11 de atravesar la membrana celular de <i>Leishmania donovani</i>	85

2.2.3 Gp-11 como vehículo transportador de fármacos: Conjugados doxorubicina-Gp-11 (Dox-Cp-11) y Miltefosina-BODIPY-Gp-11 (MT-BODIPY-Gp-11).	88
2.2.3.1 Síntesis y caracterización del conjugado doxorubicina-Gp-11 (Doxo-Gp-11).	88
2.2.3.2 Síntesis y caracterización del conjugado Miltefosina-BODIPY-Gp-11 (MT-BODIPY-Gp-11)	89
2.2.3.3 Capacidad del conjugado Doxo-Gp-11 de atravesar la membrana celular de Leishmania donovani.	92
i) Citometría de flujo.	93
ii) Monitoreo in vivo de los niveles de ATP intracelular en promastigotes de Leishmania donovani (cepa 3-Luc).	94
iii) Microscopía confocal.	95
2.2.3.4 Capacidad del conjugado MT-BODIPY-Gp-11 de atravesar la membrana celular de Leishmania donovani.	96
i) Citometría de flujo	97
ii) Microscopía confocal.....	97
2.3 Discusión	99
Conclusiones	103
CAPÍTULO 3. Evaluación de γ-péptidos como potenciales transportadores a través de la barrera hematoencefálica en el modelo <i>Drosophila melanogaster</i>.	105
3.1 Introducción	105
3.2 Resultados	118
3.2.1 Péptidos modelos y γpéptidos	118
3.2.2 Estudios de Epifluorescencia	119
3.2.3 Microscopía confocal de barrido de láser	123
3.2.3.1 Imágenes retinales a tiempo real.	123
3.2.3.2 Disección del cerebro de moscas moody-Gal4 inoculada con γ-péptido Atto 565-Gp-11.	130
3.3 Discusión	133

<i>Conclusiones</i>	136
DISCUSIÓN GENERAL	137
CONCLUSIONES GENERALES	149
<i>Bibliografía</i>	151

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las barreras biológicas, son interfaces generadas durante la evolución que hicieron posible que los organismos abandonaran el agua y se establecieran en la tierra. Durante el proceso evolutivo, la necesidad de especificación promovió la diferenciación de estas interfaces con el fin de regular procesos como la homeostasis del agua, la entrada de nutrientes, el intercambio de gases o la excreción de compuestos tóxicos. De este modo, se generaron distintos tejidos especializados en interacciones de distinto tipo entre el interior del organismo y su medio externo, dependiendo en cada caso de los requerimientos específicos como la entrada de solutos en el intestino, la absorción de oxígeno en pulmón, la homeostasis del agua y el control de la temperatura en la piel o la percepción del entorno (piel, ojo y oído).¹

Las membranas celulares o de los organelos (por ejemplo, el núcleo o la mitocondria, entre otros) se componen de bicapas fosfolipídicas que contienen proteínas integradas o posiciones periféricas, que son responsables de la comunicación y el transporte de iones y nutrientes. Las barreras biológicas incluyen la piel, las membranas mucosas y la barrera hematoencefálica (BHE), entre otras, están compuestas por capas de células dispuestas en una distribución específica, las cuales están conectadas mediante uniones estrechas. El transporte de moléculas a través de estas barreras es un factor importante en los organismos vivos.² Este comprende desde la entrada de nutrientes del ambiente, hasta la salida de moléculas tóxicas. Además, estos procesos de transporte se utilizan también para incorporar entidades terapéuticas al organismo, cuya eficacia dependerá en gran medida de su capacidad de atravesar dichas barreras.³ La expulsión de las moléculas por los transportadores de salida,³ su degradación *in vivo* mediada por enzimas proteolíticas⁴ y la baja permeabilidad de las barreras biológicas frente a las biomoléculas,^{5,6} son factores que limitan la distribución de compuestos terapéuticos y constituyen uno de los retos de la biomedicina en la actualidad.

Debido a las razones antes mencionadas, la administración de compuestos terapéuticos a células o tejidos específicos en las proporciones requeridas, es un proceso complicado en el cuerpo humano que presenta limitaciones.^{7,8} En su conjunto, estas barreras sirven para proteger el cuerpo de la invasión de patógenos y xenógenos, pero también limitan la capacidad de administrar fármacos a determinados sitios de acción. Los sistemas de administración de fármacos son plataformas terapéuticas que están diseñadas para interaccionar con estas barreras y facilitar la administración de un determinado principio activo a un tejido o tipo de célula específica.

Durante las dos últimas décadas, la conjugación de compuestos con alto interés terapéutico a transportadores moleculares, es decir moléculas con capacidad de atravesar las membranas como algunos péptidos (CPPs, *cell penetrating peptides*), se ha utilizado como estrategia en el área de administración de fármacos, para incrementar la permeabilidad celular en determinados tejidos o células.^{6,9,10}

1.1 Péptidos con capacidad de atravesar la membrana celular (CPPs).

El diseño de péptidos como ligandos específicos de dianas intracelulares específicas abre nuevas posibilidades terapéuticas, permitiendo la modulación de procesos que ocurren dentro de la célula o la participación en vías de señalización. Existe un gran interés en la comunidad científica por investigar y desarrollar éste tipo de péptidos,

tanto a nivel científico como industrial. Sin embargo, de los fármacos peptídicos que están en fases clínicas, menos del 10% están dirigidos a una diana terapéutica intracelular,¹¹ probablemente debido a la dificultad que ofrece la membrana celular para ser atravesada por la mayoría de las macromoléculas.

En los últimos años, los péptidos con capacidad de atravesar la membrana celular son una clase especial de transportadores, que constituyen una de las herramientas más utilizadas en el transporte intracelular no invasivo de fármacos. Estos transportadores pueden unirse a los fármacos mediante la formación de enlaces químicos o por la formación de complejos estables no covalentes.¹² La capacidad de transporte de los CPPs, ha permitido la internalización celular de moléculas de distinto grado de complejidad con propiedades terapéuticas y que incluyen moléculas pequeñas,^{9,13,14} ácidos nucleicos,¹⁵⁻¹⁶ proteínas,¹⁷ liposomas,^{9,18} quantum dots^{19,20} y agentes de contraste de resonancia magnética,²¹ entre otros.

Los CPPs presentan una gran diversidad de secuencias y estructuras, pero en general presentan características similares, que les confieren la propiedad de atravesar la membrana citoplasmática y alcanzar el interior de la célula. Estos compuestos son péptidos cortos de menos de 30 aminoácidos, cuya secuencia presenta un elevado número de residuos básicos (Lys o Arg), que les proporciona un marcado carácter catiónico. Su secuencia también contiene residuos hidrofóbicos, hecho que les confiere carácter anfipático, propiedad que facilita su interacción con la membrana y su posterior internalización.^{9,18,22}

En 1988 Frankel y Green²³ demostraron que la proteína **Tat** del virus de inmunodeficiencia humana (transactivador de la transcripción del VIH) era capaz de entrar eficientemente en células tisulares y promover la expresión genética del virus.^{23,24} Posteriormente, se describió al fragmento (48-60) del dominio básico de la proteína (péptido **Tat** (48-60)) como uno de los primeros CPPs.^{2,25} Este péptido es uno de los CPPs más estudiados y caracterizados hasta el momento^{26,24} y se le considera una de las moléculas más prometedoras en este contexto.

También, Derossi y cols.²⁷ demostraron que dos péptidos de 16 y 20 aminoácidos (pAntp) derivados de la tercera hélice de Antennapedia (factor transcripcional de *Drosophila melanogaster*), atraviesan la membrana celular y alcanzan el núcleo. Además estos péptidos, pueden ser recuperados intactos de la célula, hecho que indica que no son degradados en los lisosomas.^{27,28} La descripción de un número elevado de péptidos con capacidad de atravesar membranas y/o barreras biológicas ha dado paso al desarrollo de una estrategia alternativa para el suministro de fármacos, basada en la búsqueda de secuencias peptídicas (5-30 aminoácidos) que puedan utilizarse como transportadores moleculares.^{2,25} Como se ha mencionado anteriormente, una característica común de estas entidades químicas es la presencia de cargas positivas, por lo general argininas y lisinas^{29,30} y de residuos hidrofóbicos a lo largo de la secuencia lo que les confiere en líneas generales un carácter anfipático.^{9,18,22} Los CPPs más estudiados han sido el **Tat**,^{23,24} el pAntp (también conocido como penetratina),^{27,33} las poliargininas.^{29,31,32} Además, el MPG,³⁴ el Pep-1,^{35,36} el pVEC³⁷ y péptidos derivados de la calcitonina humana^{38,39} también han sido desarrollados como CPPs.

Aunque experimentos *in vitro* e *in vivo* avalan el uso de diversos CPPs como transportadores de fármacos, existe una elevada controversia acerca de los mecanismos de entrada celular que emplean estos péptidos.^{2,12,40,41} Estos mecanismos pueden ser dependientes o independientes de energía.⁴² Algunos CPPs conjugados a moléculas de bajo peso molecular pueden atravesar la membrana celular por translocación directa, mientras que los mismos CPPs conjugados a macromoléculas o cuando se utilizan en concentraciones bajas, entran en la célula por diferentes vías de endocitosis.⁴³

Los CPPs ofrecen algunas ventajas respecto a otros transportadores como una baja citotoxicidad, elevada eficiencia en distintas líneas celulares, una fácil adaptación a distintos sistemas de administración de fármacos, así como un potencial terapéutico intrínseco.^{41,42} Como agentes terapéuticos, los péptidos son particularmente atractivos ya que presentan actividad biológica y alta especificidad, lo que disminuye su interacción con otras moléculas y la probabilidad de producir efectos secundarios. Además, presentan baja acumulación en los tejidos y no generan metabolitos secundarios, lo que les confiere baja toxicidad.⁴⁴ Sin embargo, los CPPs tienen un uso limitado debido a su baja biodisponibilidad, la cual se asocia a su baja resistencia frente a proteasas, que conjuntamente con el hecho de quedar embebido en los endosomas, conduce a una rápida degradación de los mismos, siendo incapaces de llegar al citosol o al sitio de interés.⁴⁵ Además, los péptidos tienen algunas desventajas con respecto a otras moléculas terapéuticas tradicionales, como su mayor costo de síntesis y su baja vida media; esta última debido a que éstos carecen de estructura terciaria, lo que los hace particularmente sensibles a la degradación enzimática.¹¹

Con el fin de superar estos inconvenientes, se han desarrollado oligómeros conocidos como foldameros⁴ que mimetizan péptidos naturales. En 1997, Gellman⁴⁶ se refiere al término foldámero como cualquier polímero con una fuerte tendencia a adoptar una conformación compacta específica. Teniendo en cuenta esta definición, las secuencias peptídicas que conforman las proteínas pueden considerarse como foldameros. La investigación en la química de foldameros ha permitido explorar el plegamiento de esqueletos no naturales para entender la relación secuencia-plegamiento en los oligómeros naturales y desarrollar nuevos oligómeros que mimetizan polímeros naturales con diferentes aplicaciones terapéuticas.⁴ Dentro de los foldameros más estudiados, los péptidos ocupan un lugar importante debido a que cubren un amplio rango de aplicaciones biomédicas (Figura 1). Dentro de esta categoría de compuestos se incluyen los β -péptidos,⁴⁷ los γ -péptidos⁴⁸ y los péptidos cuya secuencia está compuesta por D-aminoácidos.

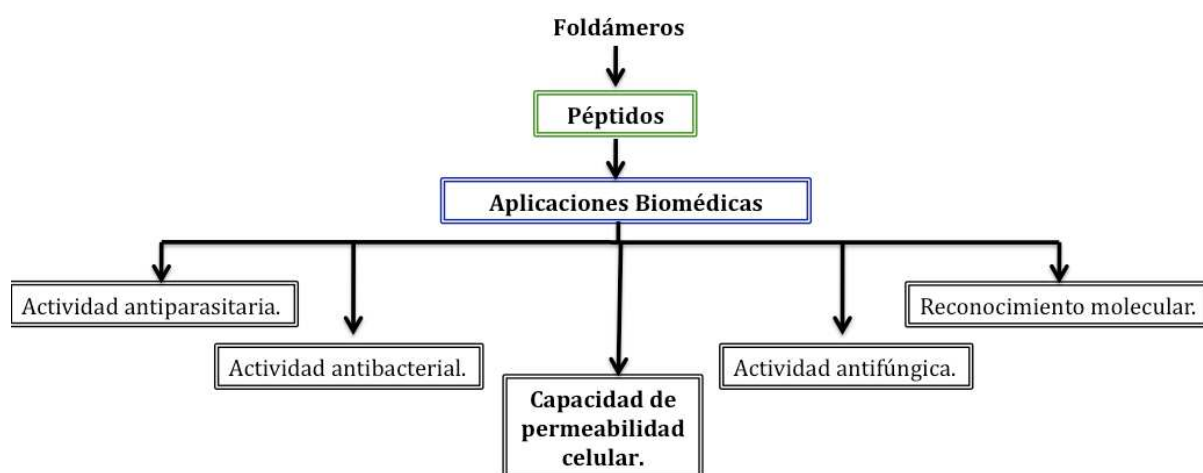


Figura 1. Foldámeros peptídicos y sus aplicaciones biomédicas.

La capacidad de permeabilidad celular de determinadas secuencias ha impulsado en los últimos años las investigaciones en este campo, en busca de estructuras peptídicas que faciliten la entrada de agentes terapéuticos a la célula.²

1.2 Péptidos con capacidad de atravesar la membrana celular (CPPs) en estudios clínicos.

Hasta el 2012, más de 10 péptidos terapéuticos se habían introducido en el mercado farmacéutico y cuatro de ellos con elevadas ganancias en el mercado global (Copaxone, Lupron, Zoladex y Sandostatin). Sin embargo, ninguno de estos péptidos son reconocidos por las proteínas intracelulares, limitando su potencial terapéutico. Los CPPs desarrollados los últimos años, podrían solucionar esta limitación, dando lugar a estructuras con un amplio rango de aplicaciones biomédicas. El desarrollo constante en este campo,² ha conducido a que siete CPPs se encuentren en ensayos clínicos y preclínicos para el tratamiento de diversas afecciones (Tabla 1).⁴⁵

CPPs	Aplicación	Estudios clínicos	Compañía
AZX100	Cicatrices queloides	Fase II	Capstone Therapeutics
RT001	Arrugas en la piel	Fase II	Revances Therapeutics
KAI-9803	Infarto de miocardio	Fase II	KAI Pharmaceuticals
XG-102	Pérdida de la audición	Fase II	Auris medical
Psorban (ciclosporina-poliarginina)	Psoriasis	Fase II	CellGate, Inc.
(RAhx-R) ₄	Previene el bloqueo eventual de la vena transplantada después de la cirugía de baipás vascular	Fase I	Avio Biopharma
DTS-108	Cáncer	Fase preclínica	Diatos SA

Tabla. 1 CPPs que se encuentran en ensayos clínicos.^{12,45}

1.3 Clasificación de los CPPs.

Los CPPs pueden clasificarse en subgrupos definidos por su origen o las características de su secuencia.²⁵ Además de esta clasificación general, pueden mencionarse subgrupos adicionales como los péptidos bipartitos como el transportan,⁵² el pVEC, MAP y Pep-1, los cuales son de origen quimérico y contienen dos o más de los motivos enumerados. Otro subgrupo está compuesto por aquellos CPPs que presentan al menos un 50% de su secuencia formado por prolinas, además de los tres residuos de arginina derivados de la proteína de almacenamiento del maíz (γ -zeína). Hasta la fecha, se conocen más de 100 CPPs de orígenes y características diversas. La mayoría de los CPPs presentan una carga neta positiva (83%), los CPPs aniónicos no forman ninguna categoría propia y son asignados a las otras diferentes clases (anfipática e hidrofóbica) analizándolos caso por caso. Los anfipáticos, formados tanto por catiónicos como por aniónicos constituyen el 44%, mientras los hidrofóbicos solo el 15%. El estado del arte de la temática permite demostrar la elevada variedad de estos péptidos teniendo en cuenta las secuencias, el origen, la función y las aplicaciones biomédicas de cada uno de ellos.² Teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas de los CPPs, es posible clasificarlos en tres subgrupos: catiónicos, anfipáticos o hidrofóbicos (Tabla 2).^{2,18,25}

1.3.1 CPPs catiónicos.

Los péptidos catiónicos son aquellos que presentan una carga neta positiva elevada y algunos residuos de aminoácidos ácidos en su secuencia. Los estudios realizados sugieren que al menos se necesitan ocho cargas netas positivas para una eficiente absorción de estos compuestos.^{45,53} Estas moléculas fueron originalmente consideradas como vehículos de transporte de tipo “caballos de Troya”, internalizándose en las células sin generar respuesta.⁵⁴ Sin embargo, los péptidos catiónicos pueden inducir un amplio rango de efectos secundarios relacionados con la integridad de la membrana celular y la viabilidad celular, los cuales pueden resultar más sutiles de determinar que la muerte celular. Dentro de los CPPs de carácter catiónico más estudiados se encuentran el **Tat**,⁵⁵⁻⁵⁷ el R9,^{29,58} el hLF⁵⁹ y el (RXR)₄,⁶⁰ entre otros (Tabla 2). Algunos trabajos agrupan dentro de esta categoría aquellos péptidos con carga neta positiva, necesaria para la internalización celular, pero que no forman una hélice anfipática.⁴⁵

1.3.2 CPPs hidrofóbicos.

Los CPPs hidrofóbicos son aquellos que contienen solo residuos apolares. Dentro de esta familia se encuentran los péptidos grapa (*stapled peptides*),⁹⁰ los prenilados⁹¹ y el pepducin.⁹² Hasta el momento, solo unos pocos CPPs hidrofóbicos han sido descubiertos como secuencias de señales de la proteína β 3 integrina (VTVLALGALAGVGVG) y del factor de crecimiento de fibroblastos Kaposi.⁸¹ Algunos aminoácidos hidrofóbicos forman parte de CPPs anfipáticos, como en el caso del MAP⁷⁴ y de otros CPPs quiméricos de cadenas largas, que presentan residuos catiónicos adicionales para incrementar la permeabilidad de la membrana frente a estos compuestos.⁹³

1.3.3 CPPs anfipáticos.

Se definen como péptidos anfipáticos aquellos que contienen en su estructura regiones polares y apolares.⁴⁵ Se incluyen en este subgrupo el MPG,³⁴ la penetratina o pAntp,²⁷ y el CADY,^{61,62} en los cuales el carácter anfifílico se encuentra estrechamente relacionado con su estructura primaria.

Algunos CPPs como el MPG, son péptidos quiméricos obtenidos mediante la unión covalente de un dominio hidrofóbico como diana de las membranas celulares a una secuencia de localización celular (SLC).⁶³ Otros CPPs anfipáticos primarios son derivados de proteínas naturales, como el pVEC,⁶⁴ el ARF (1-22)⁶⁵ y el BPrPr (1-28).⁶⁶

Los CPPs anfipáticos con estructura secundaria de tipo α -hélice contienen una parte altamente hidrofóbica, mientras la otra puede ser catiónica, aniónica o apolar. Aquellos con estructura secundaria de tipo lámina β , se basan en alternar secuencias hidrofóbicas e hidrofílicas que se encuentran expuestas al disolvente, como el vT5 (Tabla 2).^{45,67,68}

1.3.3.1 Péptidos ricos en prolina como atractiva familia de CPPs anfipáticos.

Los péptidos ricos en prolina constituyen otra clase interesante de CPPs anfipáticos que han sido estudiados en diversas familias, diferentes en secuencia y estructura, pero con presencia del fragmento prolina (esqueleto pirrolidínico) como característica común. La prolina se caracteriza por poseer el anillo pirrolidínico que induce rigidez conformacional e impedimento estérico al introducir este aminoácido en el esqueleto peptídico. A pesar del esqueleto estructural hidrofóbico de la prolina, tiene la gran ventaja de ser soluble en agua y diferentes disolventes orgánicos.⁶⁹ Varios trabajos han demostrado que los CPPs ricos en prolina internalizan en células eucarióticas.⁷⁰

Debido a las propiedades de la prolina, los péptidos ricos en este aminoácido pueden adoptar dos estructuras secundarias: la poliprolina I (PPI) y la poliprolina II (PPII). La PPI es la conformación principal en presencia de alcoholes alifáticos, mientras que la PPII es la conformación principal en medio acuoso o en presencia de ácidos alifáticos. La PPI forma una hélice compacta dextrógira, compuesta por 3,3 residuos por giro, en la cual los enlaces peptídicos adoptan la conformación *cis*. Por otra parte, la PPII es una hélice extendida levógira, que está compuesta de tres residuos por giro, con todos los enlaces peptídicos en conformación *trans*. Debido al proceso de equilibrio existente entre ambos isómeros conformacionales (*cis/trans*) asociado a los enlaces peptídicos, las secuencias peptídicas ricas en prolina pueden alternar en solución entre las dos estructuras secundarias anteriormente descritas, mediante un simple cambio del disolvente.⁶⁹

Esta clase de CPPs presentaron interesantes propiedades de autoensamblaje. Dichas propiedades fueron estudiadas mediante dicroísmo circular (DC) y microscopía electrónica de transmisión (TEM, *transmission electron microscopy*). Algunos de los péptidos pertenecientes a este grupo, son derivados del dominio N-terminal de γ -zeína (proteína de almacenamiento del maíz) y han sido desarrollados a partir de la familia de péptidos lineales ricos en prolina.⁷⁰ Otros de estos CPPs como el bactecenin-7 (Bac-7)

están sintéticamente basados en la derivatización de hélices de poliprolina con varios grupos R unidos al anillo de pirrolidina.⁸⁶

CPPs	Secuencia	Origen	Ref.
Catiónicos			
Tat (48-60)	GRKKRRQRRRPPQ	Dominio VIH-Tat	55
Penetratina	RQIKIWFQNRRMKWKK	Homodominio de Antennapedia	27
R9	RRRRRRRRR	Sintético	29,58
Poliargininas	(R) _n 6<n<12	Sintéticos	71,31
R6W3	RRWWRRWRR	Sintético	72
(RXR) ₄	(R-Ahx ⁸ -R) ₄	Sintético	60
Anfipáticos			
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKK RKV	gp41-VIH/antígeno T SV40	34
pVEC	LLIILRRRIRKQAHASK	Cadherina (615-632)	37
CADY	GLWRALWRLRLSLWRLWRA	Sintético	73
vT5	DPKGDPKGVTVTVTVTGKGDPKP D	Proteínas virales	68
ARF (1-22)	MVRRFLVTLRIRACGPPRVRV	Proteína p14ARF	65
MAP	KLALKLALKAALKLA	Quimérico	74
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	Racimo enriquecido con triptófanos	35
Péptidos ricos en prolina			
BAC-7	RRIRPRPRLPRPRPLPFPRPG	Péptidos antimicrobianos de la familia de la Bactenecina	75,76
(PPR) _n	(PPR) ₃ , (PPR) ₄ , (PPR) ₅ , (PPR) ₆	Sintéticos	77
(PRR) _n	(PRR) ₃ , (PRR) ₄ , (PRR) ₅ , (PRR) ₆	Sintéticos	77
aPP4R1	GPSQPTYPGDDAPVRDLIRFYRDLQ RYLNVVTRHRY	Sintéticos	78
aPP5R1	GPSQPTYPGDDAPVRDLIRFYRDLR RYLNVVTRH		
aPP6R1	GPSQPTYPGDDAPVRDLRRFYRDLR RYLNVVTRHRY		
P8LKK P11LKK	FL-G(P _L XX) _n P _L -CONH ₂	Sintéticos	79
P8LRR	X=P _K o P _R , n=2 o 3		
P11LRR			
SAP	VRLPPPVRLLPPPVRLLPPP	Sintético	80
SAP(E)	VELPPPVELPPPVELPPP	Sintético	80
Hidrofóbicos			
PFV	PFVYLI	C105Y	81,81
SG3	RLSGMNEVLSFRWL	Quimioteca peptídica aleatoria	82
Pep-7	SDLWEMMMVSLACQY	CHL8	83
FGF	PIEVCMYREP	Proteínas virales y celulares	84,85

Tabla 2. CPPs representativos.^{2,42}

Dentro de los CPPs ricos en prolina más estudiados hasta la fecha, es posible distinguir dos categorías dependiendo de si los aminoácidos presentes en la secuencia peptídica son o no naturales:

i) CPPs lineales ricos en prolina compuestos por aminoácidos naturales.

Este grupo está integrado por aquellas secuencias lineales formadas por aminoácidos naturales, pero también por otras más sofisticadas con estructuras dendriméricas.⁶⁹ Tam y cols.⁸⁷ utilizaron una proteína de 59 residuos conocida como Bac-7 (Tabla 2), que pertenece a la familia de la Bactenecina, como patrón para el diseño de CPPs. Esta proteína mostró actividad antimicrobiana mediante la inhibición intracelular de la maquinaria de la síntesis proteica. Desde el punto de vista estructural presentó una elevada densidad de carga neta positiva y posee 3 copias de una cadena de 14 residuos. Los estudios realizados en base a la estructura de Bac-7 permitieron acceder a nuevos CPPs en los cuales todas las secuencias contienen el motivo Pro-Xaa y permiten la absorción de la NeutrAvidina por parte de las células. Estos CPPs mostraron estructuras secundarias híbridas entre una α -hélice y una PPII, debido al alto contenido de prolina presente en los mismos.⁸⁷

Dentro de esta categoría, también se encuentran CPPs ricos en prolina derivados del dominio N-terminal de la γ -zeína, (proteína de almacenamiento del maíz).^{88,89} Desde el punto de vista estructural, esta proteína contiene tres dominios: un dominio repetitivo rico en prolina, un dominio repetitivo central (PX)_n y un dominio C-terminal rico en cisteínas. El dominio γ -ZNPRD contiene la secuencia (VXLPPP)₈, que es la responsable de dirigir la proteína hacia el retículo endoplasmático.⁶⁹

ii) CPPs lineales miméticos de prolina: γ -péptidos.

Dentro de los péptidos miméticos con capacidad de atravesar membranas celulares se encuentran los γ -péptidos sintetizados a partir de la *cis*- γ -amino-L-prolina, cuyo esqueleto se construye a través del grupo γ -amino (Figura 2). Estos péptidos pueden ser funcionalizados en los grupos α -amino de cada monómero mediante reacciones de acilación, alquilación o guanidilación para obtener entidades peptídicas con características hidrofóbicas, hidrofílicas o anfipáticas,^{12,49} como los hexapéptidos funcionalizados con guanidinos (N^{α} -guanidil- γ -hexapéptido) o con grupos alquílicos (N^{α} -alquil- γ -hexapéptido), que soportando un fragmento *di*-oxa-octanoico, atravesaron la membrana celular en células HeLa y COS-1.⁴⁹

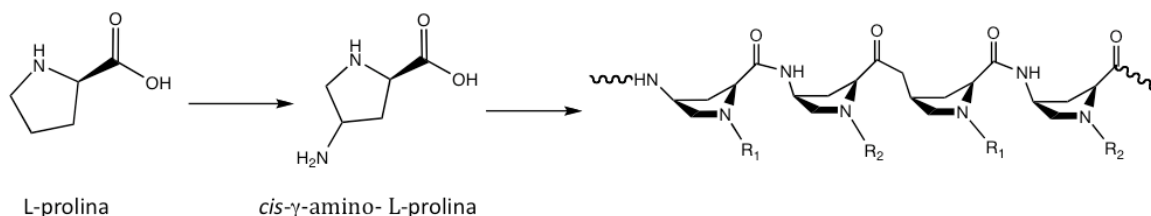


Figura 2. γ -péptidos derivados de prolina.

Desde hace unos años nuestro grupo de investigación trabaja en la síntesis y el estudio de la potencial actividad biológica de estos γ -péptidos, algunos de los cuales tienen la habilidad de atravesar membranas celulares. Previo a el trabajo que se presenta en esta tesis doctoral, en el grupo se sintetizó una quimioteca de 106 péptidos formados por γ -

amida oligómeros de *cis*- γ -amino-L-prolina, con diferentes modificaciones en el grupo α -amino (acilo, alquilo y guanidinio) que mimetizaban las cadenas laterales de los aminoácidos naturales (Figura 3, A).^{48,49,50} Estos péptidos se sintetizaron utilizando la combinación de dos grupos ortogonales Fmoc y Boc en fase sólida (estrategia Fmoc/Boc), donde Fmoc fue el grupo protector temporal para el grupo γ -amino de cada monómero y Boc el grupo protector semipermanente para el grupo α -amino. El esqueleto de estos péptidos contiene enlaces peptídicos entre la función carboxílica y la función γ -amino de los residuos sucesivos. Las diferentes cadenas laterales en el grupo α -amino fueron introducidas por medio de procedimientos de acilación, alquilación ó guanidilación. Con esta quimioteca se realizaron ensayos que estimaron la capacidad de entrada en células HeLa y se determinó que nueve de estos γ -péptidos (Figura 4) presentaron una elevada eficiencia de entrada en estas células.⁵⁰ También, se exploraron las propiedades como CPPs de 49 de estos péptidos en promastigotes de *Leishmania donovani* y amastigotes de *Leishmania pifanoi*, demostrándose que tres de estos γ -péptidos fueron capaces de atravesar la membrana plasmática de dicho parásito. Estos γ -péptidos presentaron baja citotoxicidad incluso a altas concentraciones, estabilidad frente a proteólisis enzimática y en general buena solubilidad.^{49,50} Además, uno de los γ -péptidos sintetizados se conjugó a nanopartículas de óxido de hierro (Figura 3, B) y se demostró que eran capaces de favorecer su internalización en células HeLa.⁵¹

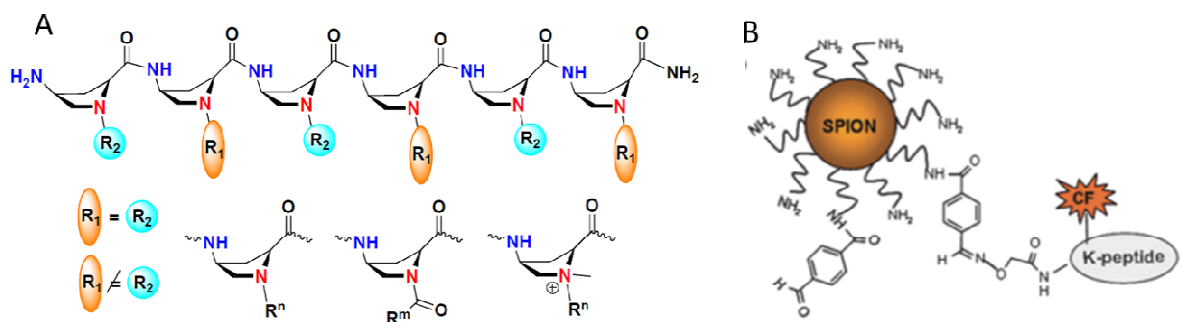


Figura 3. A. Biblioteca γ -peptídica sintetizada previamente en nuestro grupo de trabajo.⁵⁰ B. Conjugado γ -péptido (péptido-K)-nanopartículas de óxido de hierro.

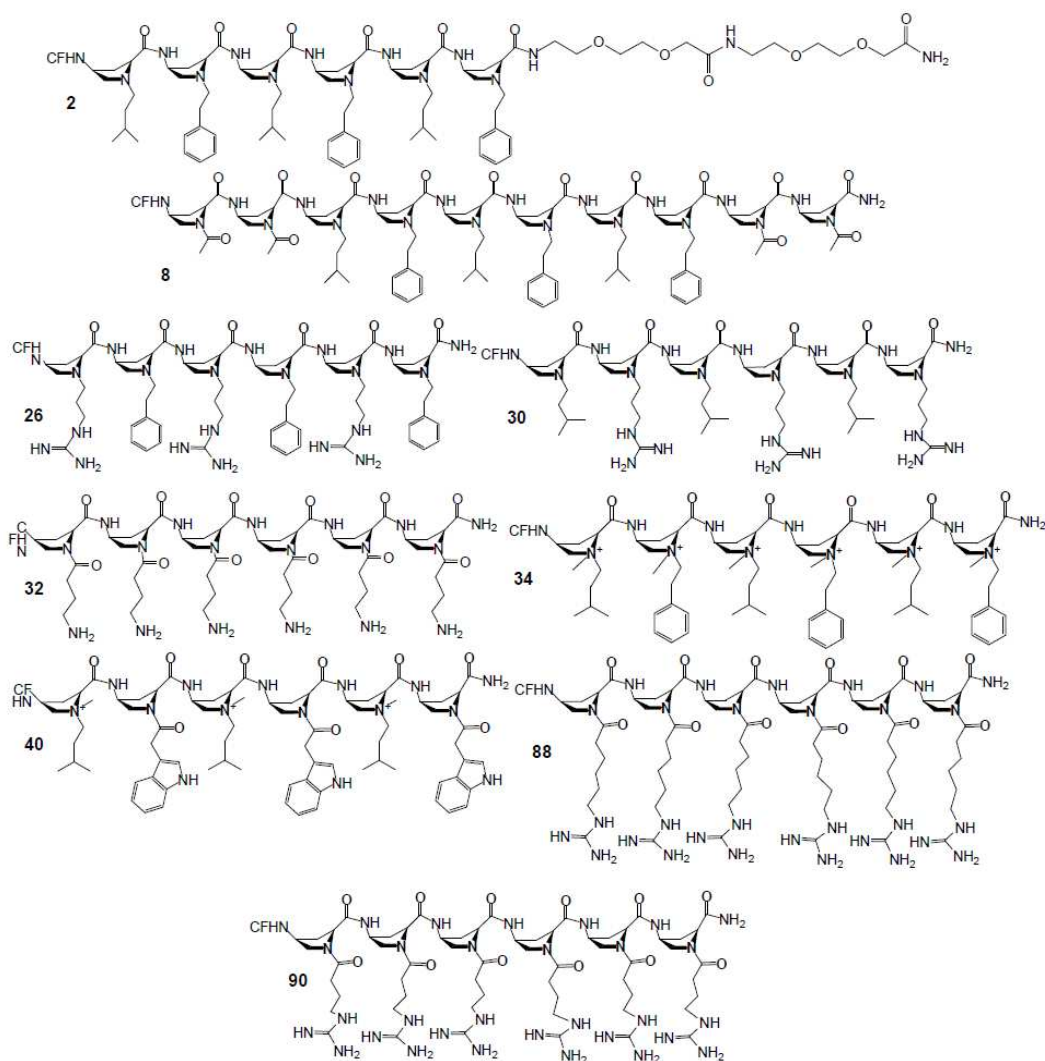


Figura 4. Nueve γ -péptidos con capacidad de atravesar la membrana celular de células HeLa.⁵⁰

Todas las propiedades de los γ -péptidos mencionadas anteriormente hacen que estos compuestos puedan ser considerados candidatos para ser utilizados como transportadores de moléculas con valor terapéutico.

Todos los antecedentes previamente expuestos, evidencian que los CPPs constituyen potenciales moléculas transportadoras de fármacos con un amplio rango de aplicaciones biomédicas. En general, todos los CPPs presentaron características comunes, entre las que destacan, la presencia de carga neta positiva, así como carácter anfipático. Como ejemplo, la familia de γ -péptidos basados en *cis*- γ -amino prolina, ha mostrado resultados promisorios como CPPs frente a células HeLa, promastigotes de *Leishmania donovani* y amastigotes de *Leishmania pifanoi*,⁵⁰ impulsando la continuidad de esta temática en nuestro grupo de investigación.

OBJETIVOS

El **objetivo principal** de la presente tesis doctoral fue estudiar el uso de los γ -péptidos seleccionados como potenciales transportadores en distintos tipos de barreras biológicas, como la membrana citoplasmática de distintos tipos de células (HeLa y MAEC), del parásito *Leishmania donovani* y de la barrera hematoencefálica (BHE) utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo.

Para cumplir con este propósito, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

Estudio de la capacidad de entrada celular de γ -péptidos basados en *cis* γ -amino-L-prolina.

- Establecer la capacidad de atravesar la membrana citoplasmática de células HeLa, de nueve γ -péptidos basados en *cis*- γ -amino prolina, previamente seleccionados de la quimioteca de nuestro grupo de investigación.
- Discernir el mecanismo de entrada de estos γ -péptidos en células HeLa y determinar su distribución a nivel intracelular mediante microscopía confocal.
- Evaluar la capacidad de entrada de estos tres γ -péptidos en células de cultivo primario MAEC, que se utilizan como modelo *in vitro* para estudiar la enfermedad de Fabry.

Estudio de la capacidad de entrada celular de γ -péptidos guanidilados en *Leishmania donovani*.

- Sintetizar y caracterizar una familia de γ -péptidos guanidilados inspirados en un compuesto que previamente había mostrado capacidad de internalización en *Leishmania donovani*, así como conjugados fármaco- γ -péptido para determinar su uso como transportadores.
- Estudiar la capacidad de estos péptidos guanidilados de atravesar la membrana de *Leishmania donovani* y determinar la capacidad de transportar distintos fármacos, doxorubicina y miltefosina, mediante híbridos conjugados fármaco- γ -péptido.

Evaluación de γ -péptidos como potenciales transportadores a través de la barrera hematoencefálica utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo.

- Desarrollar y validar un metodología para estimar la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo *in vivo*.
- Estimar la capacidad de atravesar la BHE de un conjunto de péptidos control con capacidad de entrada en cerebro conocida y una familia pequeña de γ -péptidos basados en *cis*- γ -amino prolina.

METODOLOGÍA

1.1 Disolventes y reactivos.

Los disolventes y los reactivos químicos utilizados fueron obtenidos en proveedores comerciales y se utilizaron sin ningún tratamiento previo. Los más utilizados se resumen en la siguiente tabla (Tabla 3).

Abreviatura	Nombre	Casa comercial
	Acetona	Proquibasa
	Piperidina	Scharlau
ACH	Ácido α -ciano-4-hidrocinámico	Sigma-Aldrich
ACN	Acetonitrilo	JTBaker
Ac ₂ O	Anhídrido acético	SDS
AcOEt	Acetato de Etilo	SDS
AcOH	Ácido acético	Scharlau
Boc-Gaba-OH	Ácido 4-Boc-aminobutírico	Polypeptide
	Ácido 6-Boc-amino hexanoico	Polypeptide
CF	5-(6) carboxifluoresceína	Sigma-Aldrich
	Clorhidrato de doxorubicina	Sigma-Aldrich
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno	Sigma-Aldrich
DCM	Diclorometano	Scharlau
DIPCDI	<i>N,N</i> 2-Diisopropilcarbodiimida	Fluka
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina	Sigma-Aldrich
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida	Scharlau
DMSO	Dimetilsulfóxido	Sigma-Aldrich
TEA	Trietilamina	Panreac
Et ₂ O	Dietiléter	SDS
HCOOH	Ácido fórmico	Merck
Fmoc-(2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-Abpc	Ácido (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-4-Fmoc-amino-1-Boc-pirrolidina-2-carboxílico	Polypeptide
Hexano	n-Hexano	SDS
HF	ácido fluorhídrico	
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol	
OxymaPure	etil-2-ciano-2-(hidroximino)acetato	Luxembourg Bio Tech. Ltd.
MeOH	Metanol	SDS
NaCl	Cloruro de sodio	Panreac
NaBH ₃ CN	Cianoborhidruro de sodio	Sigma-Aldrich
PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tri(pirrolidin)fosfonio	Novabiochem
TBME	<i>tert</i> -butilmetiléter	SDS
TFA	Ácido trifluoroacético	KaliChemie
TIS	Triisopropilsilano	Sigma-Aldrich

Tabla 3. Disolventes y reactivos más utilizados.

1.2 Equipos.

La principal instrumentación utilizada se resume en la siguiente tabla (Tabla 4).

Equipos	Modelos
Autoclave	Raypa; AES-12
Balanza	Mettler Toledo PB3002-S, 2 cifras significativas. Mettler Toledo AB204-S, 4 cifras significativas. Mettler Toledo AT261 Detlarange, 5 cifras significativas.
Citómetro de flujo	FC-500
Centrífugas	Beckman Coulter, Allegra 21R. Para tubos de 50 y 15 mL. Labnet. Int. Prisma R. Centrífuga para tubos de 1.5 y 2 mL.
Espectrofotómetro	Espectrofotómetro con lector múltiple de placas (ELx800 Bio-Tek Instruments, Inc).
HPLC-MS	LTQ-FT Ultra (Thermo Scientific)
RP-HPLC	Analítico: Módulo de separación Waters 2695 equipado con un detector PDA Waters 2998. Preparativo: equipo compuesto por los módulos Waters Controller 600, Waters Sample Manager 2700, Waters 2487 Dual Absorbance Detector y Waters Fraction Collector II
Incubador de células	Blinder; CB150
Liofilizador	Vitris; Freezemobil 12EL; Edwards RV12 pump
Lupa de Fluorescencia	Leica M2FIII Cámara digital Leica DC500
Sonicador	Branson; Sonifier 250
Microscopios	Microscopio láser confocal Leica TCS SP5. Microscopio invertido Zeiss Axiovert 200M asociado al sistema Spinning Disk (Perkin Elmer Ultraview ERS). Los videos fueron grabados utilizando la cámara Hammamatsu (C9 100-50) 14 bits. Microscopio confocal de barrido láser LSM 780, Carl Zeiss
Nanodrop	NanoDrop spectrophotometer ND-1000
Rotavapor	Helidolph, Laborota 400
Microinyector de Moscas	Sistema de Microinyección MINJ-1™ módulo de control pulsado

Tabla 4. Instrumentos utilizados para el desarrollo de la parte experimental.

1.3 Síntesis de péptidos en fase sólida.

Para realizar todos los estudios de bioactividad resumidos en esta tesis, se sintetizaron 8 secuencias peptídicas (γ -péptidos derivados de prolina) (Figura 5) y 6 péptidos modelos (Tabla 5), utilizando metodologías de síntesis en fase sólida que se detallan a continuación.

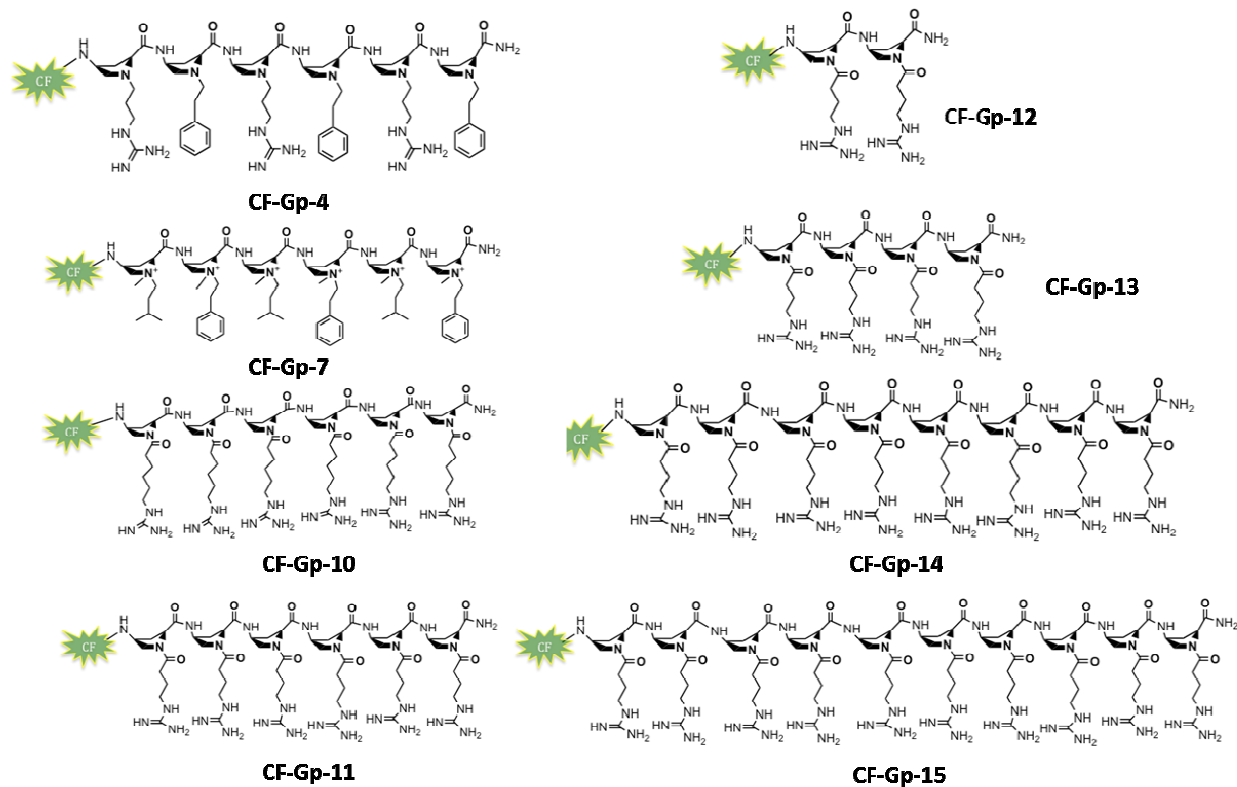


Figura 5. Estructura química de los γ -péptidos sintetizados en fase sólida.

Péptido y secuencia

Péptido RGV

H-YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG-NH₂

Péptidos que se unen al receptor de transferrina

H-HAIYPRH-NH₂ (**pTf-1**)

H-THRPPMWSPVWP-NH₂ (**pTf-2**)

Angiopep-2

H-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-NH₂

Angiopep-7

H-TFFYGGSRGRRNNFRTEEY-NH₂

Tat

H-RRRQRRKRG-NH₂

Penetratina (pAntp).

H-RQIKIWFQNRMMKWKK-NH₂

Tabla 5. Péptidos modelos sintetizados.

1.3.1 Síntesis de γ -péptidos (estrategia Fmoc/Boc).

Los γ -péptidos se sintetizaron siguiendo el protocolo de síntesis en fase sólida desarrollado previamente en nuestro grupo de investigación.^{48,49} La síntesis de estos compuestos se realizó de modo manual, utilizando jeringas de polipropileno que contienen un filtro de polietileno poroso. Los γ -péptidos que presentan un esqueleto común formado por el monómero *cis*- γ -amino prolina, los cuales fueron sintetizados utilizando el Fmoc-(2*S*, 4*S*)-Abpc. Esta síntesis se basa en la combinación de la estrategia Fmoc y Boc, los cuales son grupos ortogonales que permiten funcionalizar de manera selectiva la secuencia peptídica. El grupo Fmoc se utilizó como grupo protector temporal de la función γ -amino de la Fmoc-(2*S*, 4*S*)-Abpc.^{48,49} La incorporación de estos monómeros en este grupo amino, permitió la elongación del esqueleto peptídico. Por otra parte, el grupo Boc protege de forma semipermanente la función α -amino de este monómero y permite la incorporación de las cadenas laterales para el caso de los péptidos homooligómeros, como los **CF-Gp (10-15)** (Figura 1). La incorporación de esta cadena se realizó por medio de reacciones de acilación y guanidilación.

Para el caso de los péptidos heterooligómeros, **CF-Gp-4** y **CF-Gp-7**, se sintetizaron los monómeros derivados del Fmoc-(2*S*, 4*S*)-Apc con las cadenas laterales previamente incorporadas (m 1-4).

Para la síntesis en fase sólida de los γ -péptidos, se utilizó la resina *p*-metilbenzhidrilamina (MBHA, 0.63 mmol/g) como soporte sólido. Esta resina se acondicionó con lavados sucesivos con DCM, TFA/DCM (4:5, v/v), DIEA/DCM y DMF. El procedimiento general con las diferentes etapas de la síntesis de los péptidos por medio de la estrategia Fmoc/Boc se describe en la siguiente tabla (Tabla 6).

La síntesis de los γ -péptidos se realiza en forma secuencial. El primer monómero Fmoc-(2*S*, 4*S*)-Abpc se enlaza a la resina por medio de una reacción de acoplamiento utilizando Fmoc-(2*S*, 4*S*)-Abpc)/DIPCDI/OxymaPure (3:3:3) en DMF durante 2 h y con agitación constante (Tabla 6, Etapa 3).

La desprotección de los grupos γ -amino protegidos con Fmoc se llevó a cabo con tratamientos con piperidina en DMF (1:9, v/v) o una solución de piperidina/DBU en DMF (1:1:9, v/v) (Tabla 6, Etapa 7). Esta etapa es necesaria para acoplar el siguiente aminoácido y continuar la elongación de la secuencia peptídica. Los procesos de desprotección y acoplamiento se repiten tantas veces como sea necesario, hasta completar la secuencia del péptido deseado. Los acoplamientos de los monómeros Fmoc-(2*S*, 4*S*)-Abpc se confirman por medio de la prueba colorimétrica de Kaiser (ensayo de ninhidrina).

Posteriormente, se eliminan los grupos Boc de los grupos α -amino presentes en la secuencia (Tabla 6, Etapa 12) y se incorporan las cadenas laterales por medio de una reacción de acilación, utilizando el ácido correspondiente (ácido hexanoico para el **CF-Gp-10** o ácido butírico para el **CF-Gp 11-15**, con un grupo amino protegido con Boc)/DIPCDI/OxymaPure (5:5:5), (Tabla 6, Etapa 17). Esta reacción se verifica con la prueba de cloranil para el caso de aminas secundarias.

Etapas	Reactivos	Proceso	Ciclos	t/ciclo (min)
1	DCM	Lavado	5	1
2	DMF	Lavado	5	1
3	Fmoc-AA-OH/DIPCDI/OxymaPure (3:3:3) en DMF	Acoplamiento	1	120
4	DMF	Lavado	5	1
5	DCM	Lavado	5	1
6	DMF	Lavado	5	1
7	piperidina/DMF (2:8,v/v) piperidina/DBU/ DMF (1:1:8, v/v)	Eliminación Fmoc	3	10
8	DMF	Lavado	5	1
9	DCM	Lavado	5	1
10	DMF	Lavado	5	1
11	DCM	Lavado	5	1
12	TFA/DCM (2:3, v/v)	Eliminación Boc	1	1
			1	30
13	DCM	Lavado	5	1
14	DIEA/DCM (1:9,v/v)	Neutralización	3	3
15	DCM	Lavado	5	1
16	DMF	Lavado	3	1
17	Ácido carboxílico/ DIPCDI/oximaPure,(5:5:5) en DMF	Acilación aminas	1	120
18	DMF	Lavado	5	1
19	DCM	Lavado	3	1
20	DMF	Lavado	5	1
21	Fmoc-(2 <i>S</i> , 4 <i>S</i>)-Abpc/DIEA (5:5) en DCM	Guanidilación	1	60

Tabla 6. Procedimiento general para la síntesis de los péptidos mediante la estrategia Fmoc/Boc. Todas las etapas requieren agitación constante.

Se eliminan los grupos Boc de las aminas de la cadenas laterales (Tabla 6, Etapa 12) y se incorporan los grupos guanidinos utilizando *N,N'*-Di-Boc-1H-pyrazole-1-carboxamide/DIEA (5:5) en DCM para cada amina primaria (Tabla 6, Etapa 12).

Los excesos de reactivos, disolventes y posibles subproductos que se encuentran en disolución se eliminaron por filtración al vacío. Después de cada reacción, la resina se lavó sucesivamente con DMF y DCM utilizando 10 mL de solvente por gramo de resina (Tabla 6).

La aminación reductiva se lleva a cabo en presencia del aldehído dependiendo del péptido (N-Boc-3-aminopropanal, fenilacetaldehído, isovaleraldehído) en ácido acético 1% en DMF por 30 min, después se adiciona el agente reductor NaBH₃CN disuelto en MeOH.

1.3.2 Síntesis de péptidos en fase sólida (estrategia Fmoc/tBu).

Los péptidos **RGV**, **pTf-1**, **pTf-2**, **Angiopep-2**, **Angiopep-7**, **pAntp**, **Tat** (Tabla 7) se sintetizaron en fase sólida con el empleo de la química Fmoc/tBu utilizando la resina Rink amida con una sustitución de 0.73 mmol/g como soporte sólido.

El procedimiento general de la síntesis de los péptidos por medio de la estrategia Fmoc/tBu se describe en la Tabla 7. La eliminación del grupo α -amino protector (Fmoc) se realizó con una solución piperidina/DMF (2:8). Para eliminar la piperidina restante se realizan lavados con DMF y con DCM. En el grupo α -amino libre de cada AA anclado a la resina, se lleva a cabo la reacción de acoplamiento con AA/DIPCDI/oximaPure (3:3:3) (Tabla 7, Etapa 7).

Los acoplamientos se realizaron con agitación constante a T_{amb} durante 1 h y se confirmaron por medio de las pruebas colorimétricas de Kaiser (ensayo de ninhidrina) y cloranil para el caso de aminas primarias y secundarias, respectivamente.

También, es necesario que las cadenas laterales de los L- α -aminoácidos (Fmoc-AA-OH) estén protegidas: la asparagina (Asn, N) y la cisteína (Cys, C) con el grupo trityl (Trt), la serina (Ser, S), la treonina (Thr), el ácido glutámico (Glu, E) y la tirosina (Tyr, Y) con *t*-butil éster (tBu), la arginina (Arg, R) con 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf), la lisina (Lys) y el triptófano (Trp, W) con *t*-butoxycarbonil (Boc). El grupo protector evita la formación de un enlace peptídico no deseado, impidiendo que el grupo carboxilo de un aminoácido reaccione con el grupo amino de uno de sus análogos. De igual manera, cuando se protegen las cadenas laterales se evita que estas reaccionen con los grupos amino o carboxilo de otros aminoácidos o que ocurran reacciones secundarias.

Etap	Reactivos	Proceso	Ciclos	t/ciclo (min)
1	DCM	Lavado	3	1
2	DMF	Lavado	3	1
3	Piperidina 20% en DMF	Eliminación Fmoc	3	10
4	DMF	Lavado	3	1
5	DCM	Lavado	3	1
6	DMF	Lavado	3	1
7	Fmoc-AA-OH/DIPCDI/Oxima Pure 3:3.3 en DMF	Acoplamiento	1	60
8	DMF	Lavado	5	1
9	DCM	Lavado	3	1
10	DCM	Lavado	1	1

Tabla 7. Procedimiento general para la síntesis de los péptidos mediante la estrategia Fmoc/tBu.

1.3.3 Conjugación de los péptidos a la sonda fluorescente.

Todos los péptidos se unieron a la carboxifluoresceína (CF), esta reacción se realizó en fase sólida utilizando CF/PyBOP/HOAt/DIEA (4:4:12:12) en DCM:DMF (3:7) como disolvente. La reacción se mantiene a T_{amb} con agitación continua y en ausencia de luz. Se realizan dos tratamientos bajo las mismas condiciones. Luego, se lava la resina con una solución de piperidina/DMF (5:5) (1 x 10 min, x 30 min) y seguidamente los lavados sucesivos con los diferentes disolventes (DMF, DCM).

En especial el **Gp-11** se conjugó con **Atto 488** y **Atto 565**. La conjugación se realizó en solución por Imma Farràs de la Unidad de Química Combinatoria.

1.3.4 Escisión de los péptidos de la resina MBHA.

En los γ -péptidos protegidos con grupos Boc, fue necesario eliminarlos mediante tratamiento con TFA/DCM (4:5), previo a la escisión del péptido de la resina. Este procedimiento se llevó a cabo con la resina seca dentro de un reactor de teflón en presencia de anisol, el cual se enfrió con N_2 líquido a $0^\circ C$ y posteriormente se destiló HF (9:1, v/v). El anisol, actúa como capturador de carbocationes. Esta reacción se mantiene con agitación continua durante 1.5 h a $0^\circ C$. Transcurrido este tiempo se elimina el ácido a presión reducida, los péptidos libres se precipitan en MTBE, se filtra la suspensión a través de una jeringa provista de un filtro de polipropileno, el residuo se lava 4 x con una solución acuosa de ácido acético 10% y se liofiliza.

1.3.5 Escisión de los péptidos de la resina Rink amida MBHA.

Una vez sintetizados estos péptidos, se escinden de la resina mediante acidólisis con una solución de TFA/TIS/ H_2O (95:2.5:2.5) durante 2 h con agitación constante a T_{amb} . Luego, se rotaevapora con DCM, hasta retirar la mayor parte del ácido, sin llevarlo a sequedad. Posteriormente, se realizan precipitaciones sucesivas con Et_2O frío y se liofiliza el crudo peptídico diluido en una mezcla de H_2O/ACN (1:1).

1.3.6 Ensayos cualitativos utilizados en síntesis en fase sólida.

1.3.6.1 Ensayo cualitativo de Kaiser (Ensayo de ninhidrina).

Este ensayo se usa para la detección de aminas primarias en los péptidos, para esto se toma una alícuota de resina (0.5-2.0 mg) y se añaden 3 gotas de la disolución A, 1 gota de la disolución B y se calienta durante 3 min a $110^\circ C$.

Una coloración amarilla indica la ausencia de aminas primarias en la resina (ensayo negativo) mientras que un color azul indica la presencia de aminas primarias (ensayo positivo).

Disolución A: Mezcla de las disoluciones A1 y A2.

Disolución A1: 40 g de fenol en 10 mL de EtOH absoluto. Agitar 45 min con 4 g de resina Amberlite MB-3

Disolución A2: 65 mg de KCN en 100 mL de H_2O . 2 mL de la disolución resultante se diluye con 100 mL de piridina recién destilada sobre ninhidrina. Las disoluciones A1 y A2 se agitan por separado durante 45 min con 4 g de resina Amberlite MB-3, se filtran y

se mezclan.

Disolución B: 2.5 g de ninhidrina en 50 mL de EtOH absoluto. Esta disolución se debe conservar en un recipiente cerrado protegida del contacto con la luz.

1.3.6.2 Ensayo cualitativo de cloranilo.

El ensayo con cloranilo permite detectar aminas secundarias en los péptidos, para esto se toma una alícuota de resina (0.5-2.0 mg), se añaden 5 gotas de la disolución de cloranilo, 20 gotas de acetona y se deja reaccionar durante 5 min a temperatura ambiente. Una coloración amarilla indica la ausencia de aminas secundarias en la resina (ensayo negativo) mientras que una coloración azulada o verdosa indica la presencia de aminas secundarias (ensayo positivo).

1.3.7 Purificación de los péptidos.

Los crudos peptídicos se purificaron en RP-HPLC-ESMS semipreparativo, el cual está compuesto por un módulo Waters 600 controller integrado por dos bombas, un mezclador de alta presión, un módulo Waters Alliance 2767 sample manager con un inyector y colector de fracciones. Detector UV-visible Dual λ Absorbance Detector 2487 y un espectrofotómetro de masas Micromass ZQ.

Las columnas Sunfire™ Prep C₁₈ OBD™ (19x100mm, 5 μ M) y X-Bridge™ Prep BEH C₁₈ (19 x 100mm, 5 μ M) se utilizaron para purificar los péptidos, los cuales fueron eluidos mediante el uso de un sistema de gradiente lineal A/B que varió dependiendo del péptido a purificar, durante 15 minutos a un flujo de 25 mL/min. Se emplearon como fase móvil, la disolución A: H₂O/TFA (99.99:0,1, v/v) y la disolución B: H₂O/TFA (99.99:0,1, v/v). Las fracciones peptídicas se recogen de manera automática cuando las masas del péptido son detectadas por el equipo. Luego, las fracciones purificadas se liofilizan.

1.3.8 Caracterización de los péptidos.

Los péptidos se analizaron por RP-HPLC (fase reversa) y RP-HPLC-ESMS y MALDI-TOF (Matrix- Assisted Laser Desorption of Ions Time of Flight) para determinar la pureza y sus respectivas masas.

1.3.8.1 HPLC-MS Analítico.

El HPLC-MS analítico utilizado para monitorizar las reacciones y determinar la pureza de los compuestos a $\lambda = 220$ nm, consta de un cromatógrafo *Waters Alliance 2695* (integrado por dos bombas, un mezclador de alta presión y un auto inyector) con un detector UV-visible multicanal *Photodiode Array Detector 2996* y un módulo *Waters 2795 Separation Module* unido a un espectrómetro de masas *Micromass ZQ*, con sonda de electro spray (ES).

Las columnas utilizadas fueron XBridge™ C₁₈ (4.6 x 50 mm, 3.5 μ m) o XBrige™ BEH 130 C₁₈ (4.6 x 100 mm, 3.5 μ m) según la naturaleza de los compuestos.

La pureza de los compuestos fue determinada a una $\lambda = 220$ nm utilizando distintos gradientes lineales, especificados en cada caso, a un flujo de 1 mL/min.

1.3.8.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF.

Los espectros de masa se llevaron a cabo en la plataforma de proteómica del Instituto de Recerca Biomédica de Barcelona (IRB) con el equipo *MALDI Voyager DE RP time-of-flight (TOF)* con espectrómetro *Applied Biosystems, Framingham*.

La matriz que se empleó es una solución de 5 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (ACH) disuelto en H₂O: CH₃CN 1:1 con 0.1% de TFA.

La preparación de la muestra consiste en mezclar 1 μ L del péptido diluido con 1 μ L de matriz ACH, se pone sobre la placa, se deja secar y se analiza en el equipo.

Para registrar el espectro de masa, se utiliza 1 μ L de la mezcla resultante que se deposita sobre la placa de análisis. El análisis se realiza utilizando el modo lineal o réflex positivo a diferentes intensidades del láser en función del compuesto a analizar.

1.3.8.4 Caracterización de γ Péptidos.

CF-Gp-4

Pureza: 98%. t_R : 3.803

MALDI-TOF: $M_{teórica}$: 1657.96 Da para C₈₇H₁₁₂N₂₂O₁₂ M_{exp} : 1657.38 Da

ESI-MS: [M + 2H]⁺²: 830.2, [M + 3H]⁺³: 553.5, [M + 4H]⁺⁴: 415.4, [M + 5H]⁺⁵: 332.4, [M + 6H]⁺⁶: 277.2

CF-Gp-7

Pureza: 98 %. t_R : 5.110

MALDI-TOF: $M_{teórica}$: 1661.16 Da para C₉₆H₁₃₃N₁₃O₁₂⁶⁺ M_{exp} : 1659.09 Da

ESI-MS: [M + 2H]⁺²: 828.3, [M + 3H]⁺³: 552.5, [M + 4H]⁺⁴: 414.6, [M + 5H]⁺⁵: 331.9

CF-Gp-10

Pureza: 98 %. t_R : 3.654 min

MALDI-TOF: $M_{teórica}$: 1979.30 Da para C₉₃H₁₃₉N₃₁O₁₈ M_{exp} : [M + H⁺]: 1980.2543 Da, [M + Na⁺]: 2002.3394 Da

ESI-MS: [M + 2H]⁺²: 990.7, [M + 3H]⁺³: 660.8, [M + 4H]⁺⁴: 495.8

CF-Gp-11

Pureza: 98 %. t_R : 3.582 min

MALDI-TOF: $M_{teórica}$: 1810.98 Da para C₈₁H₁₁₅N₃₁O₁₈ M_{exp} : [M + H⁺]: 1811.4130 Da

ESI-MS: [M + 2H]⁺²: 906.4, [M + 3H]⁺³: 604.6

CF-Gp-12

Pureza: 98 %. t_R : 3.993 min

MALDI-TOF: $M_{teórica}$: 853.88 Da para C₄₁H₄₇N₁₁O₁₀ M_{exp} : [M + H⁺]: 854.5352 Da

ESI-MS: [M + 2H]⁺²: 427.8, [M + 3H]⁺³: 285.6

CF-Gp-13

Pureza: 98 %. t_R : 3.618 min

MALDI-TOF: $M_{teórica}$: 1332.43 Da para $C_{61}H_{81}N_{21}O_{14}$ M_{exp} : [M + H⁺]: 1332.8099 Da.

ESI-MS: [M + 2H]⁺²: 667.2, [M + 3H]⁺³: 445.1, [M + 4H]⁺⁴: 334.2

CF-Gp-14

Pureza: 97 %. t_R : 3.499 min

MALDI-TOF: $M_{teórica}$: 2289.53 Da para $C_{101}H_{149}N_{41}O_{22}$ M_{exp} : [M + H⁺]: 2289.3682 Da.ESI-

MS: [M + 3H]⁺³: 764.0, [M + 4H]⁺⁴: 573.2, [M + 5H]⁺⁵: 458.7, [M + 5H]⁺⁵: 382.4, [M + 6H]⁺⁶: 327.9

CF-Gp-15

Pureza: 98 %. t_R : 3.314 min

MALDI-TOF: $M_{teórica}$: 2768.07 Da para $C_{121}H_{183}N_{51}O_2$ M_{exp} : [M + H⁺]: 2767.5508 Da

ESI-MS: [M + 3H]⁺³: 923.4, [M + 4H]⁺⁴: 692.8, [M + 5H]⁺⁵: 554.4, [M + 5H]⁺⁵: 462.2, [M + 6H]⁺⁶: 396.3

1.3.8.5 Caracterización de péptidos naturales.

CF-RGV

Pureza: 98%. t_R : 4.756 min

MALDI-TOF: $M_{teórica}$: 3623.94 Da para $C_{162}H_{228}N_{44}O_{48}S_2$ M_{exp} : 3630.4429 Da

ESI-MS: [M + 2H]⁺²: 1208.8, [M + 3H]⁺³: 906.8, [M + 4H]⁺⁴: 725.6, [M + 5H]⁺⁵: 605.1.

CF-Tf-1

Pureza: 98%. t_R : 4.072 min

$M_{teórica}$: 1250.34 Da para $C_{62}H_{71}N_{15}O_{14}$; ESI-MS: [M + 1H]⁺¹: 1250.6, [M + 3H]⁺³: 625.9, [M + 4H]⁺⁴: 417.6, [M + 5H]⁺⁵: 313.5

CF-Tf-2

Pureza: 98%. t_R : 4.940 min

MALDI-TOF: $M_{teórica}$: 1848,04 Da para $C_{92}H_{110}N_{20}O_{20}S$ M_{exp} : 1847.8623 Da

ESI-MS: [M + 2H]⁺²: 924.8, [M + 3H]⁺³: 616.9

CF-Angiopep-2

Pureza: 98%. t_R : 4.552 min

MALDI-TOF: $M_{teórica}$: 2659.81 Da para $C_{125}H_{159}N_{29}O_{37}$ M_{exp} : 2659.4341 Da

[M + 2H]⁺²: 1330.7, [M + 3H]⁺³: 887.4, [M + 4H]⁺⁴: 665.8

CF-pAntp

Pureza: 98%. t_R : 4.246 min

$M_{teórica}$: 2604.04 Da para $C_{125}H_{179}N_{35}O_{25}S$; ESI-MS: [M + 2H]⁺²: 1302,8, [M + 3H]⁺³:868.9, [M + 4H]⁺⁴: 651.9, [M + 4H]⁺⁴: 521.7, [M + 5H]⁺⁵: 434.9, [M + 6H]⁺⁶: 372.9

CF-Tat

Pureza: 98%. t_R : 3.666 min

MALDI-TOF: $M_{teórica}$: 1917.14 Da para $C_{125}H_{179}N_{35}O_{25}S$ M_{exp} : 1917.8597 Da; ESI-MS: [M+2H]⁺²: 959,4 [M+3H]⁺³: 639.7, [M+4H]⁺⁴: 480.1, [M+4H]⁺⁴: 384.3, [M+5H]⁺⁵: 320.4

1.3.9 Síntesis de conjugados.

1.3.9.1 Conjugado Doxo-Gp-11.

La doxorubicina (**Doxo**) se conjugó al péptido (**Gp-11**) con el empleo de una metodología descrita por Eriste y cols.⁹⁴ con algunas modificaciones, en la que resultó necesario la preparación de los fragmentos correspondientes al péptido **Ac-Cys-Gp-11** y al fármaco modificado **Doxo-MCC**.

Síntesis de Ac-Cys-Gp-11.

A la secuencia peptídica protegida correspondiente a **Gp-11**, anclada al soporte sólido MBHA (ver ep. 4.3.1), se le adiciona la Fmoc-Cys(Trt)-OH a su extremo N-terminal (AA/OxymaPure/DIPCDI, 3:3:3 En DMF). Se desprotege el grupo Fmoc con Piperidina al 20% en DMF (3 x 10min) y se acetila el extremo N-terminal (Ac₂O/DIEA; 5:5 en DCM). Seguidamente, se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales (Boc y Trt) mediante el tratamiento correspondiente (TFA/TIS/H₂O/DTT/DCM, 50:2.5:2.5:1:44). Posteriormente se realiza la escisión de la resina mediante tratamiento con HF en presencia de *p*-cresol y *p*-tiocresol y el péptido obtenido se purificó mediante RP-HPLC-MS y presentó una pureza de 98%.

Síntesis de Doxo-SMCC.

La Doxo (2mg) se disuelve en 500µL de DMSO y luego se adicionan 500µL de PBS (pH 7.2). El pH se sube a 9 mediante adición de TEA y se añaden 200µL de SMCC (10mg/mL) con agitación constante, a Tamb y en ausencia de luz. El avance de la reacción se sigue por RP-HPLC-MS y transcurrida 1 h, se disminuye el pH a 5-6 (HCl 1M) para llevar a cabo la conjugación.

Conjugación entre Ac-Cys-Gp-11 y Doxo-MCC.

A la mezcla Doxo-MCC se le añaden 1.2 eq del Ac-Cys-Gp-11 y la reacción se agita durante 4 horas en ausencia de luz. El tiempo de reacción se determinó mediante RP-HPLC-MS. Inmediatamente se purifica la mezcla en RP-HPLC en un gradiente lineal de 0% a 40% B en A (A: H₂O/TFA, 99.95:0.045, v/v; B: ACN/TFA, 99.96:0.036, v/v) para obtener el conjugado

Caracterización de conjugado Doxo-Gp-11.

El conjugado se caracterizó mediante RP-HPLC-NanoESI (*nanoelectrospray*) con ionización positiva e inyección directa.

Rendimiento: 53%, pureza: 95%

Masas exactas: M_{teórica} 2359,14 para C₁₀₄H₁₅₄N₃₄O₂₈S M_{exp} [M + H]⁺ 2359.1435

1.3.9.2 Conjugado MT-BODIPY-Gp-11.

La síntesis del conjugado **MT-BODIPY-Gp-11** se baso en la metodología empleada por De la Torre 2014.⁹⁵ Para la síntesis de este conjugado resultó necesario la preparación del fragmento correspondiente al péptido **Cys(Npys)-Gp-11**.

El fármaco miltefosina modificado con la sonda fluorescente BODIPY (**MT-BODIPY**), este último fue preparado en el laboratorio del Dr. Luis Rivas (CSIC).

Síntesis de Cys(Npys)-Gp-11.

A la secuencia peptídica protegida correspondiente a **Gp-11**, anclada al soporte sólido MBHA (ver ep. 4.3.1), se le adiciona el aminoácido Boc-Cys(Npys)-OH a su extremo N-terminal (AA/ OxymaPure/DIPCDI, 3:3:3 en DMF). Se eliminan los grupos protectores Boc de las cadenas laterales y del amino terminal mediante el tratamiento correspondiente TFA al 40% en DCM, 50:2.5:2.5:1:44). Posteriormente se realiza la escisión de la resina mediante tratamiento con HF y el péptido obtenido se purifica mediante RP-HPLC-MS utilizando un gradiente lineal de 10% a 15% de la disolución B en A (A: H₂O/TFA, 99.9:0.1, v/v; B: ACN/TFA, 99.9:0.1, v/v). El producto obtenido presenta una pureza del 95%.

Conjugación entre Cys(Npys)-Gp-11 y MT-BODIPY.

El péptido **Cys(Npys)-Gp-11** (6,4mg) se disolvió en agua (1 mL) y se ajustó el pH a 5. Posteriormente se adicionó (1 eq) de una solución de 65 mM de este compuesto en metanol. La reacción se agitó continuamente a Tamb en ausencia de luz. La reacción se controló por RP-HPLC hasta la completa desaparición del péptido e inmediatamente se purificó mediante RP-HPLC en un gradiente lineal de 15% a 100% de la disolución B en A (A: H₂O/TFA, 99.95:0.045, v/v; B: ACN/TFA, 99.96:0.036, v/v).

Caracterización de conjugado MT-BODIPY-Gp-11.

El conjugado se caracterizó mediante RP-HPLC-NanoESI (*nanoelectrospray*) con ionización positiva e inyección directa.

Rendimiento: 62%, pureza: 95%

Masas exactas: $M_{teórica}$ 2168.172359 Da para C₉₂H₁₅₇BF₂N₃₅O₁₇PS₂ M_{exp} : [M + H]⁺ 2168.1736 Da

1.4 Ensayos biológicos.

1.4.1 Cultivo celular y modelo in vivo.

1.4.1.2 Cultivo de células HeLa.

La línea celular HeLa se utilizó para los ensayos de citotoxicidad, citometría de flujo y microscopía confocal. Estas células se crecieron como monocapas subconfluente en medio DMEM (1000 mg / mL glucosa) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal inactivado, 10% (v/v) de L-Glutamina (200 mM), 0.05% (v/v) de una solución de Penicilina (100.000 u/ mL) y estreptomycin (100 mg/mL). Una vez las células crecieron y alcanzaron la subconfluencia, fueron lavadas con PBS y desprendidas con 1 ml de una solución 0,25% tripsina-EDTA durante 5 min a temperatura ambiente. El desprendimiento celular se monitorizó mediante la observación en el microscopio. La suspensión celular fue centrifugada, se retiró el medio y las células se resuspendieron en medio nuevo y se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm² e incubadas en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ y temperatura constante a 37°C.

1.4.1.3 Cultivo primario de células MAEC.

Las células MAEC (*mouse aortic endothelial cells*) con las que se realizaron los ensayos de internalización se derivaron tras cultivo primario de aortas de ratones *knock out* (KO) para la enzima α -galactosidasa A ($\text{Gal1}^{\text{tmKul}}$)⁹⁶ siguiendo la metodología descrita por Shu y cols.⁹⁷ En resumen, secciones de la aorta descendente de ratones KO se cultivaron en placas tratadas con colágeno tipo I (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, Sigma) en medio RPMI (Lonza) con 20% de suero fetal bovino (Lonza), 20 mM de L-glutamina (Gibco), aminoácidos no esenciales (NEEA, Lonza), 0.05 mg/mL ECGS (Beckton Dickinson), 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hidrocortisona (Sigma), 0.1 mg/mL heparina (Sigma) y antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomycin y amfotericina B, Invitrogen). Una vez las células endoteliales hubieron formado una monocapa confluyente, se retiró el anillo aórtico y se cosecharon las células por tratamiento con 0.2 mg/mL de colagenasa (Sigma). Las células se mantuvieron en el mismo medio de crecimiento, al que progresivamente se le redujo el porcentaje de suero fetal hasta el 10%. El origen endotelial de los cultivos se confirmó por citometría de flujo mediante tinción con CD105-PE (eBioscience).

1.4.1.4 *Drosophila melanogaster*

Para los diferentes estudios se utilizaron las líneas de moscas *white*, *w¹¹¹⁸*, *w-iso*, *moddy* ($\Delta\text{C17moody Null}$), *moody-Gal4* (*moody Gal4CD8GFP*). Las dos primeras líneas de moscas se obtuvieron del laboratorio de Enrique Martín Blanco, Elena Rebollo y las mutantes *moody* fueron donadas por Bainton⁹⁸. Todas las moscas se cultivaron en medio de cultivo estándar para *Drosophila* enriquecido con suplemento de levadura y se mantuvieron a 25°C.

1.4.2 Internalización celular de los γ péptidos en células HeLa.

La citometría de flujo se utilizó para estudiar la internalización celular de los γ péptidos. Las células se sembraron en placas de 35 mm a una concentración 20.6×10^4 células y se dejaron crecer durante 24 h. Luego, las células se incubaron con los péptidos marcados con CF a una concentración final de 25 μ M durante 2 h o 24 h.

Una vez terminado el tiempo de incubación, las células se lavaron tres veces con PBS, luego se desprendieron de la placa con 300 μ L de una solución 0.25% tripsina-EDTA por 2 minutos, después se adicionó 500 μ L de medio de cultivo nuevo y se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante y el precipitado de células se resuspendió en 900 μ L de medio de cultivo nuevo.

Para asegurar la remoción de la fluorescencia proveniente de los péptidos que se encuentran unidos a la membrana plasmática, se ajustó el pH del medio a 6 con la adición de una solución HCl 1 N y bajo estas condiciones se realizó la lectura de fluorescencia en el citómetro de flujo FC-500. Este cambio de pH inactiva la emisión de la fluorescencia extracelular sin alterar el ambiente intracelular.⁴⁹

Se realizaron tres experimentos independientes con tres replicas, los resultados obtenidos fueron normalizados, teniendo en cuenta el valor de la autofluorescencia del medio, el cambio de pH y el control positivo, el péptido **CF-Tat**, se asignó el valor de referencia 100.

1.4.3 Localización intracelular de los γ péptidos en las células HeLa.

Las células se sembraron en placas IBIDI (München, Germany) de 3.5 cm a una concentración 15×10^4 células/cm² y se dejaron crecer durante 24 h. Luego, las células se incubaron con los péptidos marcados con carboxifluoresceína a una concentración de 20 μ M, el tiempo de incubación varió dependiendo de las especificaciones de la sonda fluorescente utilizada. Después, las células se lavaron tres veces con HBSS y se adicionó medio de cultivo nuevo libre de suero y sin rojo fenol. Luego estas células vivas fueron visualizadas por medio del microscopio láser confocal Leica TCS SP5. Los tres γ péptidos utilizados son los representantes de cada familia, teniendo en cuenta sus diferencias estructurales y la capacidad de atravesar la membrana celular

Las sondas fluorescentes se utilizaron para localizar una región estructural específica como citoesqueleto, mitocondria, retículo endoplasmático y aparato de Golgi.

Las sondas fluorescentes que se describen en la Tabla 8.

i) Cell Tracker

Después de la incubación de los péptidos por 2 h, las células fueron lavadas tres veces con HBSS, después se adicionó el Cell Tracker disuelto en medio libre de suero a una concentración final de 5 μ M y se incubó durante 30 min. Luego, se cambió esta solución por medio DMEM nuevo libre de suero a 37 °C y se incubó a esa misma temperatura

durante 30 min. Finalmente, se removió este medio de las células, se lavaron con HBSS y se reemplazó por medio de cultivo nuevo.

ii) MitoTracker

Después de la incubación de los péptidos por 2 h, las células fueron lavadas tres veces con HBSS, después se adicionó la solución de MitoTracker 1 mM en medio libre de suero a una concentración final de 100 nM y se incubó durante 15 min a 37 °C. Luego se retiró esta solución, se lavó tres veces con HBSS y se adicionó medio de cultivo nuevo libre de suero y rojo fenol.

iii) LysoTracker

La sonda fue disuelta en PBS y se adicionó a una concentración de 100 nM, se incubó junto a cada uno de los péptidos disueltos en medio de cultivo durante 2 h. Después, se cambió esta solución por medio nuevo. Luego se incubaron las células con la solución que contiene la sonda LysoTracker durante 30 min.

Sonda fluorescente	Especificidad
CellTracker™ Red (C34552, invitrogen)	CMPX Pasa a través de la membrana celular, pero una vez dentro de la célula, se transforma en un producto que es impermeable. Esta sonda contiene grupos bromometil o clorometil que reaccionan con los tioles, probablemente en una reacción mediada por la glutatión S-transferasa. Tinción citoplasmática relativamente uniforme.
LysoTracker™	Estas sondas se utilizan para marcar los organelos con pH interno ácido. Son altamente selectivas y efectivas en células vivas a una concentración nanomolar.
ER-Tracker™ (glibenclamide 587/615 (Invitrogen)	Red BODIPY TR) E34250 Sonda permeable a las células y altamente selectiva del retículo endoplasmático. Es un conjugado del fármaco glibenclamida (gluburida) – BODIPY. Este fármaco se une a los receptores sulfonilurea de los canales de K ⁺ dependientes de ATP, los cuales son prominentes en el retículo endoplasmático.
BODIPY TR 589/617 Invitrogen	Los análogos ceramida producen una coloración selectiva del aparato de Golgi.
MitoTracker™ (M22426)	Deep Red FM Esta sonda contiene grupos clorometil que reaccionan con los grupos tiol para marcar las mitocondrias. Este reactivo entra por difusión pasiva a través de la membrana plasmática y se acumula en la mitocondrias activas.

Tabla 8. Sondas fluorescentes utilizadas.

iv) ER-Tracker

Después de la incubación de los péptidos por 2 h, el medio de cultivo se removió de las placas, se lavaron tres veces las células con HBSS y se adicionó la sonda previamente disuelta en DMSO y medio de cultivo a una concentración final de 1 µM durante 30 min a

37 °C. Luego, se removió la solución de coloración y se reemplazó por medio DMEM nuevo.

v) *BODIPY TR-Ceramide*

Las células se lavaron con una solución de HBSS/HEPES después de la incubación con los péptidos. Luego, las células se incubaron a 4°C con una solución de ceramina 5 µM en HBSS/HEPES durante 30 min. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con medio frío y se incubaron con medio a 37°C durante 30 min.

Una vez se realizó cada protocolo, se procede a realizar la observación en el microscopio confocal espectral Leica TCS SP5 con el objetivo plan apocromático de inmersión en aceite 63x, A.N 1.4. Para la visualización de los péptidos marcados con CF se utilizó la longitud de onda de excitación de 488 nm del laser argón y su emisión se detectó en el rango de 515-530 nm. Para la visualización del MitoTracker se utilizó la longitud de onda de excitación de 633 nm y su emisión se detectó en el rango de 650-670 nm. Para la visualización de las otras sondas fluorescentes se utilizó la longitud de onda de excitación de 561nm y su detección se produce en el rango entre 590-610 nm.

En los experimentos de reconstrucción 3D, se utilizaron los siguientes parámetros para la adquisición de las imágenes, la velocidad fue de 700 Hz, se cerró el límite de difracción del microscopio, el tamaño del pixel utilizado fue de 90 x 90 x 340 nm (1024 x 256 x 40). En orden a evitar diafonía (crostalk) interferencias el registro de la fluorescencia fue realizado en modo secuencial.

Para los experimentos de colocación, las imágenes se registraron en un plano muestral único para evitar el movimiento de los péptidos a otros planos x, y, z. Para evitar interferencias, los márgenes de detección espectral fueron altamente restringidos. Para determinar la colocación de los péptidos se utilizaron dos coeficientes, Pearson y Manders, pues el primero es altamente sensible a la intensidad en cada canal, por eso se decidió también tener el segundo coeficiente que es independiente de la intensidad de los pixeles y divide en dos componentes en orden ha cancelar ese sesgo del número de objetos en cada canal.

Se utilizó el software Huygens para calcular el coeficiente de correlación de Pearson a través del algoritmo clásico de máxima verosimilitud utilizando un PSF (Point Spread Function) teórico automáticamente computarizado en función de los parámetros de la adquisición de las imágenes. También, se utilizó el software ImageJ con el plugins JACoP para calcular el coeficiente de Manders.

Por otra parte, se grabaron videos para visualizar las trayectorias de los péptidos y la unión a los lisosomas en las células HeLa, para ello se utilizó un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200M asociado al sistema Spinning Disk (Perkin Elmer Ultraview ERS). Los videos fueron grabados utilizando la cámara Hammamatsu (C9 100-50) 14 bits y un objetivo plan apocromático de inmersión en aceite 63x, A.N 1.4. Para la visualización de los péptidos marcados con CF se utilizó el láser de argón multilínea a una longitud de onda de excitación de 488 nm mientras que para el LysoTracker se utilizó la longitud de onda de excitación de 568 nm del láser de estado sólido bombeados por diodo (DPSS).

También se utilizaron espejos dicróicos para aumentar la detección. Para reducir la interferencia recíproca de los fluoróforos, la técnica de adquisición de la imagen fue en modo secuencial. La velocidad fue ajustada a 1.5 s/fotón. Las células fueron mantenidas a 37°C bajo atmósfera de CO₂ al 5%. Las imágenes fueron procesadas con el software confocal Leica , Image J.

1.4.4 Inhibición de la endocitosis de los γ péptidos en las células HeLa.

Las células se sembraron en placas de 35 mm a una concentración 20.6×10^4 células y se dejaron crecer durante 24 h. Después las células fueron tratadas con diferentes tipos de inhibidores de endocitosis tales como sacarosa hipertónica (0.25 M) y amilorida (2,5 mM), los cuales se adicionaron al medio de cultivo durante 30 minutos previo a la incubación con los péptidos marcados con CF. También, se probaron otros inhibidores, la clorpromazina (10 μ g/ml) y la filipina III (10 μ g/ml) pero se incubó 15 min antes de la incubación de los péptidos y para el caso del cloruro de amonio (10 mM), cloroquina (50 μ M) se incubó 15 minutos antes de adicionar los péptidos. Luego, las células se incubaron con los γ -péptidos durante 2 h y luego se hace la lectura en el citómetro de flujo como previamente se explicó.

1.4.5 Ensayos de internalización de los γ péptidos en células MAEC.

Los experimentos de internalización de los γ -péptidos en el cultivo primario de MAEC se realizaron como colaboración con el grupo de la Dra. Ibane Abasolo en el Hospital Vall d'Hebron.

Para los ensayos de internalización se utilizaron células MAEC en pase 3 ó 4, crecidas sobre cubres tratados con 0.1% de gelatina (Sigma). Los distintos péptidos marcados con FITC se incubaron durante 2 h a una concentración final de 20 μ M de péptido y 1 μ M de LysoTracker Red DND99 (Invitrogen). Tras lavarlas repetidas veces con PBS, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% antes de montarlas en medio de montaje Prolong (Invitrogen). La señal de fluorescencia se detectó mediante visualización en microscopio confocal (FV1000, Olympus).

1.4.6 Ensayos de internalización de *Leishmania donovani*.

Todos los experimentos de citometría de flujo, viabilidad celular y microscopía confocal de los cinco γ -péptidos sintetizados y los dos conjugados con fármacos (doxorubicina y miltefosina) frente a promastigotes de *Leishmania donovani* se realizaron como colaboración en el grupo del Dr. Luis Rivas en el CIB-CSIC (Madrid).

1.4.7 Cuantificación de los péptidos a inyectar en *Drosophila melanogaster*.

Con el objetivo de estandarizar la cantidad equivalente de cada conjugado fluorescente (**CF**, **Atto 488**, **Atto 565**) se realizaron tres rectas de calibración, utilizando nanodrop para determinar los valores de absorbancia (Figura 6, A, C, E). La absorbancia se mide a λ de 492, 504, 565 nm para la **CF** (Figura 6, B), **Atto 488** (Figura 6, D), **Atto 565** (Figura 6, F), respectivamente. La lectura se realiza por triplicado.

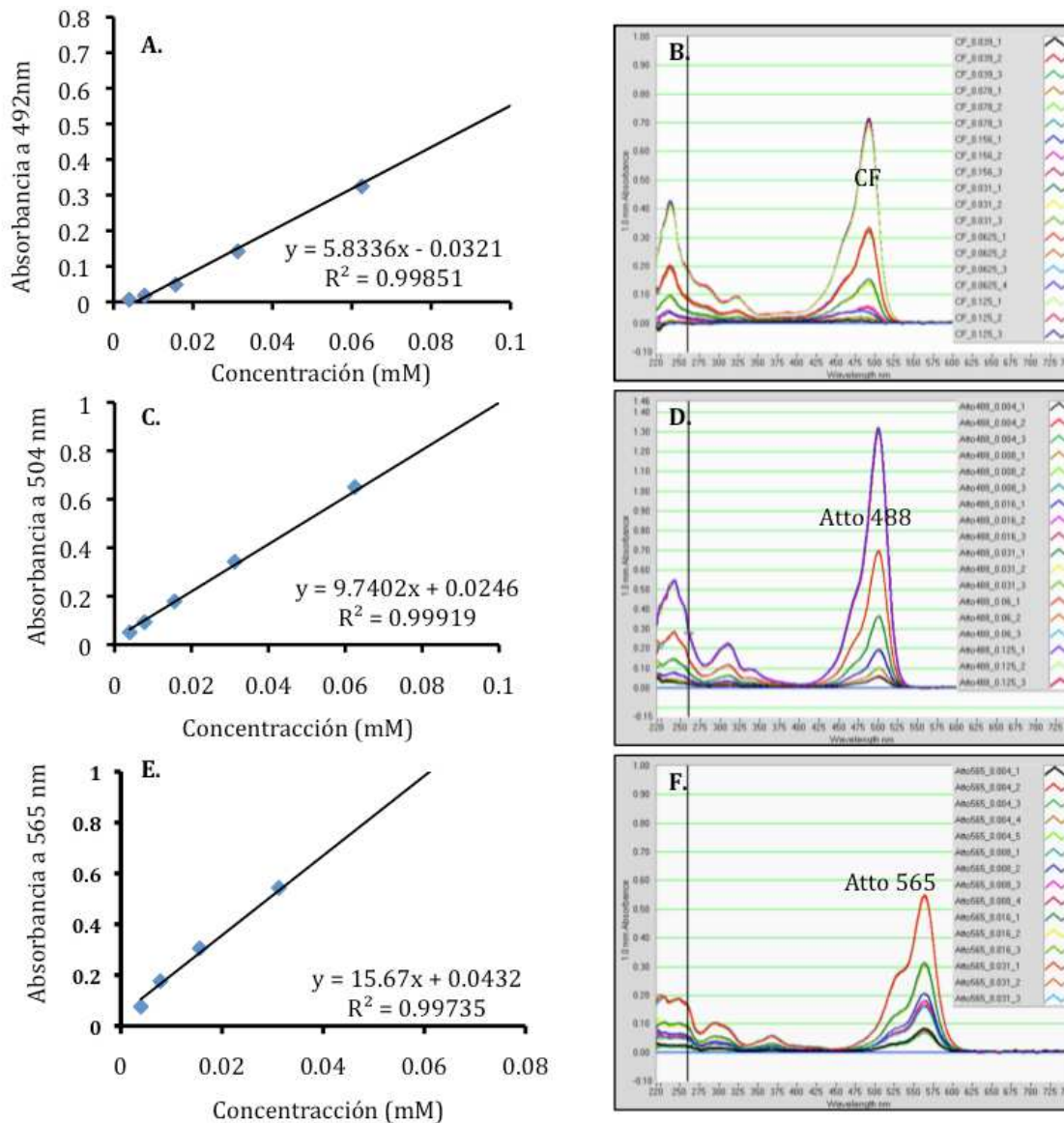


Figura 6. Recta de calibrado de la **CF** (A), **Atto 488** y (B) **Atto 565** (C) utilizada como sondas fluorescentes para conjugar a los péptidos.

Una cantidad exacta del péptido fluorescente se diluye en agua a una concentración de 1 mM y se determina su absorbancia a la λ correspondiente al fluoróforo conjugado al péptido. El valor obtenido se extrapola en la ecuación de la recta de calibrado correspondiente al fluoróforo, realizando los ajustes correspondientes para obtener una solución 0,7 mM para utilizar en los estudios.

1.4.8 Inyección de *Drosophila melanogaster* con los diferentes péptidos.

Los estudios se realizaron en 20 moscas hembras adultas de 5 días (*Drosophila melanogaster*, *w*¹¹¹⁸ o *w-iso* o *moody Null* o *moody-Gal4*). Todas se inyectaron con solución peptídica a 0,7 mM de concentración utilizando un microinyector manual (Minj-1), las agujas son realizadas a partir de microcapilares utilizando un puller que define la forma punteada y delgada de la aguja, el inocúlo a inyectar se calibra a 200 nL de muestra, con ayuda de una plantilla de puntos. Antes de cada inyección, las moscas son anestesiadas en una placa permeable a CO₂ y las inoculaciones se realizaron en los dos últimos segmentos de la región abdominal.

1.4.9 Microscopía de fluorescencia en *Drosophila melanogaster*

1.4.9.1 Epifluorescencia

Después de 2 horas de la inoculación, se observa la retina de cada mosca en una lupa fluorescente y se realizan fotos del cuerpo completo, así como de los dos ojos de cada mosca. La presencia de fluorescencia en las retinas de las moscas inoculadas con los diferentes péptidos, se compara con las moscas control que sólo fueron inoculadas con CF, utilizando este criterio para determinar si hubo penetración en la retina. También se registra el número de moscas que sobreviven después de la inyección con los péptidos.

1.4.9.2 Microscopía confocal de barrido de láser

El estudio se realiza en el microscopio confocal de barrido láser LSM 780, Carl Zeiss. Se escanean las retinas de moscas *moody* y *w-iso* inyectadas con los diferentes péptidos conjugados con CF o Atto 565, para obtener imágenes de planos ópticos de la retina con un alto contraste y alta resolución en los ejes X, Y y Z (512 x 512 x 104). La adquisición de las imágenes se realiza con las siguientes condiciones: apertura del pinhole 36,1 μm (1 AU), modo de escaneo Lambda, se utiliza el láser de argón a una λ de excitación de 488 nm, con una potencia del 25 % y 1 % para las moscas *w-iso* y *moody*, respectivamente. La ganancia del detector es de 720. Se utiliza el objetivo apocromático de inmersión en agua sin cubreobjetos 25x, A.N 0,8 (LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Korr DIC M27)

El modo lambda presenta un detector espectral con el que es posible utilizarlo para obtener el espectro real de emisión del fluorocromo (CF, Atto 488, Atto 565 nm) con el que se ha conjugado los péptidos. Por eso, lo primero que se realiza los espectros de emisión de CF, de la retina de moscas *w-iso* (autofluorescencia del ojo) y del Texas rojo-dextrano (Figura 7).

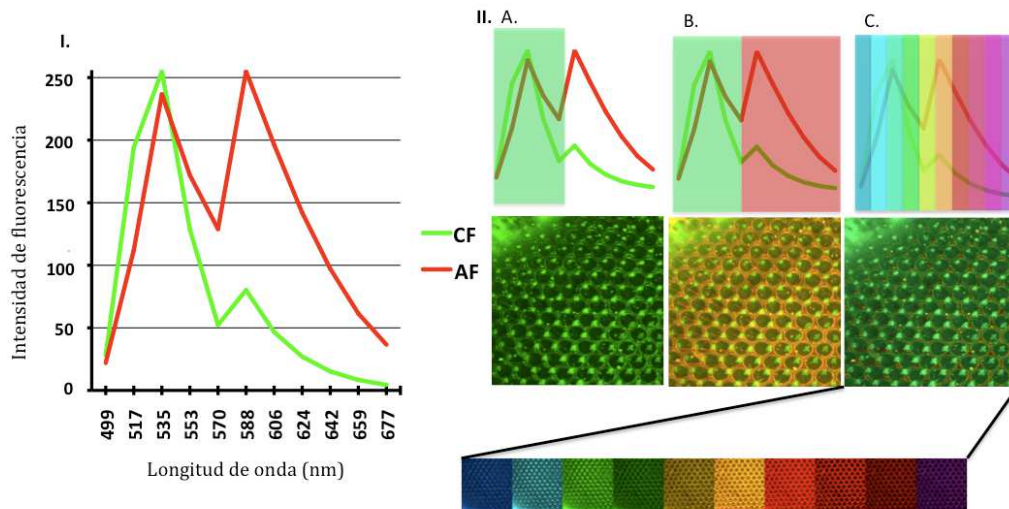


Figura 7. I. Espectro de emisión de la **CF** y la autofluorescencia de la retina. II. A. Fluorescencia retinal atribuida a la sumatoria del primer pico de la **CF** y de la autofluorescencia retinal. B. Fluorescencia retinal de la **CF** más la autofluorescencia total de la retina de la mosca. C. Separación de la fluorescencia en 10 colores a diferentes longitudes de onda.

Una vez se obtiene los perfiles de emisión de nuestro interés, se procede hacer la adquisición de imágenes espectrales con múltiples bandas de emisión en paralelo de las retinas de moscas inoculadas con los péptidos.

Mediante el uso del software de imágenes digitales ZEN, luego de realizar el análisis de imagen desmezcla lineal (linear unmixing) (Figura 7, parte II, A-C) se logra separar la autofluorescencia de la retina de la mosca, de la señal fluorescente del péptido conjugado a la **CF** (Figura 8).

Una vez obtenidas estas imágenes, se procesan por medio del software Velocity, determinando la intensidad de fluorescencia de un fragmento de la retina, que corresponde a una medición relativa de la sumatoria de todos los vóxeles correspondientes al péptido unido a la **CF** en un volúmen fijo de $496325,78 \mu\text{m}^3$.

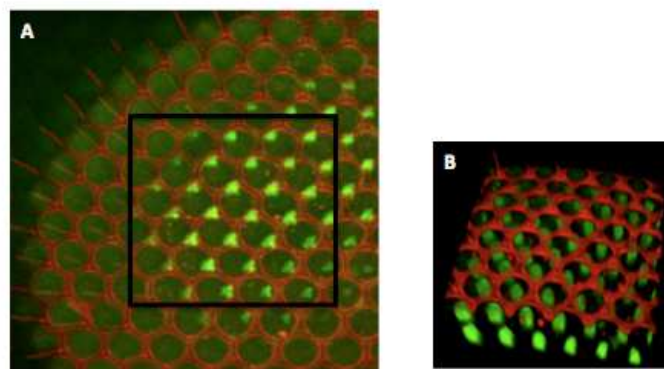


Figura 8. Proyección XY de la Retina de moscas *w-iso* inyectada con el péptido **CF-Gp-11**. B. fragmento de la retina en 3D que se utilizó para cuantificar la intensidad de la fluorescencia.

Adicionalmente, se realiza la disección del cerebro de una mosca *moody-Gal4* inyectada con el γ -péptido **Atto 565-Gp-11** en un soporte que permite inmovilizar el cuerpo de la mosca, se sujeta la cabeza con una pinza y luego, se remueve la proboscide. Una vez se desprende la cabeza, se pasa a una placa con una gota de agua y se intenta retirar las traqueas. Luego, el cerebro se impregna con fibrinógeno diluido en medio de cultivo Schneider para inmovilizarlo y luego se adiciona 1 μ L coagulante. El lóbulo óptico presente en el cerebro disectado, se analiza en el microscopio confocal de barrido de láser.

1.4.9 Análisis Estadístico

Los datos son expresados como promedios y las barras indican las desviaciones estándar. Estos valores fueron calculados de tres experimentos independientes, cada uno con tres replicas. La comparación de las medias entre el control y los péptidos probados fueron realizados a través de la prueba Tukey utilizando un nivel de significancia de $p < 0.05$ (*) y 0.01 (**). Este análisis se realizó con el software Stata.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1. Estudio de la capacidad de entrada celular de γ -péptidos basados en *cis*- γ -amino-L-prolina

Contribuciones a este capítulo: El Dr. Daniel Carbajo, participó en la síntesis de algunos de los γ -péptidos que se utilizan en este capítulo, así como en algunos ensayos biológicos. La Dra. Elena Rebollo (Unidad de Microscopía de Fluorescencia avanzada, IBMB-PCB) asesoró todo lo concerniente a microscopía confocal de los experimentos con células HeLa. Los ensayos en células MAEC se realizaron en el grupo de la Dra. Abasolo en el Hospital de Vall d'Hebron

1.1 Introducción

1.1.2 Mecanismos de internalización celular de los CPPs.

A pesar de la gran cantidad de estudios realizados acerca de los mecanismos de internalización celular de los CPPs, las vías a través de las cuales estos compuestos atraviesan las barreras biológicas no han sido totalmente esclarecidas.^{2,42,40,99} Esto puede atribuirse en muchos casos a las propiedades peptídicas, como la carga y la longitud de las secuencias. Además, los CPPs pueden interactuar con múltiples moléculas de la superficie celular, incluyendo lípidos, así como proteoglicanos asociados a la membrana.^{100,101} Resultados experimentales, evidencian que los CPPs pueden internalizarse por dos diferentes vías como la translocación directa a través de la bicapa celular de la membrana (Figura 9, Tabla 9) y la vía endocítica (Figura 10). Adicionalmente, varios estudios evidencian que los CPPs pueden emplear mecanismos de entrada alternativos, los cuales podrían operar al mismo tiempo que las vías principales, dependiendo de las condiciones experimentales utilizadas.^{22,41,102}

1.1.2.1 Requerimientos estructurales para la internalización de los CPPs.

Las interacciones electrostáticas de los CPPs básicos con la matriz extracelular, específicamente con los proteoglicanos y fosfolípidos cargados negativamente que se encuentran en la membrana celular, se reconoce como la primera etapa de entrada a la célula de estos compuestos.^{42,103-107} Estas interacciones promueven la aglomeración de los proteoglicanos en la superficie y que se produzca la activación de señales intracelulares, la remodelación de actina y finalmente, ocurra la entrada celular por las diferentes vías de internalización. Para los CPPs anfipáticos, la unión a la membrana, así como la inserción, promueven la entrada de estos péptidos vía endocítica o translocación directa.⁵⁴ Las interacciones de los péptidos con diferentes componentes de la membrana celular pueden ser de naturaleza electrostática o hidrofóbica y dependen en gran parte, de factores como el número y la densidad de cargas positivas, los puentes de hidrógeno, el tamaño, la estructura secundaria de los péptidos y sus polimorfismos, el tipo de célula y la composición de la membrana celular.^{41,42,108,109}

Los estudios de estructura-actividad de los CPPs muestran que los residuos catiónicos juegan un papel fundamental en la internalización de estos compuestos. Además, estos estudios indicaron que los residuos de arginina son más efectivos que los residuos de lisina en dicho proceso.^{29,110,111} Esto se debe a que los grupos guanidínicos son capaces de formar puentes de hidrógeno bidentados con los grupos fosfato, sulfato y carboxilato cargados negativamente presentes en la superficie celular, en comparación con el catión amonio presente en la cadena lateral de los residuos de lisina, que solo forman un puente de hidrógeno.¹¹²

Luego de esta primera etapa, ocurre la translocación directa o la endocitosis del péptido. Los estudios iniciales en este campo, mostraron que la internalización de los CPPs ocurrían a temperaturas bajas, soportando la idea de que el mecanismo de internalización principal de estos péptidos es independiente de energía, por lo que

posteriormente se han propuesto varios modelos que explican la translocación directa de estos compuestos.⁴⁰

1.1.2.2 Translocación directa de los CPPs.

La translocación directa es una vía de entrada celular independiente de energía, que involucra la desestabilización transitoria de la membrana e incluye diferentes modelos con características específicas (Figura 9, Tabla 9). Generalmente, este mecanismo es más probable que ocurra a concentraciones altas de los CPPs.⁹⁹

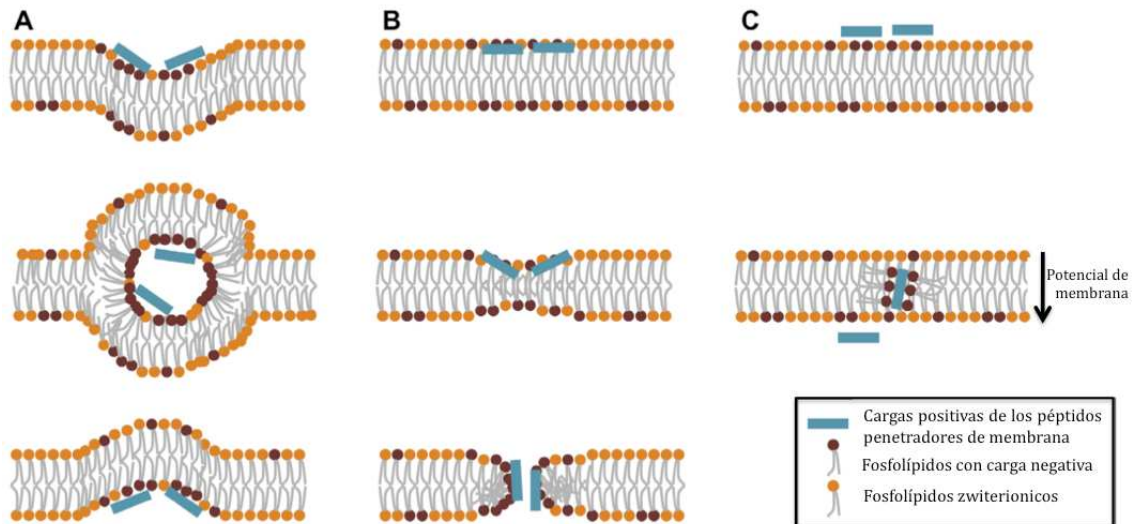


Figura 9. Algunos mecanismos específicos de translocación directa de los CPPs. A. Formación de micela invertida, B. Formación de poro, C. Translocación adaptativa.⁴²

En los mecanismos de translocación directa estudiados, no hay evidencia de daños de la barrera celular aún a concentraciones altas del CPP. Esto podría deberse a la respuesta de reparación de la membrana (*Membrane repair response*, MRR) que es capaz de formar vesículas en segundos para reparar las rupturas generadas durante la entrada del péptido. Estos mecanismos favorecen la entrada de los CPPs a la célula, así como su permanencia en el citosol o el núcleo. En los procesos de distribución de fármacos, las moléculas que entran a la célula por esta vía, pueden evitar ser endocitadas.⁵³

Más tarde, se demostró que esta aparente translocación directa de los CPPs a través de la membrana celular y la acumulación en compartimentos celulares, se debía a la creación de artefactos durante la fijación celular más que a los procesos de internalización celular independientes de energía y los receptores. Debido a esto, se realizó una re-evaluación de los mecanismos involucrados en la internalización de los CPPs.^{40,113} Los resultados de estos estudios realizados con células vivas, aportaron evidencias de que además de los mecanismos independientes de energía como la translocación directa, los mecanismos endocíticos juegan un rol determinante en la internalización celular.⁴⁰

Mecanismos de translocación directa	Características	Ejemplos
Formación de micela invertida (Figura 9, A)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Interacción de residuos básicos con los fosfolípidos con carga negativa en la membrana plasmática. 2. Interacción de residuos hidrofóbicos con el centro de la membrana plasmática. 3. Desestabilización de la membrana y formación de la invaginación. 4. Reorganización de los lípidos vecinos y formación de la micela invertida, la cual encapsula el péptido en su interior. 5. Alteración de la membrana y liberación del péptido al interior de la célula. 	Penetratina ^{4,11}
Formación de poro (Figura 9, B)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Interacción entre cadenas positivas y grupos fosfato que conduce a la acumulación de los péptidos en la parte externa de la membrana. 2. Afinamiento de la bicapa, la atracción entre cadenas laterales de la arginina y lisina con los grupos de la capa distal, formando un poro transitorio a través del cual ocurre la difusión del péptido. 	Tat ¹¹⁵ , péptidos ricos en arginina, Transportan ¹¹⁶
Traslocación adaptativa (Figura 9, C)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Interacción entre los grupos guanidínios de los péptidos y los grupos fosfatos de la membrana celular, a través de la formación de puentes de hidrógeno. De esta manera, se enmascara la carga del péptido, por lo que se atenúa la polaridad y ocurre la difusión adaptativa a través de la membrana. El potencial de la membrana plasmática promueve la difusión. 	Péptidos ricos en grupos guanidínios ^{110,112}
Permeabilización semejante a la electroporación.	<ol style="list-style-type: none"> 1. La distribución asimétrica de la carga entre el compartimento externo produce una tensión eléctrica transmembranal. Esto produce la permeabilización de la membrana, creando defectos transitorios que permiten la distribución del péptido. 	Penetratina ¹¹⁷
Penetración por medio de microdominios o zonas de nucleación	<ol style="list-style-type: none"> 1. Las regiones entre los diferentes dominios presentes en la membrana con defectos en su empaquetado, son susceptibles a la entrada de los CPPs o actúan como sitios de nucleación para la formación de poro. 	Péptidos ricos en arginina (R9) ⁵⁴

Tabla 9. Mecanismos específicos de translocación directa de los CPPs.⁴²

1.1.2.3 Endocitosis de los CPPs.

Estudios recientes han demostrado que los CPPs atraviesan las barreras biológicas mediante endocitosis, aunque la mayoría de las moléculas que internalizan en las células prefieren el mecanismo de translocación directa.²⁵ CPPs como el **Tat**, la penetratina y aquellos ricos en arginina, entran a la célula por procesos endocíticos dependientes de energía.^{104,118,119,120,121}

La endocitosis consta de dos pasos: la entrada endocítica y el escape endosomal; además, es un proceso natural que permite la entrada celular de diferentes tipos de moléculas, las cuales son transportadas a través de vesículas generadas por la membrana celular.^{108,113} Este proceso es fundamental en el desarrollo de la respuesta inmune, la neurotransmisión, la comunicación intercelular, la transducción de señales y la homeostasis del organismo.¹²²

La entrada de los CPPs a la célula vía endocítica puede ocurrir a través de tres mecanismos, principalmente (Figura 10): la macropinocitosis,^{104,123,124} la endocitosis mediada por clatrina (EMCl)^{104,125} y la endocitosis mediada por caveola (EMCa).^{122,126,127}

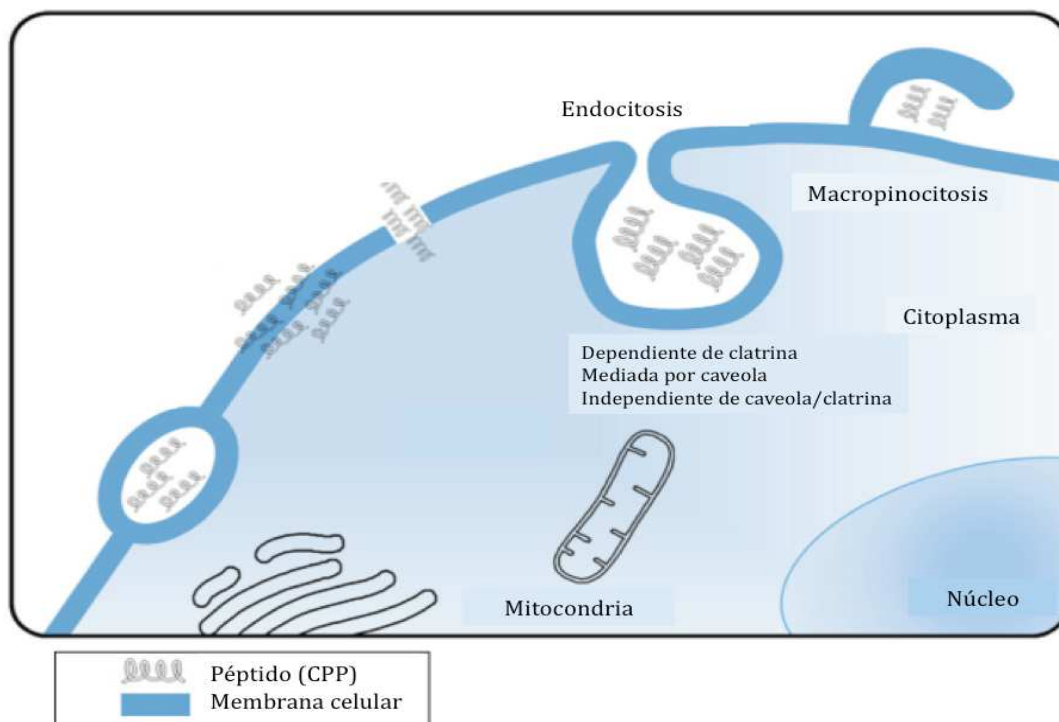


Figura 10. Mecanismos endocíticos de los CPPs.²⁵

Factores como la presencia de una molécula a transportar por el CPP y el tipo de tejidos o células utilizadas, pueden definir los mecanismos de entrada a la célula. Estudios realizados bajo diferentes condiciones, utilizando el péptido **Tat** como CPP, mostraron que este péptido fue capaz de atravesar la membrana celular mediante endocitosis mediada por clatrina,¹²⁵ endocitosis mediada por caveola,¹²⁶ macropinocitosis o la combinación entre ellas.¹²¹

i) Macropinocitosis de los CPPs.

La macropinocitosis (Figura 10) involucra la remodelación de grandes extensiones de la membrana plasmática a través de cambios en el citoesqueleto de actina, lo que culmina con la internalización de fluido en grandes vacuolas mayores de 1 μm , que se denominan micropinosomas.¹²⁸ Este mecanismo ha sido propuesto para explicar la entrada a la célula de algunos CPPs.^{129,130} Se ha demostrado que está implicado en la entrada de poliargininas y también en la internalización de penetratina, aunque este último CPP en menor proporción.⁴² Kaplan y cols.¹²⁹ mostraron que el péptido **Tat** fusionado a proteínas (30 000 Da) y el péptido Tat (1000-5000 Da), entran a la célula mediante este mecanismo. Los péptidos catiónicos derivados del dominio de transducción proteica, requieren una carga neta específica para iniciar la macropinocitosis, aunque los detalles del mecanismo no han sido elucidados hasta la fecha.¹²⁹

ii) Endocitosis mediada por clatrina (EMCI) de los CPPs.

La EMCI involucra la concentración de receptores transmembranales con alta afinidad y su unión a ligandos en las invaginaciones recubiertas de clatrina en la membrana plasmática. Estas invaginaciones forman las vesículas, que son encapsuladas por una cubierta de clatrina y transportan los complejos ligando-receptor al interior de la célula (Figura 10). La clatrina es una proteína oligomérica que está formada por tres cadenas pesadas y tres ligeras que forman trisqueliones, los cuales se ensamblan como una red poliédrica en la cara citoplásmica de la membrana. Esta vía está implicada en la entrada continua de nutrientes esenciales (hierro y colesterol), la comunicación intracelular, la homeostasis celular, etc.¹²²

El mecanismo EMCI está implicado en la entrada a la célula del **Tat** y de la penetratina y otros CPPs, asociado al efecto de inhibición en medios hiperosmolares.^{42,131} Richard y cols.¹²⁵ encontraron que la entrada de **Tat** a diferentes células primarias es dependiente de la temperatura y del trifosfato de adenosina (ATP), indicando la vía endocítica como mecanismo de entrada a la célula. Estudios de los efectos de inhibidores específicos, determinaron que el **Tat** no conjugado entra fundamentalmente por EMCI y que el mecanismo EMCa no interviene en la internalización. Estudios llevados a cabo utilizando liposomas y liposomas funcionalizados con **Tat**, mostraron que estos conjugados entran al citoplasma principalmente mediante endocitosis mediada por clatrina dependiente de colesterol.¹³²

iii) Endocitosis mediada por caveola y/o lípidos (EMCa).

La caveola está constituida por microdominios ricos en colesterol, esfingolípidos de la membrana plasmática¹²² y está directamente implicada en una de las vías de endocitosis. Los ligandos previamente asociados a la membrana celular son atrapados por la caveola, la cual forma vesículas que internalizan el ligando y se conocen como caveosomas (Figura 10).¹³⁰ Por otra parte, este mecanismo mediado por lípidos, se basa en un microdominio de la membrana plasmática, cuya fluidez es mucho menor a la de su entorno y como la anterior, estos microdominios se encuentran enriquecidos en colesterol, fosfolípidos saturados y proteínas de membrana.

Los complejos rodamina-**Tat** y GFP-**Tat** (GFP, *Green fluorescen protein*) colocalizan con la toxina del cólera, la cual se reconoce como una entidad que penetra a la célula por esta vía.^{126,127} Los CPPs anfipáticos ricos en prolina, se internalizaron vía caveola o mediada por lípidos, por lo que evitan la ruta degradativa, constituyendo una ventaja para la distribución intracelular de ligandos sensibles frente a proteasas y nucleasas.⁶⁹

La distinción entre los mecanismos endocíticos involucrados en la distribución de diferentes entidades en la célula, ha sido posible por el empleo de inhibidores químicos de endocitosis y la detección de la colocalización de los péptidos con marcadores.

1.1.3 Técnicas utilizadas en la determinación de la distribución de los CPPs en las células y de los mecanismos de internalización.

Los mecanismos de internalización, así como la distribución y la cuantificación de los CPPs en las células, han sido estudiados utilizando varios métodos biológicos y biofísicos. Cada método presenta debilidades, por lo que la utilización de la combinación de varias metodologías, aporta un mejor entendimiento de los procesos relacionados con la translocación de los CPPs.⁴²

1.1.3.1 Protocolos basados en fluorescencia.

Los protocolos basados en fluorescencia son los más utilizados en este campo. Los péptidos se conjugan a fluoróforos y se lleva a cabo la cuantificación indirecta mediante la determinación de la fluorescencia (fluorimetría) de las células tratadas, mientras la microscopía confocal permite localizar el CPP en las células vivas.⁴²

La entrada de los péptidos, no siempre se correlaciona con su biodisponibilidad, por eso hay que tener cuidado en la interpretación de los resultados. Además, los CPPs catiónicos se pueden unir a la parte externa de la membrana celular y generar falsos positivos, debido a que los análisis de fluorescencia no distinguen entre el CPP internalizado y aquel que se mantiene unido a la superficie de la membrana. Para solucionar este problema, se han utilizado protocolos que tienen la finalidad de reducir la señal fluorescente de los CPPs en la superficie celular, utilizando tripsina para remover el CPP presente en la superficie de la membrana y de esta manera extinguir la fluorescencia de los fluoróforos de la superficie.^{42,99,113}

Otro método utilizado para cuantificar la entrada de los CPPs marcados con un fluoróforo, es la clasificación de células asistida por fluorescencia (*Fluorescence-assisted cell sorting*, FACS), empleando un citómetro que determina la intensidad de la fluorescencia y mide la cantidad de células que contienen el CPP. Sin embargo, esta técnica tampoco discrimina entre la fluorescencia translocada y la superficial, por lo que se utiliza en combinación con las técnicas antes mencionadas.⁹⁹

Por otra parte, los experimentos de microscopía confocal con células vivas son capaces de monitorear la localización intracelular de los CPPs o de las moléculas que ellos transportan, en el interior de la célula. Con este método se podría discriminar entre los péptidos internalizados y el que se encuentra en la superficie extracelular. Las limitaciones de esta técnica se asocian con los problemas estadísticos (debido al número pequeño de células monitoreadas), costos y la experiencia necesaria para llevar a cabo estos experimentos.⁹⁹ Teniendo en cuenta las imágenes generadas utilizando esta técnica, se ha propuesto que la coloración punteada observada en las células se debe a endocitosis y que la coloración citosólica difusa está relacionada con la entrada no endosomal. Otros estudios sugieren que la coloración citosólica difusa no puede ser debida solamente al escape de los endosomas sino que esta ocurre más rápidamente que la fluorescencia endosomal punteada.^{110,133}

1.1.3.2 Métodos para estudiar los mecanismos moleculares de entrada celular: inhibidores químicos de endocitosis.

Existen diferentes métodos experimentales para investigar cualitativamente el mecanismo de entrada celular, basados en la inhibición de una o más vías de entrada. Otro de los métodos para determinar el mecanismo, inhibe todas las vías dependientes de energía al incubar las células con el péptido a 4°C y de esta manera, conocer su implicación o no en procesos endocíticos.⁹⁹

Como mencionamos anteriormente, los inhibidores específicos de endocitosis se utilizan con frecuencia para determinar el mecanismo de entrada de los CPPs (Tabla 10).

Mecanismo inhibido	Inhibidor	Función
Mediada por clatrina (EMCl)	Clorpromazina	Previene el reciclaje de la clatrina Impide el ensamblaje de la proteína adaptadora 2 y la clatrina, lo cual es necesario para formación de las vesículas recubiertas de clatrina.
	Solución hipertónica de sacarosa Wortmanina	Previene el ensamblaje de la malla de clatrina Inhibidor de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI-3K)
Mediada por caveola (EMCa)	Filipina III Ciclodextrina Nistatina	Secuestra el colesterol de la membrana plasmática.
Macropinocitosis	Amiloride	Inhibe intercambiadores Na ⁺ /H ⁺ .
	Citocalasina D Wortmanina	Inhibe la elongación de la actina F. Inhibidor de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI-3K).
Otros	Maleimida	Bloquea los grupos tiol de la membrana plasmática
	NH ₄ Cl Cloroquina	Inhibidor de la acidificación de las vesículas endocíticas. Bases débiles que incrementan el pH de los organelos que normalmente poseen pH ácido incluyendo las vesículas endocíticas, lisosomas.
	Nocodazole	Agente que causa la despolimerización de los microtúbulos.
	Colchicina	Disgrega los microtúbulos, inhibidor mitótico.
	Taxol	Inhibidor mitótico.

Tabla 10. Inhibidores químicos de endocitosis.

Los inhibidores químicos de endocitosis son entidades con mecanismos endocíticos de entrada celular conocidos. Estos métodos pueden presentar efectos secundarios como la baja especificidad, elevada dependencia de las líneas celulares utilizadas y en ocasiones, disminución de la viabilidad celular. La inhibición de una vía puede inducir la entrada a través de otro mecanismo, que en condiciones normales es inactivo, por lo que los resultados obtenidos deben ser interpretados con cuidado.^{134,135}

Adicionalmente, otros estudios de mecanismos de entrada se basan en la colocalización (microscopía confocal) con marcadores endocíticos, como por ejemplo el LysoTracker red, que es un compuesto que emite luz roja en condiciones ácidas y se puede utilizar para colocalizar los CPPs con los lisosomas.⁹⁹ Otros compuestos que se utilizan con esta finalidad incluyen la transferrina, la toxina del cólera, la rodamina-dextrano, entre otros.¹¹⁰

La colocalización representa la co-compartimentación de moléculas específicas, lo cual significa que existe superposición espacial entre estas moléculas. La existencia de este solapamiento, puede ser simplemente determinada mediante la inspección visual de la combinación de canales o por medio de la cuantificación de colocalización a través de un coeficiente.¹³⁶

La cuantificación de colocalización entre dos canales fluorescentes se puede realizar a través de:

1. Co-ocurrencia: método que considera la presencia de ambos fluoróforos en píxeles individuales. La co-ocurrencia de fluoróforos refleja similitudes físico-químicas entre dos moléculas fluorescentes. Este parámetro puede ser cuantificado mediante la expresión del número de píxeles solapados como una fracción del número total, o utilizando los coeficientes de Manders, que separan cada fluoróforo, para registrar la fluorescencia total que co-ocurre.¹³⁷
2. Correlación: método que examina la relación entre intensidades de fluorescencia. La correlación refleja una interacción molecular directa o indirecta, con otra molécula o con un subdominio de un compartimento celular. Una correlación entre dos fluoróforos probablemente podría tener más significancia biológica que la co-ocurrencia, aunque cualquier cambio en la colocalización puede estar relacionado con las condiciones experimentales utilizadas. La cuantificación se realiza utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.¹³⁷

Como mencionamos anteriormente, los coeficientes de Manders y el coeficiente de correlación de Pearson (CCP) se utilizan para cuantificar el grado de colocalización. Ambos presentan ventajas y desventajas (Tabla 11). Los valores de colocalización que se pueden obtener varían según el coeficiente. Para los coeficientes de Manders (M1 y M2), el rango de valores es 0-1, mientras que el coeficiente de correlación de Pearson es -1-+1.

Coefficiente de Pearson	Coefficientes de Manders
Describe como se relacionan el canal verde y el canal rojo por medio de una ecuación lineal.	Buen indicador de la proporción de la señal verde que coincide con la señal roja, en relación a su intensidad total, independiente de que las intensidades de las dos señales sean distintas entre sí.
Ventajas: No depende del fondo y es independiente del brillo de la imagen.	Ventajas: No es sensible a la intensidad de píxeles solapados y es más fácil de interpretar que el coeficiente de Pearson.
Desventajas: Sensible a las diferencias de intensidad. Pobre discriminación entre colocación parcial y exclusión, sobretodo en presencia de ruido. Sensible a la distribución heterogénea de la colocación en distintas zonas de la muestra. No es fácil de interpretar. Los valores negativos son difíciles de interpretar cuando el grado de solapamiento es una cantidad a medir.	Desventajas: Sensible al fondo, este debe de llevarse a 0. No distingue entre colocación parcial o completa.

Tabla 11. Ventajas y desventajas de los coeficientes de Manders y el coeficiente de correlación de Pearson.^{137,138}

La bibliografía consultada, evidencia la importancia que en los últimos años ha adquirido la búsqueda de CPPs, para su utilización en conjugados de importancia terapéutica frente a diferentes blancos moleculares. Una gran parte de las investigaciones realizadas, se han enfocado en la búsqueda de nuevos CPPs de carácter anfipático, enriquecidos en prolina, obtenidos a partir tanto del aminoácido natural como de prolinas miméticas, los cuales han mostrado atractivas propiedades. A pesar de todo el trabajo realizado, continúa el constante desarrollo de metodologías que permitan tanto la cuantificación como la determinación de los mecanismos de entrada a la célula de estos compuestos, utilizando diferentes líneas celulares. Este capítulo, tiene como objetivo general el estudio de la capacidad de entrada en células HeLa de una pequeña biblioteca de γ -péptidos, así como la determinación de los mecanismos de entrada de estos compuestos bajo nuestras condiciones experimentales.

Objetivos

- Evaluar la capacidad de nueve péptidos miméticos (γ -péptidos) de atravesar la membrana citoplasmática de células HeLa durante 2 y 24 h mediante citometría de flujo.
- Estudiar la distribución y localización intracelular de tres γ -péptidos representativos de la familia, incubados con células HeLa vivas y no fijadas y en presencia de marcadores específicos para diferentes organelos, mediante microscopía confocal.
- Evaluar el efecto de inhibidores de endocitosis en la entrada de estos tres γ -péptidos a través la membrana citoplasmática de las células HeLa durante 2 y 24 h mediante citometría de flujo.
- Evaluar la capacidad de entrada de los tres γ -péptidos en células MAEC (cultivo primario) mediante microscopía confocal.

1.2 Resultados.

Desde hace algunos años, nuestro grupo de investigación trabaja en el diseño y la síntesis de γ -péptidos como CPPs. Con anterioridad, una biblioteca de 106 γ -péptidos fue diseñada, sintetizada y estos compuestos se evaluaron como potenciales CPPs frente a diferentes líneas celulares mostrando resultados promisorios.⁵⁰ Como continuidad de la temática, se seleccionó una pequeña quimioteca de 11 compuestos (Tabla 12) y se profundizó en el estudio de los mecanismos de entrada de tres de estos γ -péptidos (**CF-Gp-4**, **CF-Gp-7** y **CF-Gp-10**), previamente sintetizados y seleccionados, en base a los resultados preliminares alcanzados.

1.2.1 Capacidad de atravesar la membrana celular de nueve γ -péptidos en células HeLa.

Se estudió la capacidad de atravesar la membrana celular en células HeLa de 9 γ -péptidos, seleccionados previamente en estudios anteriores.⁵⁰ Para ello se utilizaron péptidos que tenían carboxifluoresceína (CF) en el extremo N-terminal (**CF-Gp-1**, **CF-Gp-2**, **CF-Gp-4**, **CF-Gp-5**, **CF-Gp-6**, **CF-Gp-7**, **CF-Gp-8**, **CF-Gp-10**, **CF-Gp-11**) y se incubaron con las células durante 2 y 24 h. Transcurrido este tiempo se determinó la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo (Figura 11). Se utilizó como control positivo el péptido **CF-Tat** (49-57) (CF-RKKRRQRNR-NH₂) derivado del transactivador de la transcripción del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Todos los experimentos se realizaron por triplicado (Figura 11).

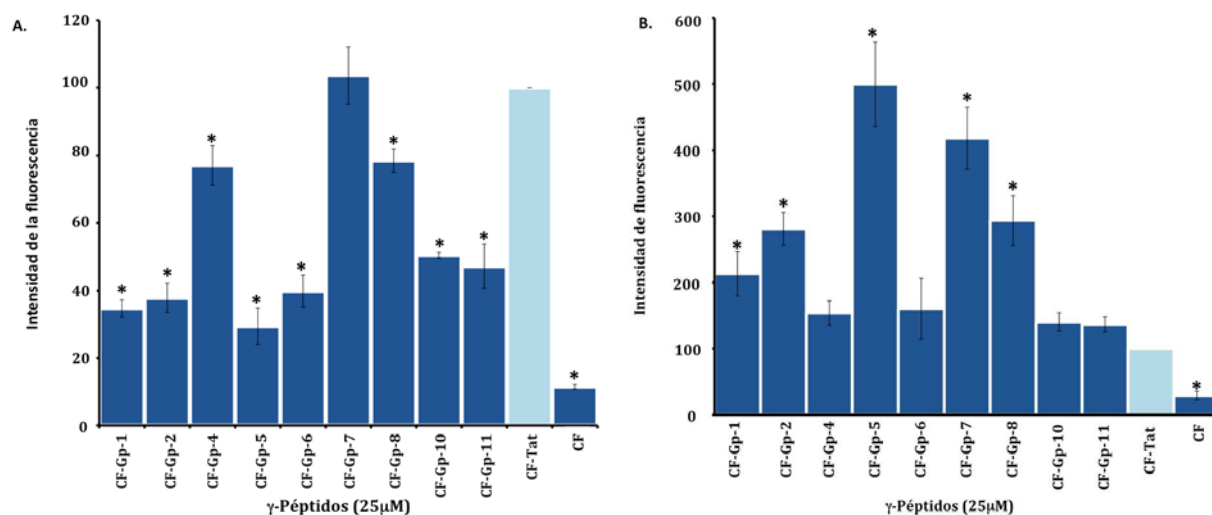


Figura 11. Cuantificación fluorimétrica de la capacidad de atravesar la membrana celular de 9 γ -péptidos (**CF-Gp-1**, **CF-Gp-2**, **CF-Gp-4**, **CF-Gp-5**, **CF-Gp-6**, **CF-Gp-7**, **CF-Gp-8**, **CF-Gp-10**, **CF-Gp-11**), el control positivo (péptido **Tat**) y el control negativo (**CF**) incubados con la línea celular HeLa durante 2 h (A) y 24 h (B). Concentración final de los péptidos 25 μ M. Todos los datos fueron normalizados asumiendo que el **CF-Tat** tiene un valor de 100. Las barras representan la desviación estándar (SD) del valor medio de tres experimentos independientes. Prueba Tukey con una $p < 0.05$ (*).

Nomenclatura	Estructura química
CF-Gp-1	
CF-Gp-2	
CF-Gp-3*	
CF-Gp-4	
CF-Gp-5	
CF-Gp-6	
CF-Gp-7	
CF-Gp-8	
CF-Gp-9*	

CF-Gp-10	
CF-Gp-11	

Tabla 12. Nomenclatura y estructuras químicas de los γ -péptidos utilizados en este trabajo. *Estos péptidos se utilizaron en estudios relacionados con el Capítulo 3.

Los resultados mostraron que a las 2 h, el péptido **CF-Gp-7** presentó un comportamiento similar al control positivo (**CF-Tat**), siendo el más eficiente en atravesar la membrana celular en este tiempo, en comparación a los demás péptidos probados. Además, en experimentos donde se estudió el efecto del tiempo de incubación en la capacidad de entrada en las células, se observó que al incrementar el tiempo de incubación a 24 h, 5 péptidos mostraron una capacidad de entrada en las células HeLa mayor que el control. A las 24 h, los **CF-Gp-5** y **CF-Gp-7** mostraron los mayores valores de intensidad de fluorescencia (Figura 11). Este comportamiento puede estar relacionada con el tiempo de exposición y con la resistencia a la degradación enzimática de estos péptidos.

1.2.2 Localización intracelular de los γ -péptidos en células HeLa.

Con el fin de estudiar la localización intracelular en células HeLa, se seleccionaron 3 péptidos (**CF-Gp-4**, **CF-Gp-7**, **CF-Gp-10**), teniendo en cuenta sus diferencias estructurales y su capacidad de atravesar la membrana celular. El péptido **CF-Gp-7** es un péptido con α -aminas cuaternarias funcionalizadas con grupos metilo y cadenas hidrofóbicas (grupos etilbenceno e isopentano). El péptido **CF-Gp-4** es un péptido que alterna sus cadenas laterales en hidrofóbicas (grupo etilbenceno) e hidrofílicas (grupo guanidinio) y el péptido **CF-Gp-10** con todas sus cadenas laterales ricas en grupos guanidinos. El péptido **CF-Tat** se continuó utilizando como control positivo de este experimento (Figura 12, parte I).

Los experimentos de microscopía confocal se realizaron con células HeLa vivas y no fijadas, que se incubaron con los péptidos seleccionados durante 2 h. Se utilizó esta metodología, ya que anteriormente se había demostrado que la fijación de las células podía generar artefactos experimentales que dificultaban la interpretación de los resultados.^{113,139} Se hicieron experimentos de colocalización celular con marcadores específicos de distintos organelos como citoplasma (Cell Tracker), mitocondrias (MitoTracker), lisosomas y endosomas tardíos (LysoTracker), el aparato de Golgi (BODIPY-TR) y el retículo endoplasmático (ER-Tracker Red).

Los experimentos con células vivas con el marcador citoplasmático (Cell Tracker), demostraron que los péptidos **CF-Gp-4**, **CF-Gp-7** y **CF-Gp-10** se localizaron en el citoplasma de la célula en las vesículas y no se encontraron unidos a la membrana nuclear ni al núcleo (Figura 12, parte II). Este comportamiento, es consistente con

resultados anteriores que encontraron que otros miembros de esta familia de γ -péptidos presentan una distribución vesicular, avalando la hipótesis de una entrada celular por vía endocítica principalmente.⁴⁹

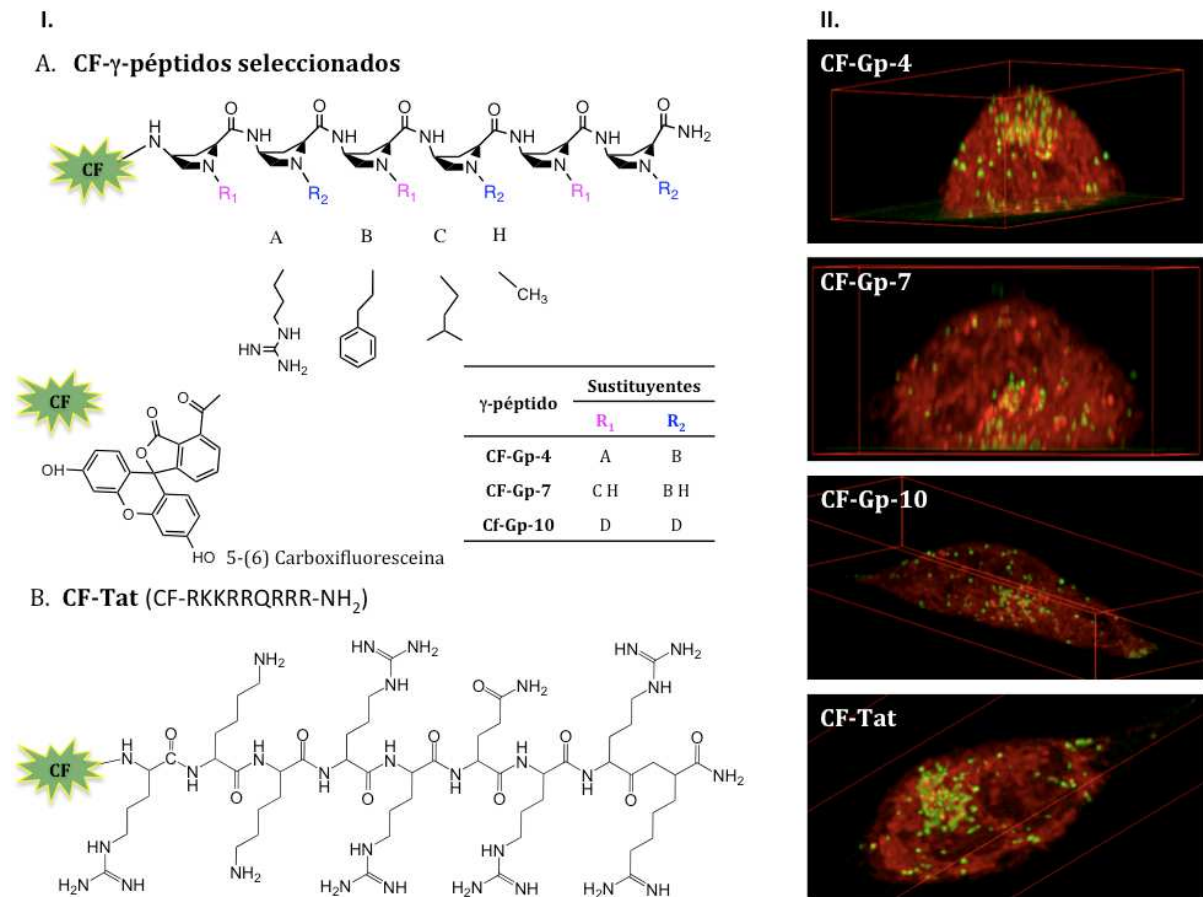


Figura 12. I. Estructura química de los γ -péptidos conjugados con carboxifluoresceína (CF-Gp, verde)(A). y el control positivo (CF-Tat) (B). II. Imágenes 3D de las células HeLa incubadas con tres γ -péptidos (CF-Gp-4, CF-Gp-7, CF-Gp-10) y el péptido CF-Tat. El citoplasma está marcado con Cell Tracker (rojo).

Los experimentos de colocalización con el MitoTracker demostraron que los γ -péptidos **CF-Gp-4**, **CF-Gp-7** y **CF-Gp-10** no tuvieron la capacidad de atravesar la membrana mitocondrial. Esto se confirmó con los datos obtenidos del coeficiente de Pearson, los cuales fueron bajos, entre 0.07 y 0.14 para todos los péptidos analizados, incluyendo el control **CF-Tat**. También el coeficiente M2 demostró que menos del 11.6 % de la señal verde correspondiente a los péptidos solapa con la señal roja (MitoTracker) (Figura 13, A).

Por otra parte, las imágenes obtenidas de las células HeLa incubadas con los γ -péptidos y los marcadores del aparato de Golgi (BODIPY-TR) y del retículo endoplasmático (ER-Tracker), demuestran que la colocalización es muy poca (Figura 13, B y C). Así mismo el coeficiente M2 obtenido para retículo endoplasmático indica que por debajo del 15 % de la señal verde solapa con la señal roja. En el caso del aparato de Golgi, entre el 4.9 % y el 10 % de volumen de la señal verde solapa con la señal de dicho marcador.

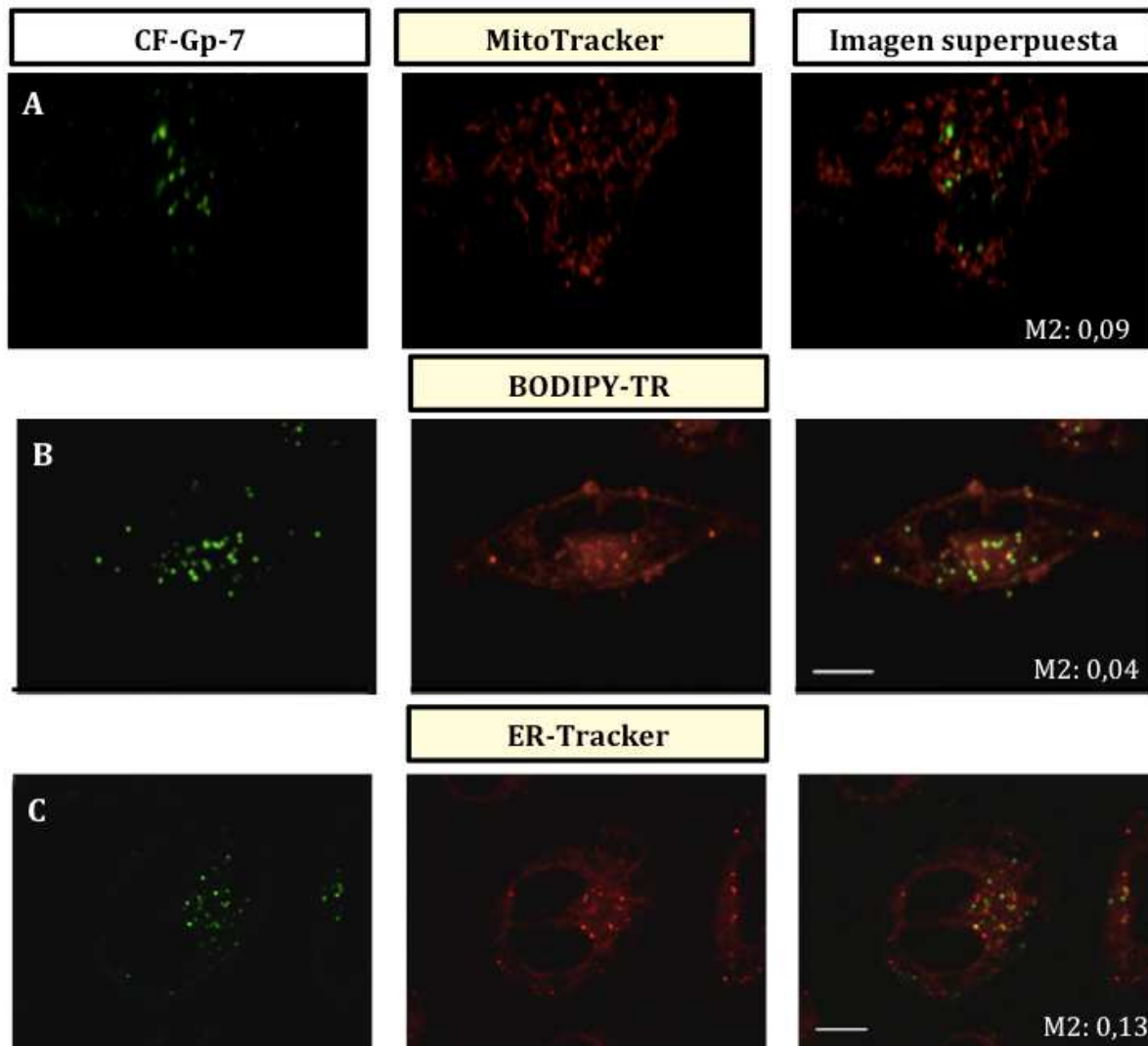


Figura 13. Imágenes de microscopía confocal de células HeLa incubadas con el γ -péptido **CF-Gp-7** (verde). A. Las mitocondrias están marcados con MitoTracker (rojo). B. El aparato de Golgi está marcado con BODIPY-TR (rojo). C. El retículo endoplásmico está marcado con ER-Tracker (rojo). En estas imágenes no hay colocalización entre los péptidos y cada uno de los marcadores empleados. M: índice de colocalización de Manders calculado para 30 imágenes.

Los experimentos de colocalización con el marcador LysoTracker, demostraron que los γ -péptidos **CF-Gp-4**, **CF-Gp-7** y **CF-Gp-10** colocalizan con este, indicando que podrían encontrarse cerca o unidos a la membrana lisosomal, o en la parte interna de este orgánulo (Figura 14). Los datos obtenidos al realizar la estimación del coeficiente de Pearson confirmaron estos resultados, mostrando valores entre 0.48-0.57 para los γ -péptidos y 0.60 para el control **CF-Tat**. También se estimó el coeficiente de Manders (M2) y su interpretación demostró que entre el 46% y el 52% de la señal del verde correspondiente a los γ -péptidos, solapan con la señal roja del marcador lisosomal, reforzando la idea de que el mecanismo principal de entrada de estos péptidos es la vía endocítica.

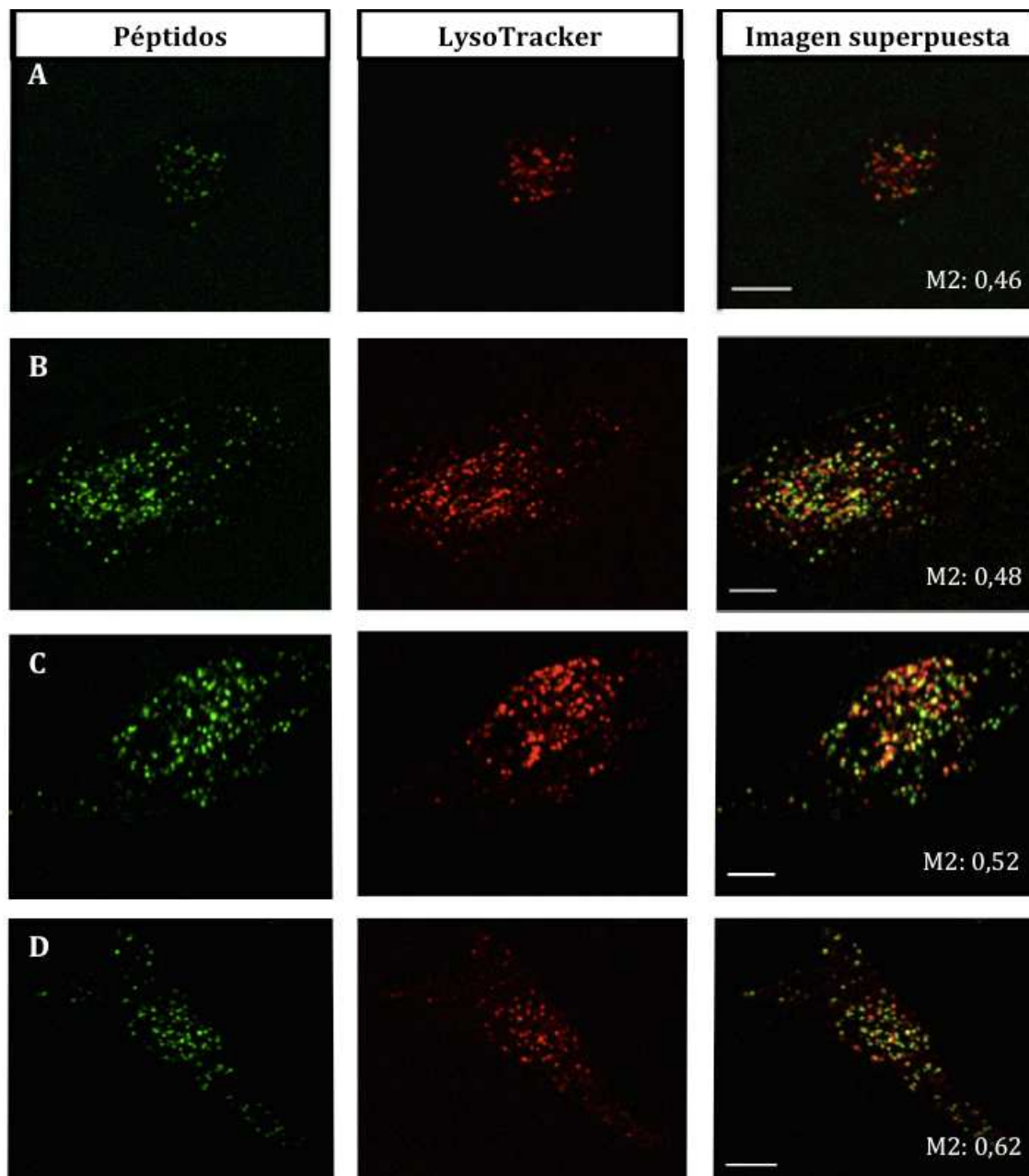


Figura 14 Imágenes de microscopía confocal de células HeLa incubadas con tres γ -péptidos (verde): A. **CF-Gp-4**, B. **CF-Gp-7**, C. **CF-Gp-10** y control positivo, D. **CF-Tat** (verde). Los lisosomas están marcados con LysoTracker (rojo). Estas imágenes muestran colocalización entre los péptidos y los lisosomas (amarillo). M: índice de colocalización Manders calculado para 30 imágenes.

Adicionalmente, se utilizó el microscopio confocal invertido Zeiss Axiovert 200M asociado al sistema Spinning Disk para registrar una serie de videos de las trayectorias de los γ -péptidos internalizados en las células HeLa. Para el caso del **CF-Gp-10**, se observó que luego de que estos compuestos se unieran al lisosoma, se detectaron movimientos conjuntos entre la partícula verde y la roja, pero sólo por corto tiempo (22 segundos). Estos ensayos constituyeron otra evidencia de la interacción existente entre los péptidos y el lisosoma o endosoma tardío (Figura 15).

Este mismo experimento para los γ -péptidos **CF-Gp-4** y **CF-Gp-7**, mostraron un comportamiento similar al observado para **CF-Gp-10**, aunque los tiempos de detección del movimiento entre las partículas rojas y verdes fueron mucho menores. Esto podría estar relacionado con la extinción de la fluorescencia durante el tiempo de exposición.

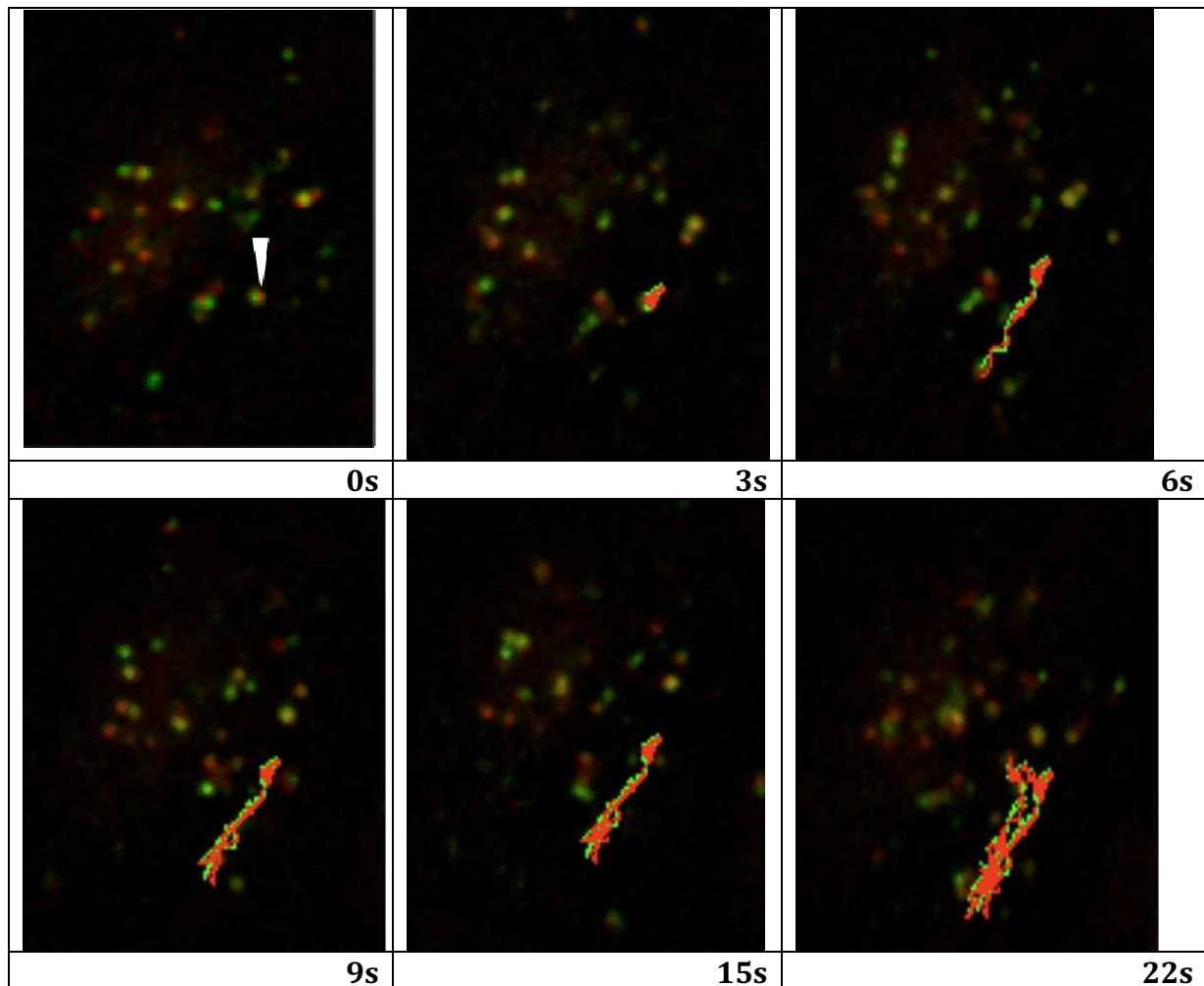


Figura 15. Imágenes secuenciales de microscopía confocal de células HeLa incubadas con el péptido **CF-Gp-10** (verde), que muestran la trayectoria de un evento en el cual el péptido se une a los lisosomas. Los lisosomas están marcados con LysoTracker (rojo).

Estudios realizados han demostrado que la interacción de las partículas con las células está influenciada por el tamaño de la partícula, la forma y la superficie química.¹⁴⁰ Por esta razón, se cuantificó la distribución de las partículas fluorescentes dentro de la célula por medio de parámetros como el número, la agregación y la esfericidad. La agregación de las partículas fluorescentes varió de entre 0.01 y $0.55 \mu\text{m}^3$ y prácticamente todas mostraron una tendencia a formar las esferas típicas observadas en estudios similares de los procesos de internalización endocítica. Además, fue posible observar algunas diferencias en los perfiles de distribución de los péptidos analizados (Tabla 13). Para los péptidos **CF-Gp-4** y **CF-Gp-10** el tamaño promedio de las partículas fue prácticamente idéntico ($0.15 \mu\text{m}^3$), aunque el patrón de distribución es diferente y el número de partículas es mucho mayor para el **CF-Gp-10**, siendo este compuesto el que presentó un mayor número de partículas fluorescentes dentro de la célula. Por otra parte, el **CF-Gp-7** resultó el de mayor tamaño promedio. El tamaño promedio de las partículas es similar al

que se produce en la macropinocitosis, aunque no puede excluirse la posibilidad de una agregación tardía del péptido luego de su internalización.

γ -péptidos	Número de partículas fluorescentes	Tamaño promedio(μm^3)	Esfericidad
CF-Gp-4	78.6	0.1562	0.9216
CF-Gp-7	83.3	0.2394	0.9086
CF-Gp-10	138.3	0.1554	0.9294
CF-Tat	89.5	0.1844	0.9134

Tabla 13. Análisis de los perfiles de distribución de las partículas fluorescentes (**CF-Gp** y **CF-Tat**) dentro de la célula.

1.2.3 Efecto de los inhibidores de endocitosis frente a la entrada de γ péptidos en células HeLa.

Con el objetivo de profundizar un poco más en los mecanismos de entrada celular más relevantes para los tres γ -péptidos estudiados, se realizaron experimentos de entrada celular mediante citometría de flujo y en presencia de inhibidores específicos de distintos mecanismos endocíticos en células HeLa (Figura 16). Los inhibidores utilizados fueron la cloroquina y el cloruro de amonio (aumentan el pH interno de los orgánulos como los endosomas tardíos y lisosomas), solución de sacarosa (afecta el ensamblaje de las vesículas recubiertas de clatrina), la amilorida (inhibidor de la macropinocitosis), la cloropromazina (disocia las vesículas cubiertas de la clatrina) y la filipina (inhibidor de caveola).^{104,141-143}

Los resultados demostraron que los γ -péptidos atraviesan la membrana citoplasmática mediante más de una vía endocítica (Figura 16). Por ejemplo, para los péptidos **CF-Gp-4** y **CF-Gp-10** fue posible determinar al menos dos mecanismos de entrada, la macropinocitosis y la vía clatrina. El péptido **CF-Gp-7** además de internalizarse por estos mecanismos, también entró por la vía caveola. Los resultados obtenidos en presencia de amilorida, avalan la internalización celular de todos estos compuestos principalmente mediante macropinocitosis.

Los resultados de todos los experimentos, demuestran que todos los γ -péptidos probados internalizan en células HeLa mediante procesos endocíticos y macropinocitosis, principalmente; localizándose una parte en los lisosomas. Estos resultados, nos impulsaron a estudiar el potencial de estos compuestos como transportadores de fármacos, determinando su capacidad de internalizar en un cultivo primario de células MAEC, las cuales constituyen el modelo *in vitro* para estudiar la enfermedad de Fabry. Esta parte de la investigación se realizó en colaboración con la Dra. Abasolo en el Hospital de Vall d'Hebrón (CIBBIM-Nanomedicina). Para ello, se utilizaron células endoteliales de aorta de ratón MAEC KO (IA11-145KO, 2,8 meses).

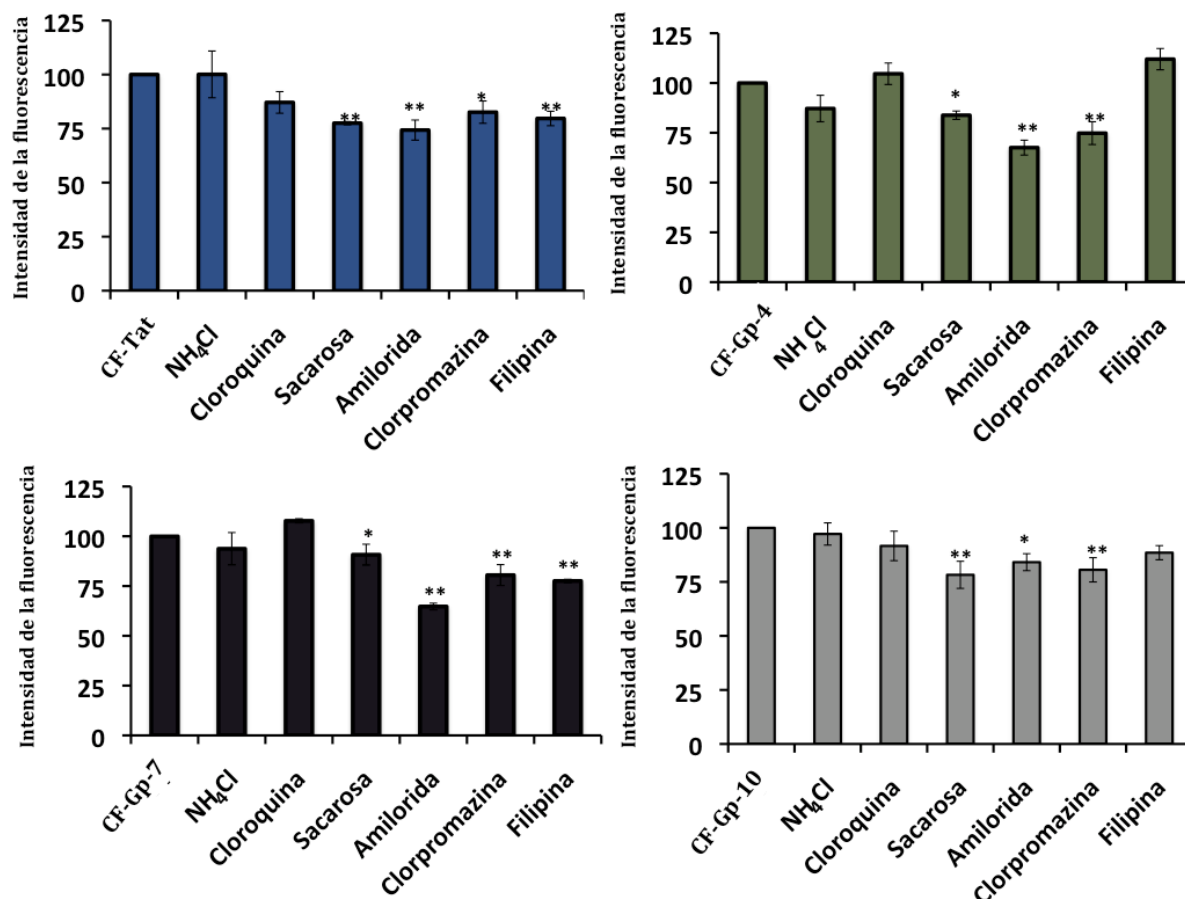


Figura 16. Efecto de los inhibidores de endocitosis en la entrada de tres γ -péptidos y el péptido **CF-Tat** en células HeLa. Concentración final de los péptidos 25 μ M. Todos los datos fueron normalizados asumiendo que cada uno de los péptidos tiene un valor de 100. Cada experimento se realizó por triplicado. Las barras representan la desviación estándar (SD) del valor medio de tres experimentos independientes. La prueba de Tukey se utilizó para comparar las diferencias de las medias con un $p < 0.05$ (*) y 0.01 (**).

1.2.4 Ensayos de internalización de los γ péptidos en células MAEC.

La enfermedad de Fabry es una enfermedad de almacenamiento lisosómico hereditaria derivada de mutaciones en el gen que codifica la enzima α -galactosidasa. Algunos de los estudios relacionados con esta enfermedad, utilizan las células MAEC como modelo *in vitro* celular.⁹⁷ La utilización de cultivos de células primarias como las MAEC, constituyen un modelo *in vitro* eficiente en la comparación de agentes farmacológicos empleados en reducción de glicolípidos (enfermedad de Fabry).⁹⁷

Las células MAEC incubadas con soluciones 20 μ M de los diferentes compuestos durante 2 h y utilizando 5 μ M de LysoTracker como marcador de los lisosomas y endosomas tardíos, fueron analizadas mediante microscopía confocal (Figura 17, 18 y 19). Los resultados demostraron que los γ -péptidos **CF-Gp-4** y **CF-Gp-10** son capaces de atravesar la membrana de estas células y colocalizan con los lisosomas (Figura 17 y 18), mientras que el **CF-Gp-7** lo hizo en menor medida (Figura 19). Esta es una primera aproximación que evidencia que los γ -péptidos guanidilados podrían ser útiles para su

utilización en el transporte de enzimas como la α -galactosidasa, para el tratamiento mediante terapia sustitutiva de la enfermedad de Fabry.

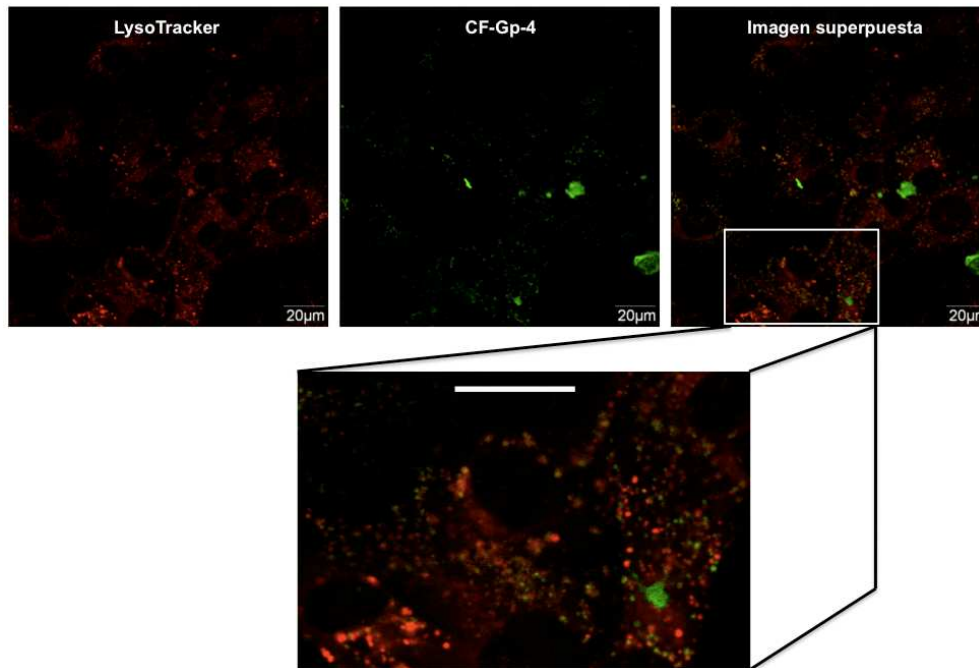


Figura 17. Imágenes de microscopía confocal de células MAEC incubada con **CF-Gp4** (verde). Los lisosomas están marcados con LysoTracker (rojo). Estas imágenes muestran colocalización lisosomal de este péptido (amarillo).

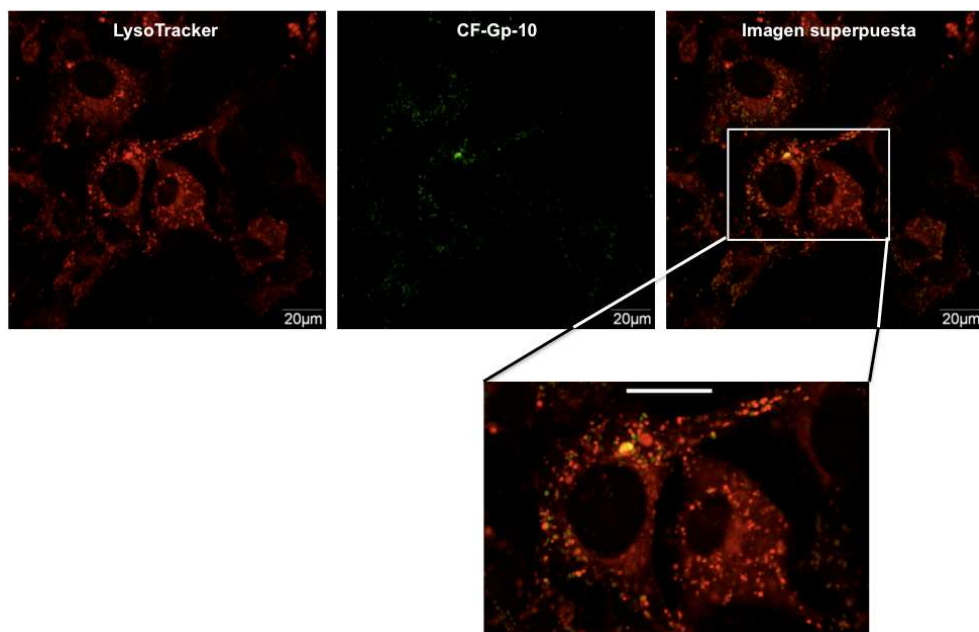


Figura 18. Imágenes de microscopía confocal de células MAEC incubada con **CF-Gp-10** (verde). Los lisosomas están marcados con LysoTracker (rojo). Estas imágenes muestran colocalización lisosomal de este péptido (amarillo).

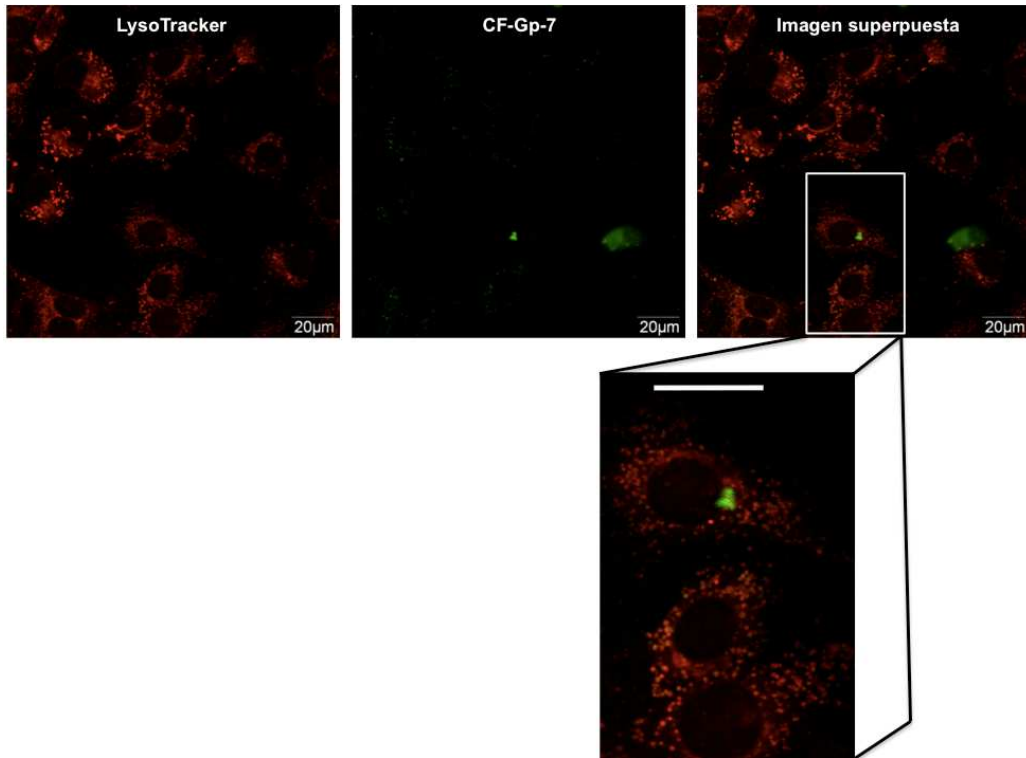


Figura 19. Imágenes de microscopía confocal de células MAEC incubada con **CF-Gp-7** (verde). Los lisosomas están marcados con LysoTracker (rojo). Estas imágenes no muestran colocalización de este γ -péptido y la sonda fluorescente.

1.3 Discusión

1.3.1 γ péptidos (CF-Gp) como CPPs en células HeLa.

La diferencia en la entrada de los γ -péptidos estudiados en las células HeLa, a las 2 y 24 h de incubación, en relación con el **Tat** puede estar relacionada con el tiempo de exposición y con la resistencia a la degradación enzimática de estos péptidos. A las 2 h, solo el **CF-Gp-7** mostró valores de intensidad de fluorescencia similares al control positivo **CF-Tat**, mientras que a las 24 h de incubación, el mismo compuesto (**CF-Gp-7**) y además el **CF-Gp-5** mostraron valores muy superiores al control positivo **CF-Tat**, y adicionalmente otros tres γ -péptidos estudiados presentaron valores de intensidad de fluorescencia superiores al control. Este resultado podría estar relacionado con que el **Tat** es un α -péptido, característica que lo hace vulnerable a la degradación frente a proteasas,⁴⁷ mientras que nuestros compuestos, debido a sus características estructurales, han demostrado ser más resistentes a esta degradación.⁴⁹

Que todos los compuestos estudiados entraran en las células HeLa luego de 24 h de incubación, está directamente relacionado con la estructura y las características físico-químicas de estos péptidos. Los **CF-Gp** estudiados son péptidos anfipáticos enriquecidos en prolina y derivados similares mostraron ser eficientes en la internalización celular.⁶⁹ El péptido **CF-Gp-7** tiene cargas positivas aportadas por sus aminas cuaternarias, que aportan densidad de carga positiva suficiente para favorecer la entrada celular. Por otra parte, la hidrofobicidad de las cadenas laterales de este péptido, también se considera otra de las características importantes en los procesos de translocación, en la interacción con la parte lipídica de las membranas.¹⁴⁴

1.3.2 Localización intracelular de los γ péptidos (CF-Gp) en células HeLa.

Los experimentos realizados con células vivas, utilizando el marcador citoplasmático (Cell Tracker), demostraron que los péptidos **CF-Gp-4**, **CF-Gp-7** y **CF-Gp-10** se localizan en el citoplasma de la célula en forma de vesículas y no se encuentran unidos a la membrana nuclear ni al núcleo (Figura 12, parte II) evidenciando una entrada celular mediada principalmente por vía endocítica.⁴⁹ Estudios realizados anteriormente, apoyan la idea de que la endocitosis es una de las principales vías que permiten la internalización del **Tat** y de péptidos ricos en argininas (R9).¹¹³

Los marcadores utilizados nos permitieron determinar tanto la distribución, como una primera aproximación a los posibles mecanismos de entrada celular. De todos los marcadores utilizados, sólo se observó colocalización entre los cuatro péptidos analizados y el LysoTracker, indicando la presencia de estos compuestos en los lisosomas o en los endosomas tardíos. Aunque también fue posible observar parte de los γ -péptidos que no colocalizaron con este organelo en el interior de la célula, resultado que puede deberse a varias razones. La primera es que una parte de los péptidos hayan preferido entrar vía macropinocitosis, en otros estudios se ha encontrado que los macropinosomas a pesar de que su pH interior disminuye, no se fusionan con los lisosomas para degradar su contenido.¹²² La segunda explicación podría ser que los

péptidos se encuentren en endosomas tempranos, los cuales no están marcados por el LysoTracker.

El hecho de que ninguno de estos compuestos colocalizaran con los otros marcadores utilizados, evidencian que en ningún caso estos péptidos atravesaron la membrana mitocondrial (Resultados del MytoTracker), ni se localizaron en el aparato de Golgi (Resultados del BODIPY-TR) o en el retículo endoplasmático (Resultados del ER-Tracker) (Figuras 13 y 14).

Las trayectorias determinadas en el microscopio confocal invertido Zeiss Axiovert 200M para los tres γ -péptidos (**CF-Gp-4**, **CF-Gp-7** y **CF-Gp-10**), confirmaron la interacción de estos con los lisosomas o endosomas tardíos (Figura 15).

Por otra parte, los perfiles de distribución obtenidos en este estudio (Tabla 13) avalaron la posible entrada de estos γ -péptidos vía endocítica. El número de partículas fluorescentes detectadas para dos de estos compuestos (**CF-Gp-4** y **CF-Gp-10**) fue muy similar a la determinada para el **CF-Tat**, mientras que el **CF-Gp-10** resultó muy superior. Además, todos mostraron un tamaño promedio entre 0.15-0.18 μm^3 , excepto el **CF-Gp-7** que resultó superior (0.24 μm^3). Estos resultados, están estrechamente relacionados con las estructuras químicas de estos compuestos y sus propiedades físico-químicas. La combinación entre las cadenas hidrofóbicas y las cargas positivas de las aminas cuaternarias presentes en el **CF-Gp-7**, favorecen las interacciones no covalentes como las Van der Waals, puentes de hidrógeno, así como interacciones electrostáticas que favorecen la mayor agregación de este compuesto, en comparación con el resto de los γ -péptidos y el **CF-Tat**. En cuanto al resultado del número de partículas, el **CF-Gp-10** presenta seis residuos guanidilados, superiores en tamaño a las cadenas laterales presentes en los otros γ -péptidos analizados y a pesar de las interacciones no covalentes presentes, no son suficientes para favorecer su agregación, dando lugar a señales esféricas más pequeñas y en mayor cantidad. Aunque los resultados reafirman la vía endocítica como posible mecanismo de entrada, no podemos considerarlos concluyentes, teniendo en cuenta estudios anteriores, que demostraron que en las células HeLa internalizan rápidamente partículas no esféricas con dimensiones hasta de 3 μm .¹⁴⁰ El tamaño de las partículas, nos permite descartar la vía endocítica mediada por caveola, debido a que todas presentaron tamaños superiores a los 0.060 μm determinados para las invaginaciones generadas en este mecanismo.¹²⁸ Cualquiera de los otros mecanismos conocidos son probables, teniendo en cuenta que los tamaños determinados para nuestras partículas fluorescentes se encuentran en el rango de los valores determinados en estudios similares para los liposomas y las vesículas recubiertas de clatrina.¹²⁸

1.3.3 Efecto de los inhibidores de endocitosis frente a la entrada de los γ péptidos.

Los inhibidores específicos de entrada endocítica mediada por clatrina (sacarosa y clorpromazina), así como el inhibidor de macropinocitosis (amilorida) y el de la vía mediada por caveola (filipina III), disminuyeron significativamente la entrada en las células HeLa del péptido **CF-Tat**, corroborando que bajo nuestras condiciones, la internalización de este péptido ocurre vía endocítica mediante varios mecanismos (Figura 16). Similar comportamiento ha sido mostrado en estudios de internalización

del **Tat** y otros péptidos ricos en argininas en células HeLa en presencia de inhibidores de endocitosis.^{113,123,128,131} A diferencia de nuestros resultados, otros estudios encontraron que el inhibidor filipina III no presentó un efecto significativo en la internalización del péptido **Tat** marcado con Alexa flúor 488 en células HeLa.¹²⁵ Este comportamiento diferente pudiera estar relacionado con las condiciones utilizadas en cada estudio, así como con la diferencia estructural entre ambos compuestos, en base a los diferentes fluoróforos utilizados en cada caso (CF o Alexa fluor 488).^{10,145} Por otra parte, estudios recientes han demostrado que la endocitosis vía caveola juega un papel importante en la internalización de partículas pequeñas en células HeLa.¹⁴³

El γ -péptido **CF-Gp-7** mostró un comportamiento similar al del **CF-Tat**. Tanto el inhibidor específico del mecanismo de entrada endocítica mediada por clatrina (clorpromazina), así como la amilorida (inhibidor específico de la macropinocitosis) y la filipina (inhibidor específico de la endocitosis vía caveola) disminuyeron significativamente la entrada a la célula de este compuesto (Figura 16). Al utilizar la sacarosa como inhibidor, la cual se conoce por prevenir el ensamblaje de las invaginaciones cubiertas de clatrina, se observó la disminución en la entrada del **CF-Gp-7**. La disminución significativa del **CF-Tat** y el **CF-Gp-7**, al utilizar filipina como inhibidor, demostró que una parte de estos péptidos utilizan esta vía dependiente del colesterol. El secuestro del colesterol en la membrana por la filipina o la reducción de colesterol intracelular, causa que la cubierta de caveolina se desensamble hasta desaparecer la caveola invaginada, debido a que la caveolina 1 es una proteína de unión al colesterol y estabiliza los oligómeros de caveolina 1.¹⁴⁶

A diferencia de los dos compuestos anteriormente analizados (**CF-Tat** y **CF-Gp-7**), para los péptidos **CF-Gp-4** y **CF-Gp-10**, el inhibidor específico de la endocitosis vía caveola (filipina) no tuvo un efecto significativo en la entrada de estos compuestos a la célula, descartando que la internalización de estos compuestos ocurra vía endocítica mediada por caveola. El inhibidor específico de la endocitosis vía clatrina (clorpromazina), disminuyó significativamente la entrada de estos dos péptidos a la célula, soportando que la vía de internalización de estos compuestos involucra la endocitosis vía clatrina. Además, la influencia de la amilorida en la entrada del **CF-Gp-4**, nos permite concluir que la macropinocitosis es otro mecanismo de internalización celular usado por este péptido. Para el **CF-Gp-10**, la influencia de este inhibidor (amilorida) no resultó definitiva, mientras que la sacarosa, el otro inhibidor específico de la vía clatrina utilizado, disminuyó significativamente la entrada celular de este compuesto, reafirmando en este caso, la internalización de **CF-Gp-10** a través del mecanismo endocítico mediado por clatrina (Figura 16).

1.3.4 Internalización de γ -péptidos en células MAEC

Como mencionamos anteriormente, al incubar los γ -péptidos **CF-Gp-4**, **CF-Gp-7** y **CF-Gp-10** con un cultivo primario de células MAEC y en presencia de LysoTracker como marcador lisosomal, los tres internalizaron en las células, siendo el **CF-Gp-10** el que presentó un mayor grado de internalización, seguido por el **CF-Gp-4**, mientras **CF-Gp-7** lo hizo en menor medida y los γ -péptidos guanidilados colocalizaron con los lisosomas. (Figura 17, 18 y 19).

Este resultado indica que para este cultivo primario, resulta más importante la presencia de grupos guanidínios en la estructura de los CPPs que otras características estructurales. El **CF-Gp-10** y **CF-Gp-4** presentan seis y tres residuos guanidínios en las cadenas laterales, respectivamente; mientras que el **CF-Gp-7** es una molécula catiónica pero sin residuos guanidínios. Este resultado se debe a que los grupos guanidínios presentes en las cadenas laterales de **CF-Gp-4** y **CF-Gp-10** son capaces de formar puentes de hidrógeno bidentados con los grupos fosfato, sulfato y carboxilato cargados negativamente presentes en la superficie celular, en comparación con el catión amonio presente en el esqueleto estructural de **CF-Gp-7**, impedido estéricamente para promover cualquier interacción no covalente con las especies presentes en la superficie de la membrana.¹¹²

Conclusiones.

- Se demostró que tanto el carácter catiónico, como la hidrofobicidad de los nueve γ -péptidos probados, juegan un rol importante en la capacidad de atravesar la membrana celular. Los estudios de citometría de flujo mostraron que a las 2 h de incubación de los γ -péptidos con las células HeLa, sólo el **CF-Gp-7** presentó un comportamiento similar al control positivo utilizado **CF-Tat**. A las 24 h de incubación, los nueve péptidos ensayados fueron capaces de atravesar la membrana de estas células con valores superiores al control positivo **CF-Tat**, siendo **CF-Gp-5**, **CF-Gp-7** y **CF-Gp-8** los que mostraron mayor capacidad de internalización.
- En los estudios de distribución celular (**CF-Gp-4**, **CF-Gp-7** y **CF-Gp-10**), los péptidos se localizaron en el citoplasma de la célula en forma de vesículas, además se localizaron en los lisosomas y endosomas tardíos (colocalizaron con LysoTracker), lo cual constituye un primer indicio de un mecanismo de internalización vía endocítica para estos compuestos. En ningún caso fueron capaces de atravesar la membrana mitocondrial (resultados del MytoTracker), ni se localizaron en el aparato de Golgi (resultados del BODIPY-TR) o en el retículo endoplasmático (resultados del ER-Tracker).
- Los estudios de citometría de flujo realizados en células HeLa incubadas durante 2 h con **CF-Tat** y los γ -péptidos **CF-Gp-4**, **CF-Gp-7** y **CF-Gp-10**, en presencia de diferentes inhibidores específicos de los mecanismos celulares de internalización indicaron la vía endocítica como mecanismo de entrada de estos compuestos.
 - i) Bajo nuestras condiciones, la entrada del CPP modelo **CF-Tat** se afectó por la presencia de los inhibidores de endocitosis mediada por clatrina (sacarosa y clorpromazina), por la amilorida (inhibidor de la macropinocitosis), así como por la presencia de filipina (inhibidor del mecanismo endocítico vía caveola).
 - ii) La entrada de los tres γ -péptidos (**CF-Gp-4**, **CF-Gp-7** y **CF-Gp-10**) se afectó significativamente en presencia de clorpromazina, resultado que avala el mecanismo endocítico mediado por clatrina como vía de entrada celular. Este resultado se refuerza para los tres γ -péptidos, que adicionalmente mostró una inhibición significativa en su entrada a las células en presencia de sacarosa. Este inhibidor afectó también, aunque en menor medida, la entrada de **CF-Gp-4** y **CF-Gp-7**. La amilorida inhibió la entrada de **CF-Gp4** y **CF-Gp7**, indicando que la macropinocitosis está presente como mecanismo de internalización de estos dos compuestos. El **CF-Gp-7** fue el único de los tres γ -péptidos analizados, cuya entrada se inhibió en presencia de filipina, sugiriendo que este péptido internaliza también vía caveola.

- Los γ -péptidos **CF-Gp-4** y **CF-Gp-10**, fueron capaces de internalizar en un cultivo primario de células MAEC y colocalizó con los endosomas tardíos y los lisosomas, mientras **CF-Gp-7** lo hizo aunque en menor medida (**CF-Gp-10**>**CF-Gp-4**>>>**CF-Gp-7**). Este resultado indicó que para este cultivo celular, la presencia de los residuos guanidilados en las cadenas laterales de los CPPs juega un papel más importante que la densidad de carga positiva neta de la molécula, teniendo en cuenta que **CF-Gp-10** y **CF-Gp-4** contienen seis y tres residuos guanidilados, respectivamente, mientras que **CF-Gp-7** es un péptido catiónico sin grupos guanidínios presentes en su estructura.

CAPÍTULO 2. γ -péptidos que atraviesan la membrana celular de *Leishmania donovani*.

Contribuciones a este capítulo: Los ensayos biológicos se realizaron en el grupo del Dr. Luis Rivas (CIB-CSIC, Madrid).

2.1 Introducción.

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa causada por un parásito protozooario que pertenece al género *Leishmania* (clase: Kinetoplastida; orden: Trypanosomatidae), que provoca una variedad de síntomas clínicos de diferente complejidad, desde una lesión cutánea hasta infecciones viscerales, estas últimas pueden ser fatales si no son tratadas a tiempo. Se conocen más de 20 especies de *Leishmania* que pueden producir afecciones diversas en el ser humano, entre las más extendidas y dependiendo del órgano que estas afecten se encuentran la leishmaniasis visceral, la leishmaniasis cutánea y la leishmaniasis muco-cutánea. La patogenicidad de cada especie varía según la población y las manifestaciones clínicas están relacionadas con la interacción de la especie infectante y la respuesta inmunológica del huésped.¹⁴⁷

En el 2010, esta enfermedad tuvo una incidencia de 2 millones de casos por año, de los cuales 0.5 millones correspondieron a la leishmaniasis visceral, causada principalmente por los parásitos *Leishmania infantum* y *Leishmania donovani*.¹⁴⁷

La leishmaniasis visceral se distribuye en regiones tropicales y subtropicales y es endémica en 88 países. Aproximadamente el 90% de los casos se localizan en la India, Bangladesh, el Sur de Sudan y el Nordeste de Brasil (Figura 20).^{147,148}

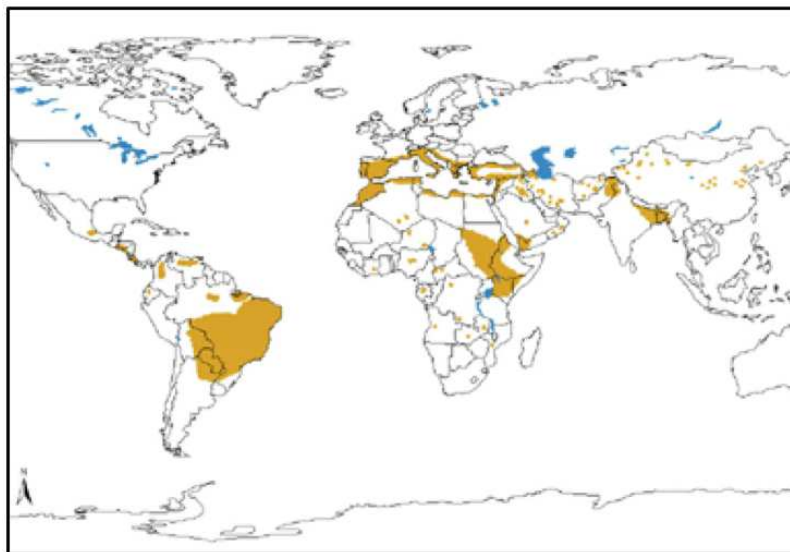


Figura 20. Distribución geográfica de leishmania visceral en el viejo y nuevo mundo. WHO/NTD/IDM HIV/AIDS, Tuberculosis and Malaria (HTM) World Health Organization, Octubre 2010

2.1.1 Biología del parásito.

La *Leishmania* es un parásito protozooario flagelado digénico que requiere de un insecto hematófago (vector) y de una especie de huésped reservorio vertebrado, entre los que se encuentran el ser humano, el perro y otros animales salvajes (zarigüeyas, oso hormiguero, roedores, etc), para completar su ciclo de vida (Figura 21). Se transmite por

la picadura de un insecto hematófago (flebotomos) hembra infectado. En América, el vector es el mosquito *Lutzomyia* y en Europa, el género *Phlebotomus*.¹⁴⁷

Los insectos (vectores) inyectan los promastigotes al vertebrado. Los promastigotes son las formas infecciosas elongadas extracelulares que se desarrollan y multiplican en el tracto digestivo de los insectos transmisores, distribuyéndose en la circulación sistemática del vertebrado (Figura 21, A). La infección se inicia cuando los promastigotes, que son altamente resistentes a la lisis del complemento, invaden rápidamente a los macrófagos y se transforman en amastigotes, que son la forma replicativa del parásito, redondas u ovales e intracelulares, que residen y se multiplican en los fagolisosomas dentro de los fagocitos mononucleares de los hospederos (monocitos, macrófagos, neutrófilos). En la transformación pierden el flagelo y cambia su cubierta superficial. Se ha demostrado que esta transformación de forma parasitaria implica cambios en la composición de la superficie del glicocálix de estas formas parasitarias (lipofosfoglicanos, glicoproteínas, proteoglicanos y glicolípidos GPI (glicosil fosfatidil inositol), proteofosfoglicanos y glicolípidos libre de GPI.¹⁴⁹ Los amastigotes son resistentes a los lisosomas y pueden infectar los órganos viscerales como el hígado y el bazo para continuar con la diseminación de la infección (Figura 21, A).¹⁵⁰

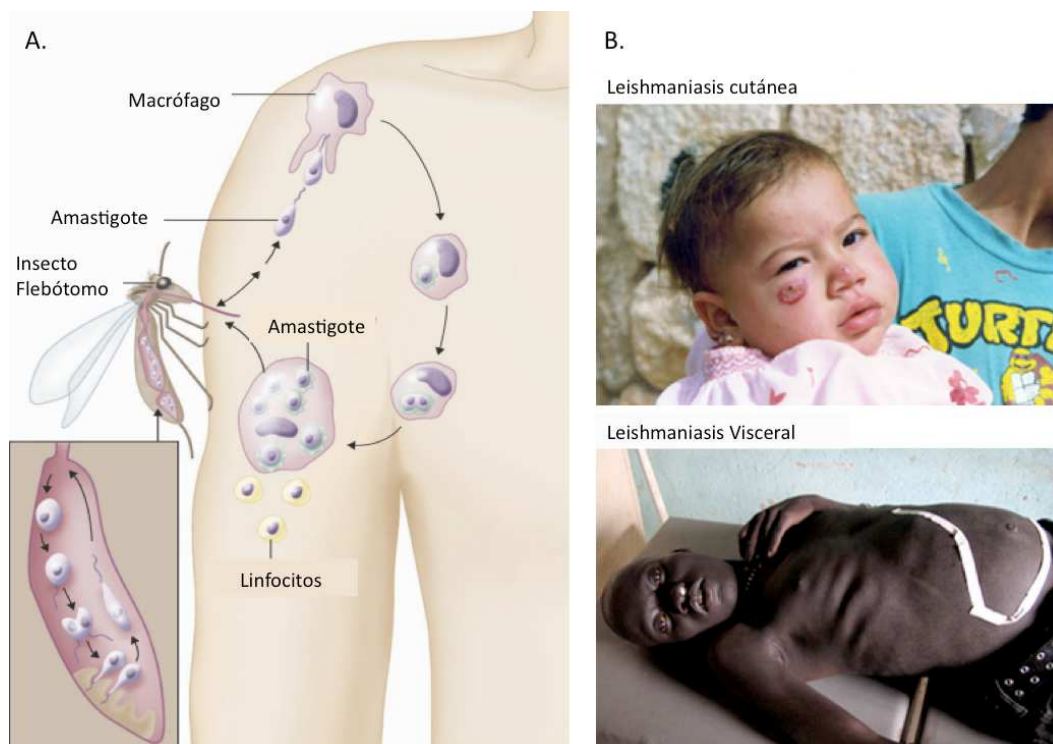


Figura 21. A. Ciclo de vida de *Leishmania*. B. Formas clínicas de la enfermedad: leishmaniasis cutánea y leishmaniasis visceral. WHO/NTD/IDM HIV/AIDS, Tuberculosis and Malaria (HTM) World Health Organization, October 2010

2.1.2 Barrera biológica (membrana plasmática) del parásito.

Cuando se compara con otras células eucarióticas, la membrana plasmática de los promastigotes presenta características peculiares entre las que se encuentran:¹⁵¹

- Los niveles altos de lipofosfoglicanos (LPG), polisacáridos aniónicos que componen más del 60% de la superficie total y le confiere carga negativa a la membrana.¹⁵¹
- Actividad proteolítica alta debido a la presencia de Gp63, una metaloproteasa de zinc (Leishmanolisina) con más de 5×10^5 copias / parásito.¹⁵²
- La composición lipídica se caracteriza por presentar un porcentaje ligeramente alto de fosfolípidos aniónicos y contienen ergosterol en lugar de colesterol.¹⁵¹
- El transporte a través de la membrana de *Leishmania* depende de los procesos de endocitosis y exocitosis, los cuales están restringidos a un área especializada, conocida como paquete flagelar, debido a la rigidez de la membrana, impuesta por una capa de microtúbulos estable.^{153,154,155}

2.1.3 Fármacos utilizados contra la leishmaniasis.

La leishmaniasis es la tercera enfermedad transmitida por vectores con más incidencia en el mundo, después de la malaria y la filariosis, la OMS calcula que unas 60.000 personas mueren al año a causa de una dolencia cuyos casos se concentran en un 90% en 15 países, la mayoría en vías de desarrollo. Actualmente, no hay vacunas disponibles en el mercado para prevenir esta enfermedad, debido a que esta dolencia se encuentra en el grupo de enfermedades tropicales olvidadas (enfermedades de los pobres). En la actualidad tan solo unas pocas compañías están desarrollando una vacuna para leishmaniasis humana y la mayor parte de estos proyectos se encuentran en fase preclínica. El proyecto más avanzado es el del IDRI (*Infectious Disease Research Institute*) en EEUU, con soporte de la Fundación Gates, que consiste en una poliproteína recombinante.¹⁵⁶

Actualmente, existen diferentes terapias para combatir esta enfermedad infecciosa, las cuales son tóxicas y generan resistencia por parte del parásito.¹⁵⁰ La mayoría de los tratamientos quimioterapéuticos de la leishmaniasis se basan en el empleo del antimonio pentavalente, la miltefosina y la anfotericina B, entre otros (Figura 22).^{147,157}

El antimonio pentavalente fue el medicamento de primera línea más utilizado durante años, pero el desarrollo de resistencia del parásito a este fármaco en regiones endémicas ha contribuido a su eliminación en el tratamiento, sobre todo en estas regiones (El Bihar, India),¹⁵⁸ mientras que en el resto del mundo se administra en forma de antimonio de N-metilglucamina (Glucantime®) y el estibogluconato de sodio (Pentostam®)(Figura 22). A pesar de haber sido uno de los fármacos más utilizados contra la leishmaniasis, la información acerca de la química y el modo de acción de estos compuestos es limitada.^{156,159,160}

Por otra parte, la amfotericina B (Figura 22) se considera un medicamento de segunda línea que puede administrarse en forma directa (Fungozine) o en formulaciones lipídicas (AmBisome). Ha sido utilizada como fármaco de primera línea en áreas endémicas. Su toxicidad y la tendencia al desarrollo de resistencia en el parásito es la principal limitación de este compuesto como agente terapéutico antileishmaniásico.^{156,161,162}

La miltefosina o hexadecilfosfocolina (**MT**) (Figura 22) es un fosfolípido, desarrollado inicialmente como un medicamento antineoplásico¹⁶³ que ha mostrado actividad leishmanicida. Este fármaco se administra en forma oral para el tratamiento de la leishmaniasis visceral.^{157,164,165} El modo de acción de la miltefosina frente a *Leishmania* está asociado con la apoptosis, un proceso que involucra la mitocondria del parásito y daño en la membrana flagelar.^{148,166}

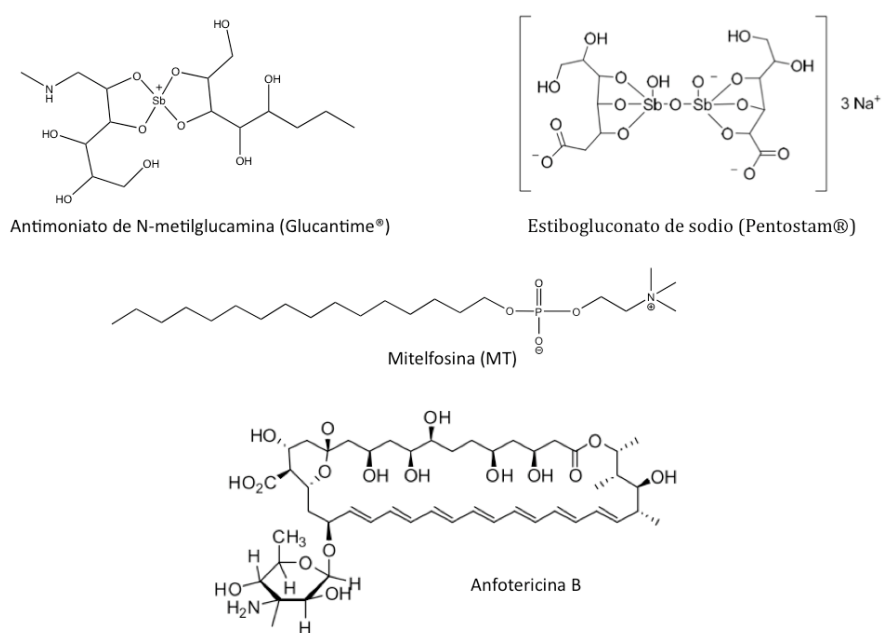


Figura 22. Fármacos más utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis.

Los estudios computacionales junto con ensayos experimentales demostraron que la doxorubicina (**Doxo**) funciona como un nuevo inhibidor de la tripanotona reductasa, una enzima considerada una diana farmacológica validada frente a leishmaniasis. Este fármaco presenta un efecto significativo sobre la homeostasis del parásito y actividad leishmanicida, mientras la toxicidad del fármaco resultó aceptable a una dosis limitada. Todos estos factores han contribuido a considerarla como una estrategia farmacológica alternativa.¹⁶⁷

La **Doxo** es un antibiótico antriciclino que presenta efecto antineoplásico en las células cancerosas. Este fármaco forma un complejo con el DNA nuclear, intercalándose entre las bases nitrogenadas, generando un impedimento estérico que interrumpe la síntesis del DNA y su transcripción. Adicionalmente, su actividad frente a promastigotes y amastigotes de *Leishmania donovani* ha sido demostrada en condiciones *in vitro* e *in vivo*, efecto asociado a la sensibilidad de la membrana plasmática de *Leishmania* frente a este compuesto.^{168,169}

El uso de una terapia combinada de fármacos para el tratamiento de la leishmaniasis representa una estrategia quimioterapéutica promisoriosa, que se ha implementado en diferentes áreas endémicas. Factores como la toxicidad de algunos de estos compuestos, el elevado costo de muchos de ellos y sobre todo la tendencia del parásito a desarrollar resistencia, hacen necesaria la búsqueda de alternativas quimioterapéuticas.¹⁷⁰

2.1.4 Resistencia del parásito frente a los fármacos.

Uno de los principales problemas del tratamiento de la leishmaniasis, es la resistencia del parásito a los fármacos. En el caso de la miltefosina, la resistencia desarrollada por el parásito se asocia con la interacción de varios factores,¹⁴⁸ uno de ellos se relaciona con la deficiencia en la entrada del fármaco. Los experimentos *in vitro* con líneas de parásitos resistentes a **MT**, establecieron que una mutación puntual única puede producir la resistencia del parásito a este fármaco. La resistencia del parásito frente a la **MT** se induce experimentalmente por presión selectiva o mutagénesis. En las cepas de *Leishmania* resistente este comportamiento se debe a defectos en la internalización del fármaco,¹⁷¹ determinándose una disminución en la concentración intracelular de miltefosina debido a: (a) la sobreexpresión del LtRMDR1, un transportador similar a la glicoproteína P que pertenece a la familia ABC (*ATP-binding cassette*) que aumentan la salida de este fármaco al exterior del parásito;¹⁷² (b) el metabolismo rápido del fármaco asociado con la permeabilidad de la membrana plasmática alterada, lo cual impide que el medicamento se acumule dentro del parásito.¹⁷³ La resistencia del parásito al fármaco se relaciona con niveles bajos de la expresión del transportador proteico de miltefosina LdMT, que junto a su potencial subunidad β (LdRos3), son dos de las proteínas requeridas en la translocación celular. Estos estudios determinaron que la maquinaria flipasa dependiente de LdMT-LdRos3 resultó determinante en la entrada de la **MT** a la célula.^{148,174,175}

Además, estudios realizados en promastigotes de *Leishmania donovani* resistentes a **MT** demostraron que la modificación en la composición lipídica y la biosíntesis de esteroles en la membrana, factor que influye en la fluidez y la permeabilidad de esta, puede afectar las interacciones membrana-fármaco.¹⁷⁶ Otro de los mecanismos implicados en la resistencia a la **MT** por parte del parásito es el estrés oxidativo que media la apoptosis¹⁴⁸

La resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos desarrollada por *Leishmania*, constituye un factor a solucionar, promoviendo la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas.

2.1.5 Péptidos antimicrobiales y péptidos con capacidad de atravesar la membrana, como estrategias terapéuticas utilizadas frente a la resistencia farmacológica.

El uso de conjugados, en los cuales se utilizan péptidos con capacidad de atravesar la membrana celular (CPPs) como vectores para transportar fármacos, constituye una de las estrategias terapéuticas poco estudiadas en el tratamiento contra *Leishmania*, desarrolladas en la búsqueda de un tratamiento farmacológico eficiente, que no genere resistencia farmacológica.¹⁷⁷

Los estudios publicados acerca de la aplicación de los CPPs en este campo, se enfocan principalmente en el estudio en modelos *in vitro* de células mamíferas y algunas investigaciones han sido realizadas en células protozoarias.^{177,178}

Los modos de acción de los CPPs que se han utilizado en la terapia de enfermedades infecciosas se basan en: (a) promover la internalización de los fármacos en la ausencia o ante la función defectuosa de un receptor, (b) promover la entrada de moléculas impermeables según el peso molecular, como pepducinas, que son inhibidores peptídicos que interfieren con la señal de transducción, ensayadas con células cancerosas, así como (c) promover la distribución de los fármacos y la acumulación de estos en compartimentos inaccesibles.¹⁷⁹

Hasta el momento, los péptidos **Tat**,¹⁷⁷ el **VIP**,¹⁸⁰ y la histatina 5¹⁷⁷ han demostrado capacidad de atravesar la membrana celular de este parásito (*Leishmania*) y a los dos últimos, se les reconoce actividad leishmanicida. Con el objetivo de estudiar la resistencia del parásito al fármaco, se conjugó el **Tat** con un péptido sustrato leishmanolisina (inhibidor de la actividad proteolítica de la enzima)¹⁵² o con la **MT** (fármaco leishmanicida), comprobando que de esta manera se evita la resistencia del parásito al fármaco.¹⁷⁷ El propósito de esta estrategia es que los CPPs demuestren su potencialidad para distribuir fármacos en entornos determinados, generados en distintas etapas del parásito, como el ambiente con elevada actividad proteolítica proporcionado por el glicocálix aniónico de los promastigotes.

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación en colaboración con el Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid (CIB-CSIC) demostraron que, de 42 γ -péptidos miméticos estudiados, tres de ellos fueron capaces de atravesar la membrana de promastigotes de *Leishmania donovani* y amastigotes de *Leishmania pifanoi*, además de no resultar tóxicos para el parásito. De ellos destacó el γ -péptido **CF-Gp-11** (Figura 23), con 6 grupos guanidínios en sus cadenas laterales, que mostró una elevada capacidad de atravesar la membrana de *Leishmania donovani*.⁵⁰

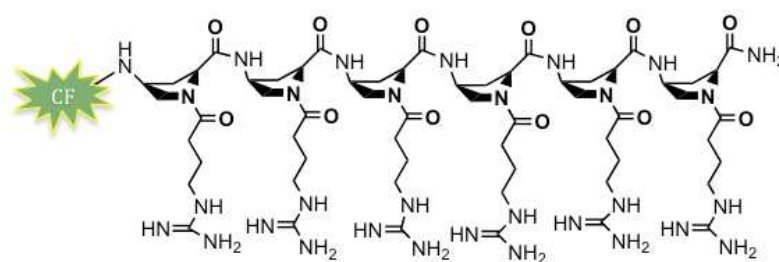


Figura 23. Estructura química de **CF-Gp-11**.

Considerando toda la bibliografía consultada, así como el trabajo previo desarrollado en nuestro grupo de investigación, el objetivo del presente capítulo es mejorar la potencialidad como CPP mostrada por el γ -péptido **CF-Gp-11**, mediante la síntesis de una pequeña familia derivada de este péptido y evaluar la capacidad de los mismos para atravesar la membrana de *Leishmania donovani* por medio de citometría de flujo y microscopía confocal. Así mismo también se pretende explorar las habilidades del péptido **CF-Gp-11** como vehículo transportador de fármacos, mediante la síntesis de dos

conjugados del péptido **CF-Gp-11** con fármacos con propiedades leishmanicida, como la miltefosina-BODIPY (**MT-BODIPY**) y la doxorubicina (**Doxo**).

Objetivos.

- Sintetizar cinco compuestos (incluido el **CF-Gp-11**) formados por 2, 4, 6, 8 y 10 monómeros cíclicos *cis*- γ -amino-L-prolina, en los cuales el grupo N $^{\alpha}$ esté modificado con un grupo alquil-guanidinio.
- Evaluar la capacidad de estos γ -péptidos para atravesar la membrana de *Leishmania donovani* por medio de citometría de flujo y microscopía confocal.
- Sintetizar dos conjugados del péptido **Gp-11** (**Doxo-Gp-11** y **MT-BODIPY-Gp-11**) con los fármacos con propiedades leishmanicida, la doxorubicina y la miltefosina-BODIPY, para poder evaluar su capacidad de transportarlos al interior del parásito.
- Evaluar la capacidad de los conjugados para atravesar la membrana de *Leishmania donovani* por medio de citometría de flujo y microscopía confocal.

2.2 Resultados.

2.2.1 Síntesis de los péptidos derivados del CF-Gp-11.

Teniendo en cuenta los resultados alcanzados por el **CF-Gp-11** en estudios previos como CPP frente a *Leishmania donovani*⁵⁰ y con el objetivo de establecer la relación estructura/actividad de estos compuestos frente a este parásito, se sintetizó una familia derivada de este péptido, compuesta por cinco compuestos. Las secuencias peptídicas contienen 2, 4, 6, 8 y 10 monómeros cíclicos *cis*- γ -amino-L-prolina, en los cuales el grupo N $^{\alpha}$ está modificado con el grupo butil-guanidinio. En todos los casos se acopló la CF (sonda fluorescente) en el extremo N-terminal (Tabla 14).

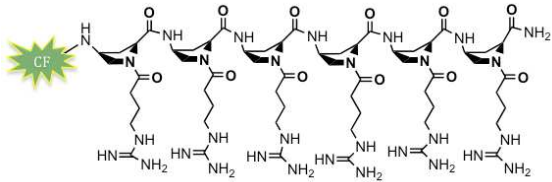
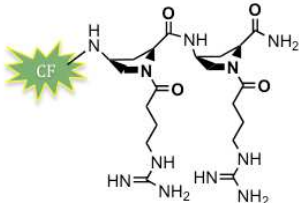
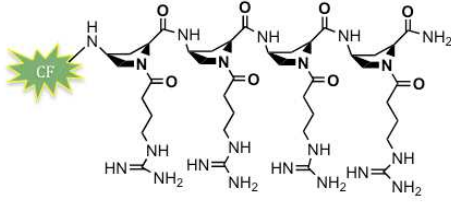
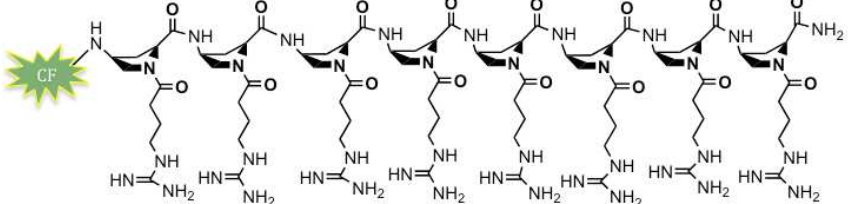
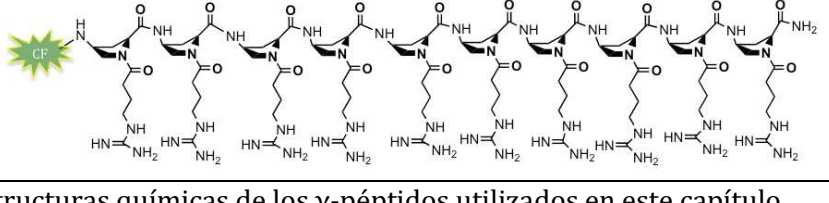
Nomenclatura	Estructura química
CF-Gp-11	
CF-Gp-12	
CF-Gp-13	
CF-Gp-14	
CF-Gp-15	

Tabla 14. Nomenclatura y estructuras químicas de los γ -péptidos utilizados en este capítulo.

Todos los péptidos se sintetizaron en fase sólida, utilizando la resina metilbenzhidrilamina (MBHA) como soporte sólido y la combinación de las estrategias Fmoc y Boc (Esquema 1).⁴⁸ El aminoácido no natural utilizado fue el Fmoc-(2*S*,4*S*)-Abpc,

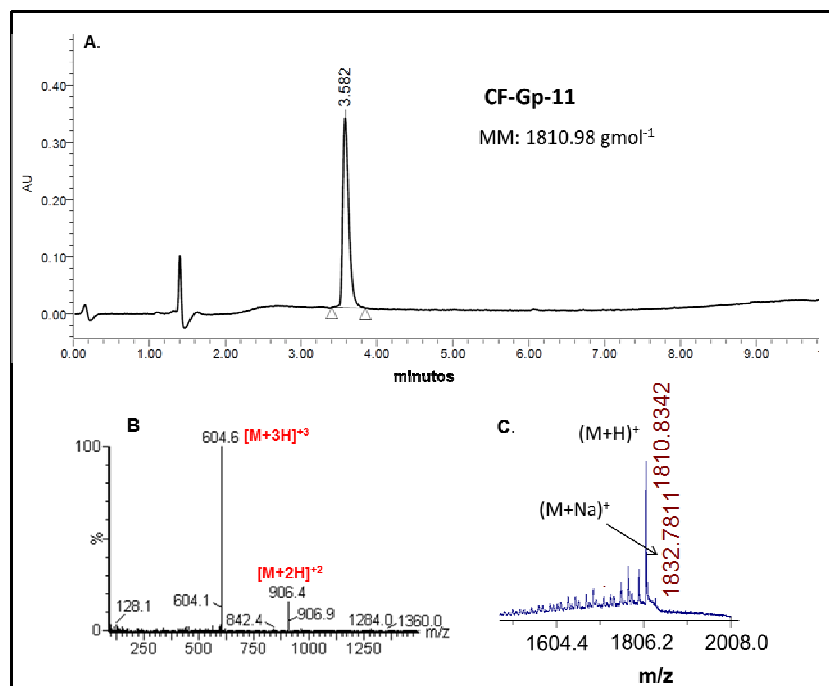


Figura 24. Caracterización del γ -péptido **CF-Gp-11**. **A.** Perfil cromatográfico, **B.** Espectro de masas (ESI-MS), **C.** Espectro de masas (MALDI-TOF). Condiciones de RP-HPLC: gradiente de 0% a 100% B en A en 8 min. (A: H₂O/TFA, 99.95:0.045; B: ACN/TFA, 99.96:0.036)

2.2.2 Capacidad de la familia del CF-Gp-11 de atravesar la membrana celular de *Leishmania donovani*.

Los promastigotes de *Leishmania donovani* se incubaron con los cinco péptidos sintetizados, a una concentración final de 10 μ M durante 1 h y se estudiaron utilizando la citometría de flujo (Figura 25) y la microscopía confocal (Figura 26, parte I), para evaluar la capacidad de estos compuestos de atravesar la membrana celular de dicho parásito. Se utilizó el **CF-Tat** como control positivo de todos los ensayos realizados. Estos estudios se realizaron en el CIB-CSIC de Madrid.

En los experimentos de citometría de flujo, al concluir el tiempo de incubación (1 h), se le adicionó yoduro de propidio (IP) al medio, con el objetivo de evaluar el daño celular de la membrana en el momento de la translocación del péptido. Después de 1 h de incubación con los péptidos a una concentración de 10 μ M, el porcentaje de células positivas para la entrada del IP fue siempre inferior al 5% (Figura 25, A). La microscopía confocal permitió confirmar los resultados obtenidos mediante citometría de flujo (Figura 26, parte I).

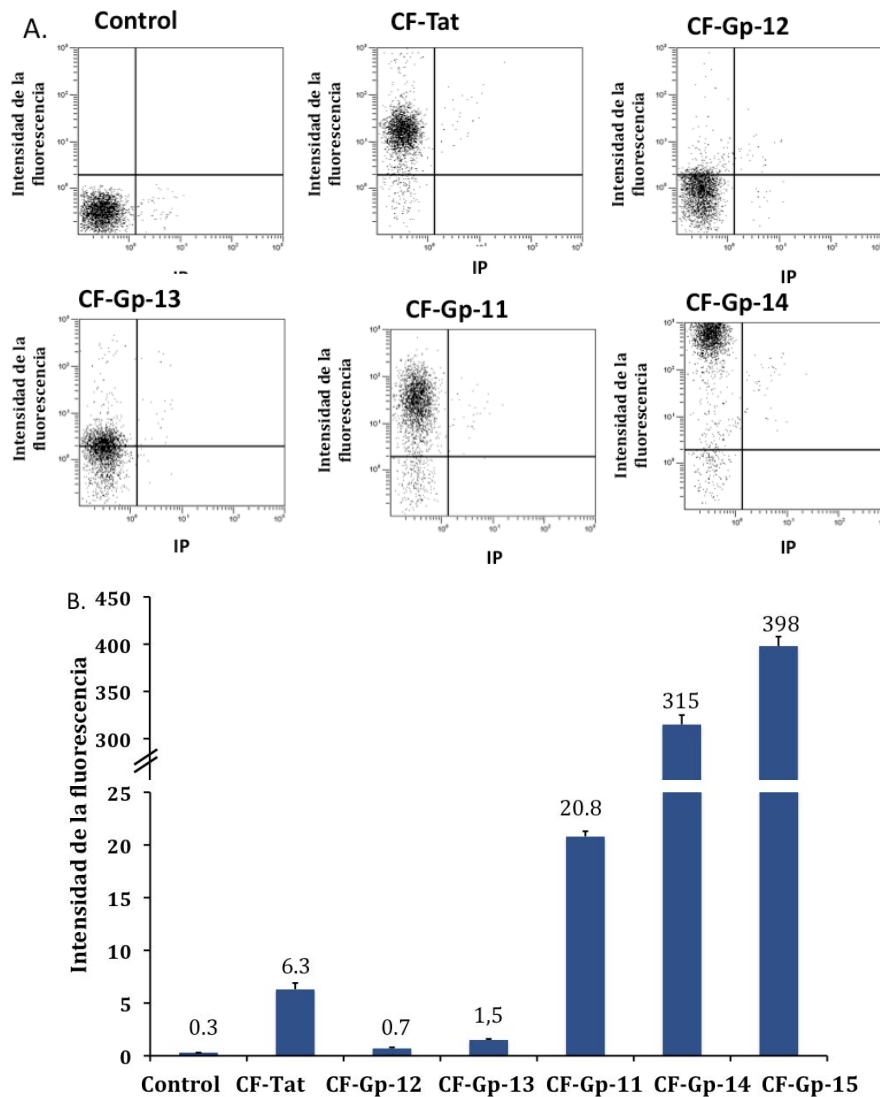


Figura 25. Entrada celular de los cinco γ -péptidos (CF-Gp-12, CF-Gp-13, CF-Gp-11, CF-Gp-14, CF-Gp-15) y el péptido CF-Tat (control positivo) en promastigotes de *Leishmania donovani* A. Histogramas biparamétrico de γ -péptidos fluorescentes (eje Y) y yoduro de propidio (IP, eje X), visualizan la incorporación de los γ -péptidos en este parásito B. Cuantificación fluorimétrica de la entrada celular de los compuestos probados en promastigotes, incubados con una disolución peptídica (10 μ M) durante 1 h a 37°C y coloreados con IP (5 μ g/mL).

Adicionalmente, se realizaron estudios de la inhibición de la reducción celular de MTT para determinar la toxicidad de los péptidos fluorescentes (Figura 26, parte II). Para ello, se utilizaron soluciones de los compuestos fluorescentes a una concentración de 10 μ M y se incubaron con las células durante 4 h. Los resultados mostraron una dependencia directa entre el incremento de la toxicidad y el aumento del número de residuos guanidínicos presentes en las secuencias peptídicas.

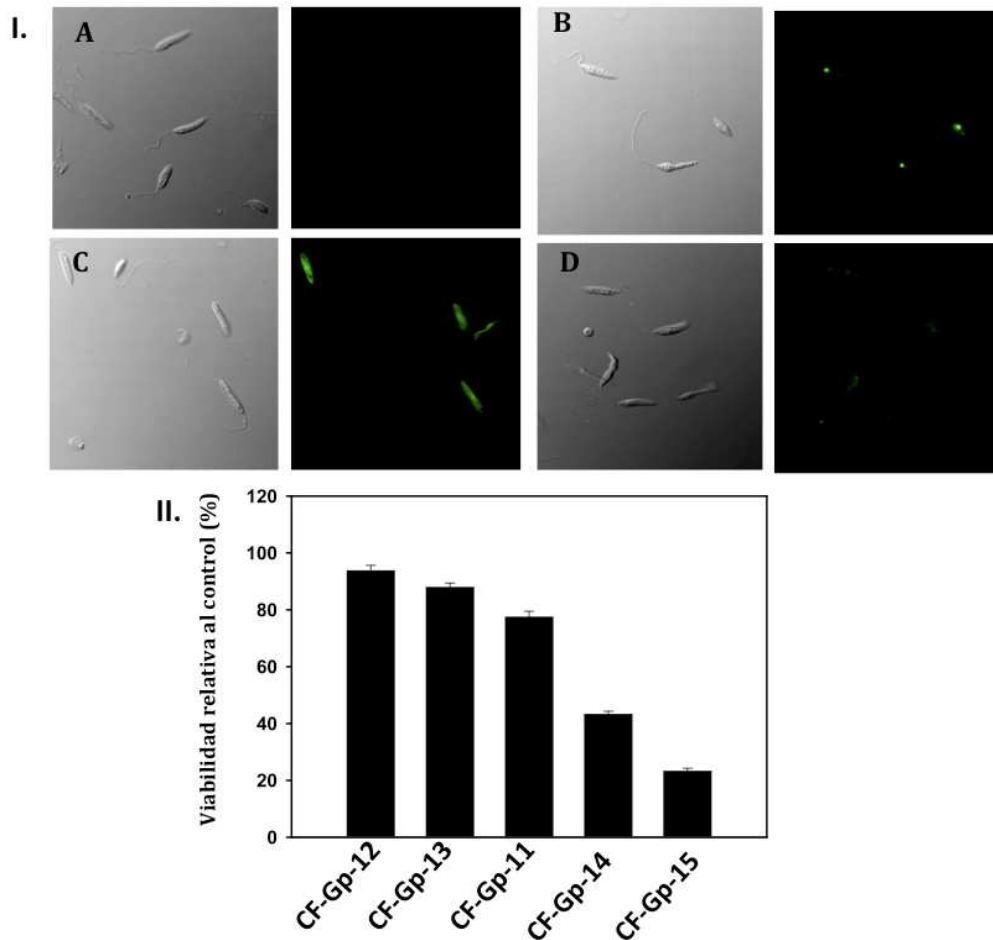


Figura 26. I. Imágenes de microscopía confocal de promastigotes de *Leishmania donovani* incubados 1 h con tres γ -péptidos guanidilados (A) **CF-Gp-13**, (B) **CF-Gp-14**, (C) **CF-Gp-15** y (D) **CF-Tat** (control positivo) todos preparados a una concentración final 10 μ M en PBS. **II.** Inhibición de la proliferación de promastigotes de *Leishmania donovani* (ensayo MTT). El tiempo de incubación de los parásitos con los γ -péptidos fue 4 h. Los datos están expresados como porcentaje relativo al parásito control en ausencia del péptido.

Los resultados de citometría de flujo y microscopía confocal muestran que los péptidos con 2 o 4 grupos guanidínicos (**CF-Gp-12** y **CF-Gp-13**) no mostraron capacidad de atravesar la membrana de este parásito, en cambio los péptidos con 6, 8 y 10 residuos guanidilados, al igual que el control **CF-Tat**, fueron capaces de atravesar su membrana celular (Figura 25, B y Figura 26, parte I). La capacidad de entrada de estos péptidos miméticos mostró un incrementó a medida que su secuencia contenía un mayor número de residuos guanidilados (10>8>>6 residuos). Desafortunadamente, también se determinó un aumento en su toxicidad directamente asociado al número de grupos guanidínicos presentes en cada secuencia, resultando más tóxico el péptido con 10 grupos guanidínicos (Figura 26, parte II).

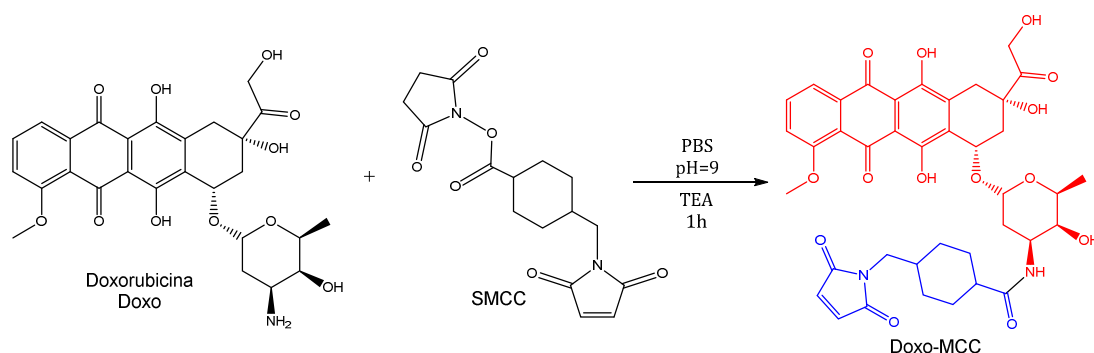
2.2.3 Gp-11 como vehículo transportador de fármacos: Conjugados doxorubicina-Gp-11 (Doxo-Gp-11) y Miltefosina-BODIPY-Gp-11 (MT-BODIPY-Gp-11).

Con el objetivo de demostrar la potencial aplicación de estos γ -péptidos como vehículos transportadores de fármacos, se sintetizaron dos conjugados del γ -péptido **Gp-11**, con doxorubicina (**Doxo-Gp-11**) y miltefosina-BODIPY (**MT-BODIPY-Gp-11**), para luego determinar la capacidad de estas entidades químicas de internalizarse en las células.

2.2.3.1 Síntesis y caracterización del conjugado doxorubicina-Gp-11 (Doxo-Gp-11).

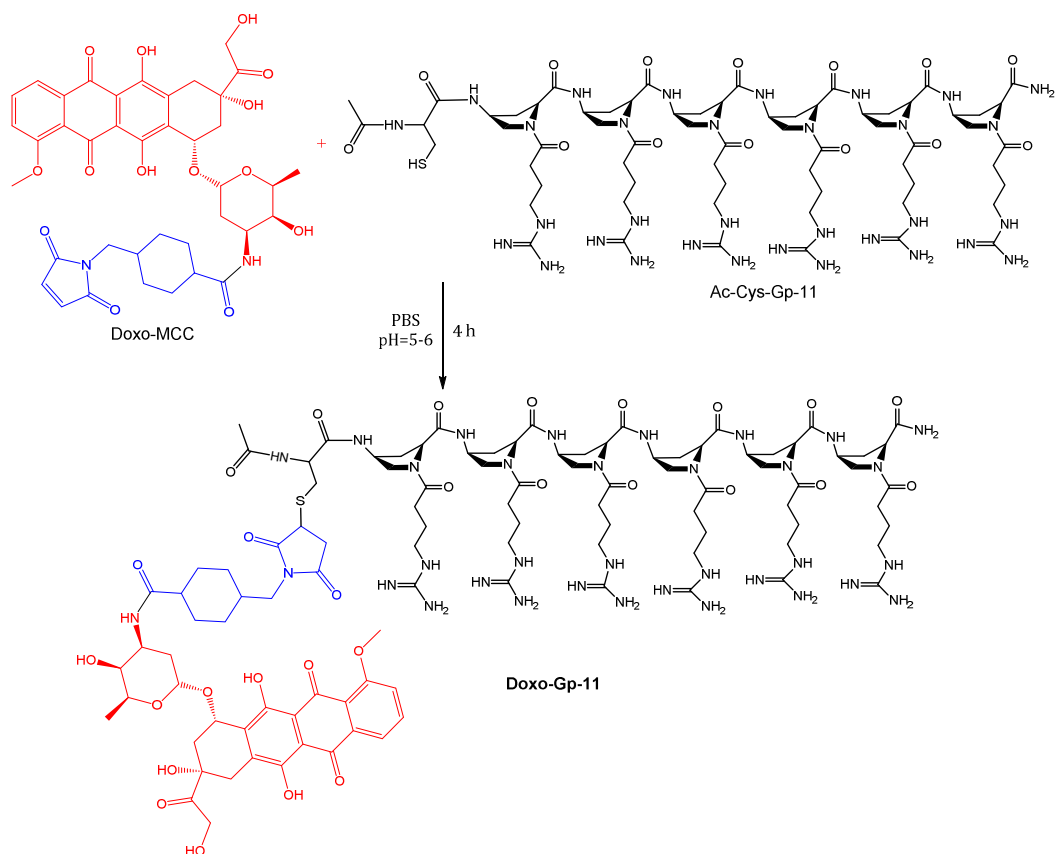
Para la obtención del conjugado **Doxo-Gp-11** se utilizó el procedimiento previamente publicado⁹⁴ con algunas modificaciones. En nuestro caso fue necesario funcionalizar adecuadamente tanto el fármaco, como la secuencia peptídica **Gp-11**. A la secuencia peptídica correspondiente a **Gp-11** se le añadió una cisteína en el extremo N-terminal, posteriormente se acetiló la secuencia inmovilizada en la resina, antes de la desprotección y la escisión final del péptido del soporte sólido (resina MBHA) utilizado en la síntesis de fase sólida de esta secuencia.

En el caso del fármaco, se funcionalizó la doxorubicina (**Doxo**) con el espaciador bifuncional SMCC vía formación de enlace amida y utilizando PBS como disolvente, para de esta manera obtener el fármaco funcionalizado con un grupo maleimido disponible para la unión con el péptido (Esquema 2). El pH de la reacción se mantuvo a 9 con la adición de TEA, condición necesaria para favorecer la formación del enlace amida. Esta reacción se monitoreó por RP-HPLC hasta la eliminación total del pico correspondiente a la **Doxo** en el perfil cromatográfico. Transcurrido el tiempo de reacción, se disminuyó el pH a 5-6 y se añadió a la mezcla el **Ac-Cys-Gp-11** disuelto en PBS (Esquema 3).



Esquema 2. Funcionalización de la de la **Doxo** con el espaciador bifuncional SMCC (Succinimidyl-4-[N-maleimidometil] cyclohexano-1-carboxilato, éster 4-(N-Maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de N-hidroxisuccinimida) vía formación de enlace amida.

La reacción de formación del conjugado **Doxo-Gp-11** se monitoreó por RP-HPLC. La reacción se detuvo al observar una disminución considerable del pico correspondiente a la **Doxo** funcionalizada con SMCC a las 4 h e inmediatamente el conjugado **Doxo-Gp-11** se separó de la mezcla utilizando RP-HPLC, para obtener el producto final **Doxo-Gp-11** con un rendimiento del 53 % y una pureza del 95% (Figura 27, A). La formación del conjugado se confirmó mediante espectrometría de masas exactas, donde fue posible identificar el pico correspondiente al ión molecular de este compuesto (Figura 27, B).



Esquema 3. Síntesis del conjugado **Doxo-Gp-11**

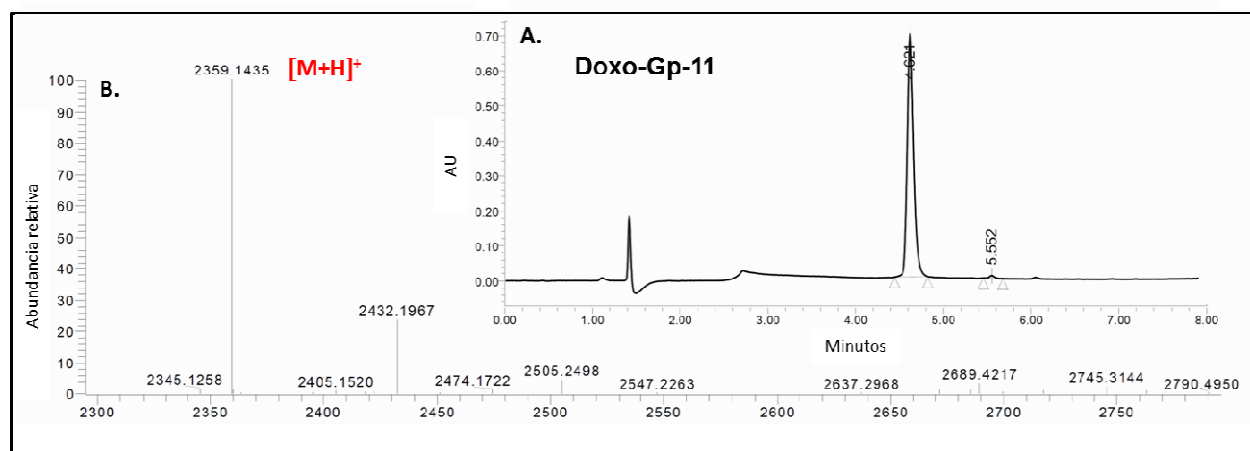
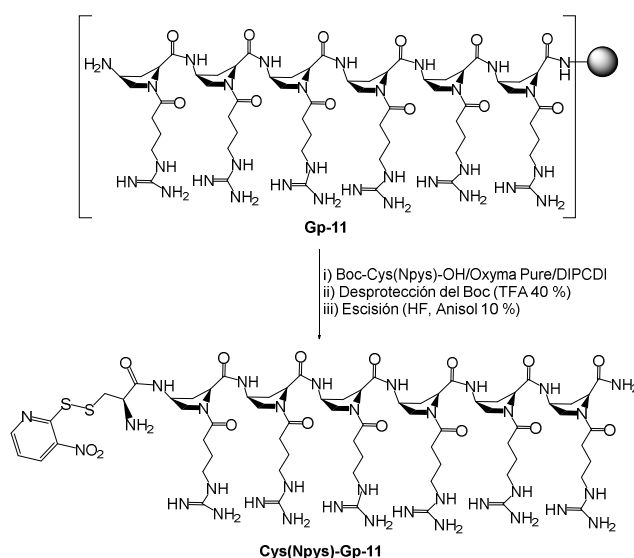


Figura 27. Caracterización del conjugado **Doxo-Gp-11**. **A.** Perfil cromatográfico y **B.** Espectrometría de masa exactas. Condiciones de RP-HPLC: gradiente de 0% a 100% B en A en 8 min. (A: H₂O/TFA, 99.95:0.045; B: ACN/TFA, 99.96:0.036)

2.2.3.2 Síntesis y caracterización del conjugado **Miltefosina-BODIPY-Gp-11 (MT-BODIPY-Gp-11)**

En el caso de la síntesis del conjugado **MT-BODIPY-Gp-11**, para su preparación se utilizó un procedimiento recientemente publicado,⁹⁵ con algunas modificaciones. En la síntesis en fase sólida de la secuencia peptídica **Gp-11** se añadió el aminoácido Boc-Cys(Npys)-OH a su extremo N-terminal, se eliminó el grupo protector Boc del grupo α amino de este aminoácido y finalmente se escindió el péptido de la resina, que se

purificó mediante RP-HPLC para obtener la secuencia **Cys(Npys)-Gp-11** convenientemente funcionalizada para la posterior formación del conjugado (Esquema 4). El intermediario peptídico se caracterizó mediante espectrometría de masas (ESI-MS y masas exactas) (Figura 28). En el espectro de masas se observó el pico correspondiente a la molécula sin el grupo Npys, debido a la fragmentación por el puente disulfuro presente en la secuencia que ocurre bajo las condiciones de RP-HPLC-ESI.



Esquema 4. Síntesis del péptido **Cys(Npys)-Gp-11**.

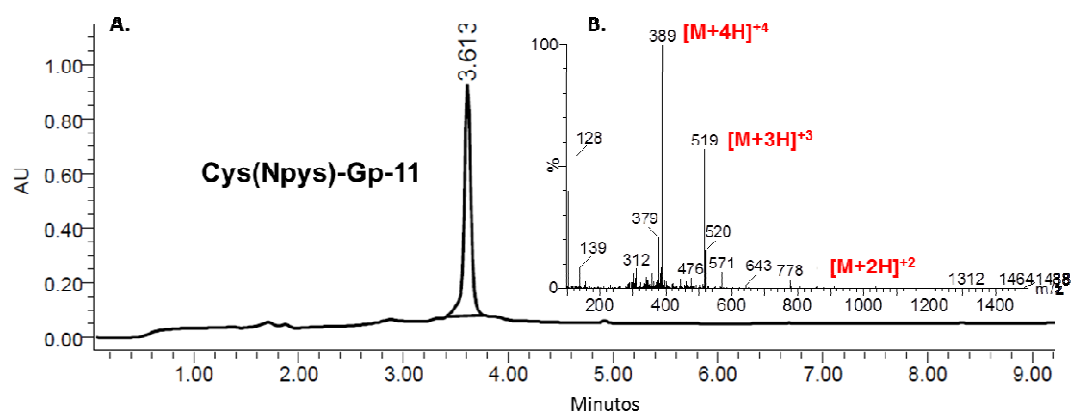
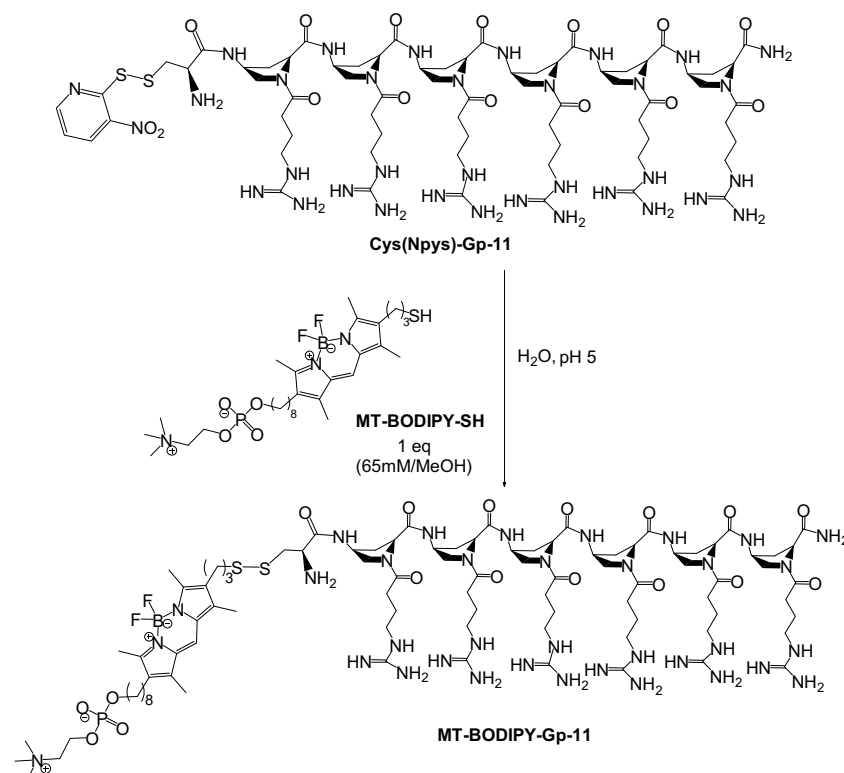


Figura 28. Caracterización del péptido **(Npys)-Cys-Gp-11**. **A.** Perfil cromatográfico y **B.** Espectrometría de masas (ESI-MS). Condiciones de RP-HPLC: gradiente de 0% a 70% B en A en 8 min. (A: H₂O/TFA, 99.95:0.045; B: ACN/TFA, 9.96:0.036)

Para la formación del conjugado, el péptido **Cys(Npys)-Gp-11** previamente sintetizado se disolvió en agua, se ajustó el pH a 5 y se le añadió la **MT-BODIPY-SH** (1 eq) de una solución 65 mM de este compuesto en metanol (Esquema 5), preparada en el laboratorio del Dr. Luis Rivas (CSIC). El avance de la reacción se controló con ayuda del RP-HPLC hasta la completa conversión del péptido e inmediatamente se purifica el conjugado mediante RP-HPLC, obteniéndose un 62% de rendimiento y 96% de pureza. El conjugado **MT-BODIPY-Gp-11** se caracterizó mediante espectrometría de masas,

identificándose el pico correspondiente al ión molecular del conjugado **MT-BODIPY-Gp-11**. (Figura 29)



Esquema 5. Síntesis del conjugado **MT-BODIPY-Gp-11**

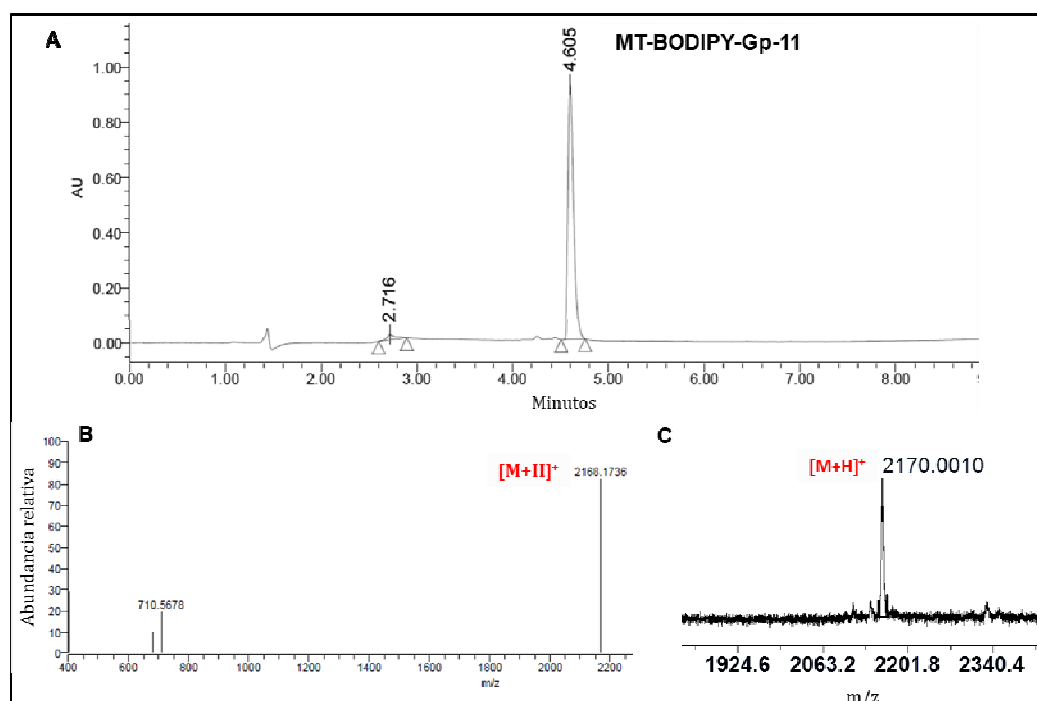


Figura 29. Caracterización del conjugado **MT-BODIPY-Gp-11**. **A.** Análisis mediante RP-HPLC y **B.** Espectrometría de masas exactas. Condiciones de RP-HPLC: gradiente de 0% a 100% B en A en 8 min. (A: H₂O/TFA, 99.95:0.045; B: ACN/TFA, 99.96:0.036)

Los conjugados **Doxo-Gp-11** y **MT-BODIPY-Gp-11** se obtuvieron con rendimientos y pureza adecuados para su posterior utilización en ensayos biológicos.

2.2.3.3 Capacidad del conjugado **Doxo-Gp-11** de atravesar la membrana celular de *Leishmania donovani*.

Con el objetivo de estudiar la capacidad del conjugado **Doxo-Gp-11** de atravesar barreras biológicas, se realizaron varios ensayos utilizando a *Leishmania donovani* como modelo *in vitro*.

Primeramente, se determinó la actividad leishmanicida del conjugado **Doxo-Gp-11**, de la doxorubicina libre (**Doxo**), del **Gp-11** y de una mezcla 1:1 del péptido libre y la **Doxo** (**Doxo+Gp-11**), a diferentes concentraciones (0-50 μM). Para ello, los parásitos se incubaron con las soluciones de estos compuestos durante 4 h y 72 h. Los ensayos de 4 h se realizaron en la solución salina equilibrada de Hank suplementada con glucosa 1% (pH 7.2) y los ensayos a 72 h en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal y glutamina (Figura 30).

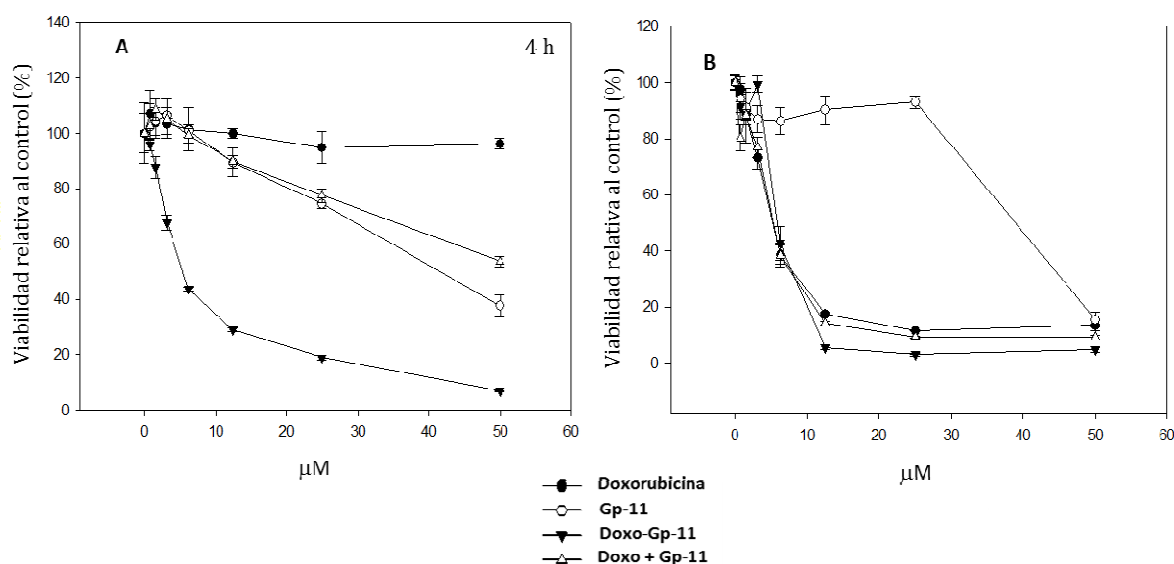


Figura 30. Actividad leishmanicida del conjugado **Doxo-Gp-11**, de la **Doxo**, el **Gp-11** y de una mezcla 1:1 del **Gp-11** y la **Doxo** a diferentes concentraciones (0-50 μM). Los tiempos de incubación fueron (A) 4 h y (B) 72 h. La grafica representa la viabilidad respecto al control (ensayo MTT).

Los ensayos realizados con los parásitos incubados durante 4 h (Figura 30, A) mostraron una fuerte disminución de la viabilidad celular relativa al control para el conjugado **Doxo-Gp-11**, alcanzando un 20% a una concentración de 25 μM . Al utilizar una solución del conjugado de 50 μM , el porcentaje de viabilidad celular alcanzado fue de un 10%. Por otra parte, la **Doxo** no presentó actividad leishmanicida a las 4 h en el rango de las concentraciones probadas. Tanto el **Gp-11** como la mezcla de este con la **Doxo** (1:1) mostraron un comportamiento similar a las 4 h de incubación en las células, con un 80% de viabilidad celular relativa al control al utilizar soluciones 20 μM ; a concentraciones superiores y hasta 50 μM , la viabilidad celular no resultó inferior al 40% (Figura 30, A).

Cuando el tiempo de incubación se aumentó a 72 h (Figura 30, B), el comportamiento se modifica. A una concentración de 10 μM de los compuestos **Doxo**, **Doxo-Gp-11** y la mezcla **Doxo+Gp-11**, la viabilidad celular relativa al control se redujo a valores inferiores al 20%, siendo prácticamente 0% el correspondiente al conjugado. Los ensayos correspondientes al **Gp-11** mostraron que a concentraciones inferiores a 25 μM no se afectó la viabilidad celular, sin embargo al aumentar la concentración, se observa una disminución drástica de la viabilidad celular hasta alcanzar una mortalidad celular superior al 80% (Figura 30, B).

i) Citometría de flujo.

Estudios de citometría de flujo, permitieron analizar la capacidad de internalización de la **Doxo** y nuestro conjugado **Doxo-Gp-11**. Los promastigotes de *Leishmania donovani* se incubaron durante 2 h y los histogramas obtenidos muestran claramente que solo se internaliza el conjugado (Figura 31, A).

Con el objetivo de determinar si el mecanismo de entrada de nuestro conjugado es o no dependiente de energía, se incubaron los promastigotes de *Leishmania donovani* con la **Doxo** o con el conjugado **Doxo-Gp-11** durante 2 h a 26°C y a 4°C y se cuantificó la intensidad de fluorescencia para cada caso (Figura 31, B).

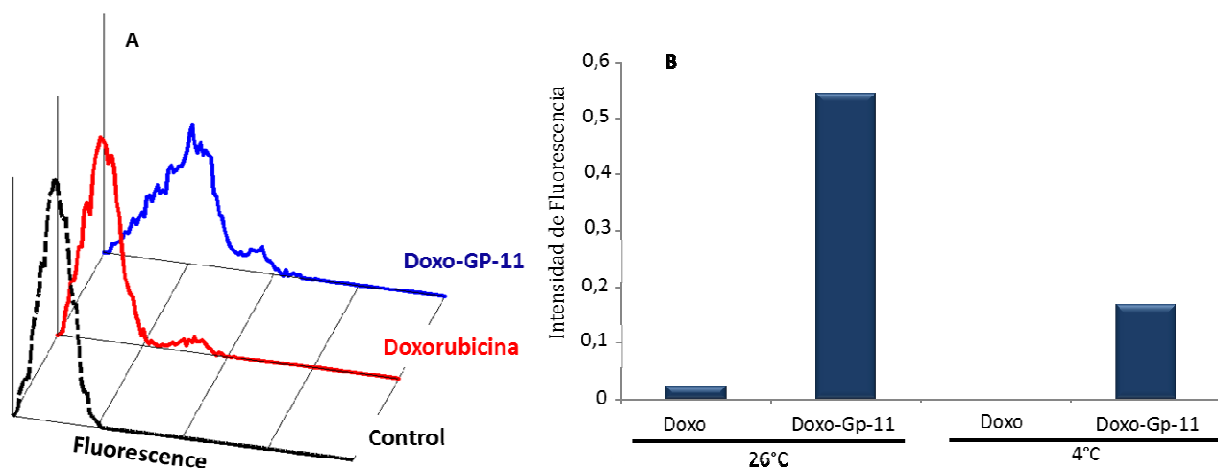


Figura 31. A. Superposición de histogramas de los análisis de citometría de flujo de la **Doxo**, el conjugado **Doxo-Gp-11** y el control en *Leishmania donovani*; B. Capacidad de entrada celular de la **Doxo** y del conjugado **Doxo-Gp-11** en promastigotes de *Leishmania donovani* durante 2 h, a 26°C y a 4°C. Los compuestos se añadieron hasta alcanzar una concentración final de 6 μM .

Los ensayos a 26°C mostraron que la intensidad de fluorescencia determinada para el conjugado fue muy superior a la detectada para la **Doxo**. A los 4°C se reduce en tres veces la intensidad de fluorescencia del conjugado, mientras que para la **Doxo** no se detecta fluorescencia (Figura 31, B).

Adicionalmente, se determinó la cinética de entrada de la **Doxo** y el conjugado **Doxo-Gp-11** en promastigotes de *Leishmania donovani* (Figura 32). Las células se incubaron con la **Doxo** y el conjugado **Doxo-Gp-11** y se determinó la intensidad de fluorescencia a diferentes intervalos de tiempo. El estudio demostró que el conjugado internaliza desde

los primeros minutos, incrementándose su internalización con el paso del tiempo. La **Doxo** sólo fue detectada a las 2 h de incubación.

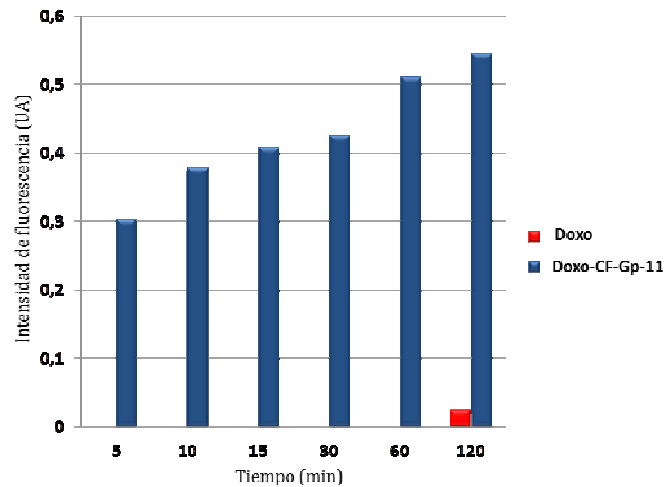


Figura 32. Cinética de entrada de **Doxo-Gp-11** y doxorubicina libre (**Doxo**) en *Leishmania donovani*, los parásitos se incubaron con los péptidos o la **Doxo** hasta 2h y se determinó la intensidad de fluorescencia cada 5 min.

ii) Monitoreo in vivo de los niveles de ATP intracelular en promastigotes de *Leishmania donovani* (cepa 3-Luc).

Se realizaron ensayos de bioluminiscencia para monitorear los niveles de ATP intracelular en promastigotes de *Leishmania donovani* transfectada con Px63neo-3Luc, que contienen el gen mutado de la luciferasa (cepa 3-Luc), previamente incubados con **Doxo-Gp-11** y **Doxo** a diferentes concentraciones. La bioluminiscencia es indicativa de los niveles de ATP, los cuales constituyen un factor indispensable del estado energético de *Leishmania*.¹⁸¹ Los resultados demostraron que la **Doxo-Gp-11** inhibe la fluorescencia, lo que indica una bajada de ATP citoplasmático, dependiente de la concentración del conjugado (Figura 33). La mayor disminución de ATP citoplasmático (80%) se produjo con la incubación de las células con el **Doxo-Gp-11** a una concentración final de 10 μ M. La **Doxo** presentó un comportamiento similar al control, detectándose una reducción del 20%. La incubación de los promastigotes con detergente Tx100 provoca la permeabilización completa de los parásitos.

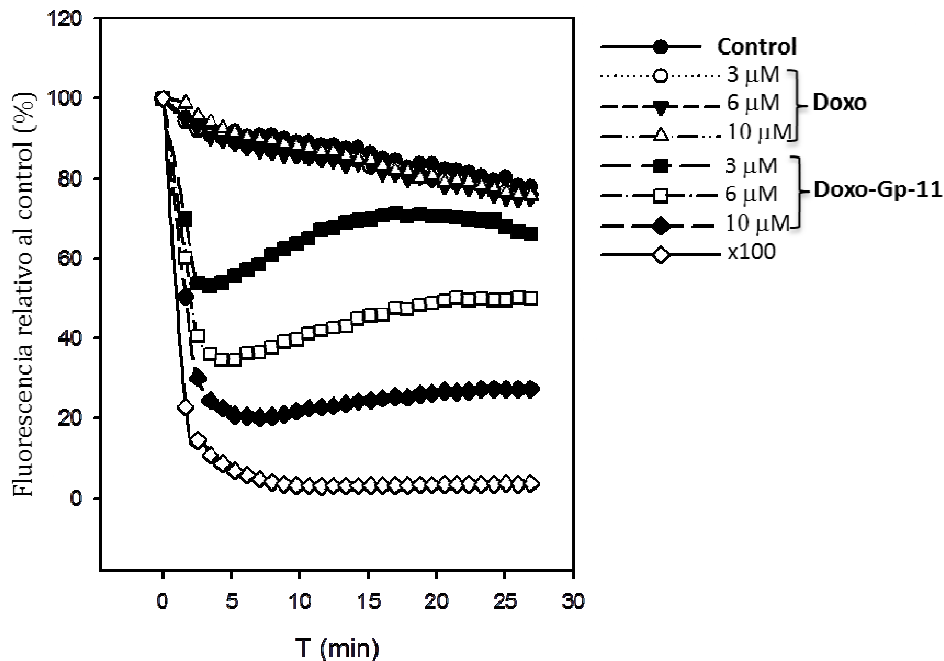


Figura 33. Variación de ATP intracelular de *Leishmania donovani* 3-Luc incubada con **Doxo-Gp-11** y **Doxo** a diferentes concentraciones finales (3 μm, 6 μm, 10μm).

iii) Microscopía confocal.

La microscopía confocal se utilizó con el fin de comprobar la capacidad de entrada del conjugado **Doxo-Gp-11** y de la **Doxo**, así como su localización intracelular en promastigotes de *Leishmania donovani*. Las incubaciones de los parásitos con los compuestos se realizaron a una concentración final de 6 μM y en presencia de DAPI, que marca el núcleo y el cinetoplasto de los parásitos (azul). Los parásitos no se fijaron y la observación se realizó a tiempo real.

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal mostraron la capacidad del conjugado **Doxo-Gp-1** para atravesar la membrana plasmática de los promastigotes de *Leishmania donovani* (Figura 34), mientras que la **Doxo** no fue capaz de hacerlo o si lo hace es en baja proporción, por debajo del rango de sensibilidad del detector del microscopio confocal. Los estudios de microscopía confocal confirmaron la información obtenida por citometría de flujo y el ensayo de bioluminiscencia, en donde se demuestra claramente la capacidad del γ -péptido para transportar la **Doxo**.

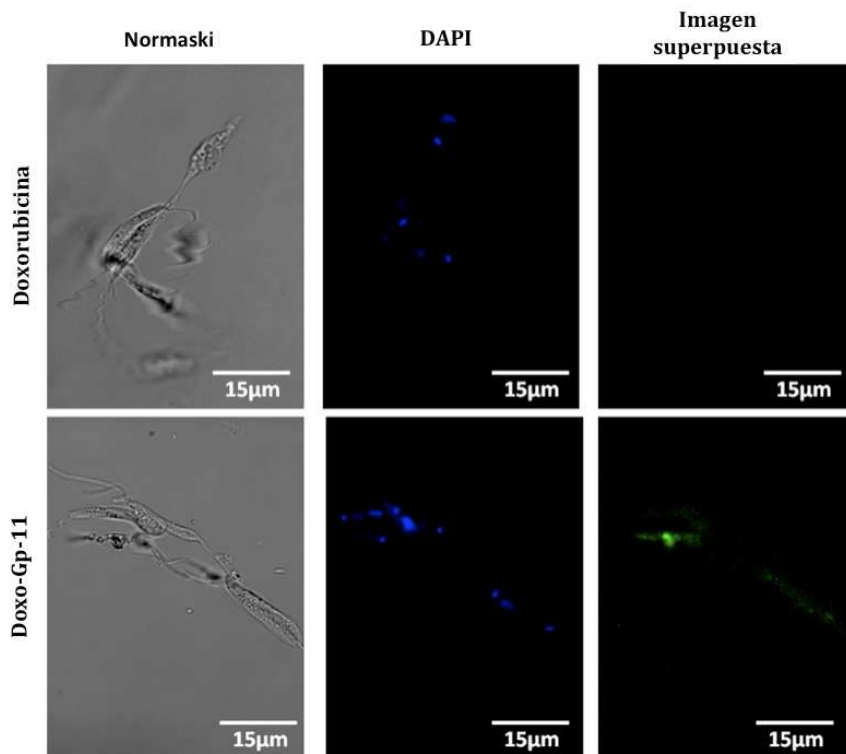


Figura 34. Imágenes de microscopía confocal para evaluar la capacidad del **Gp-11** como transportador de la **Doxo** en *Leishmania donovani* en tiempo real. Promastigotes fueron incubados con **Doxo-Gp-11** (verde) y la **Doxo** a una concentración de 6 μM en solución salina equilibrada de Hank suplementada con glucosa 1% durante 1 h a 26 °C.

2.2.3.4 Capacidad del conjugado MT-BODIPY-Gp-11 de atravesar la membrana celular de *Leishmania donovani*.

La miltefosina (**MT**) es un fármaco que se utiliza en el tratamiento de la leishmaniasis, pero su problema principal radica en que el parásito ha desarrollado resistencia frente a este fármaco. Por esta razón, a través de estos experimentos se evaluó la capacidad del γ -péptido para transportar la **MT** a través de la membrana plasmática de *Leishmania donovani* en una cepa sensible (WT) y en una cepa resistente a la miltefosina (R40). Promastigotes de estas dos cepas fueron incubados con el conjugado **MT-BODIPY-Gp-11** y la **MT** libre en una solución salina equilibrada de Hank durante 4 h.

Los datos obtenidos demostraron que los promastigotes sensibles a miltefosina (WT) incubados con los dos compuestos **MT-BODIPY-Gp-11** y **MT** presentaron una actividad leishmanicida similar (Figura 35, A). A concentraciones inferiores a 5 μM ambos compuestos provocaron una disminución de la viabilidad celular en un 60%. A concentraciones superiores, el fármaco disminuyó este parámetro a niveles inferiores que el conjugado. Estos resultados indican que a concentraciones superiores a 10 μM se favorece la entrada de **MT** en comparación con el conjugado, aunque las diferencias no resulten significativas.

Por otra parte, en los promastigotes resistentes a la **MT** se observó que a bajas concentraciones ($\leq 5 \mu\text{M}$) el conjugado **MT-BODIPY-Gp-11** presentó una mayor actividad leishmanicida con respecto a la **MT**. A concentraciones superiores y hasta los

20 μM , ambos compuestos provocan una disminución de la viabilidad celular, aunque continuó siendo el conjugado el que afectó mayor grado este parámetro (Figura 35, B).

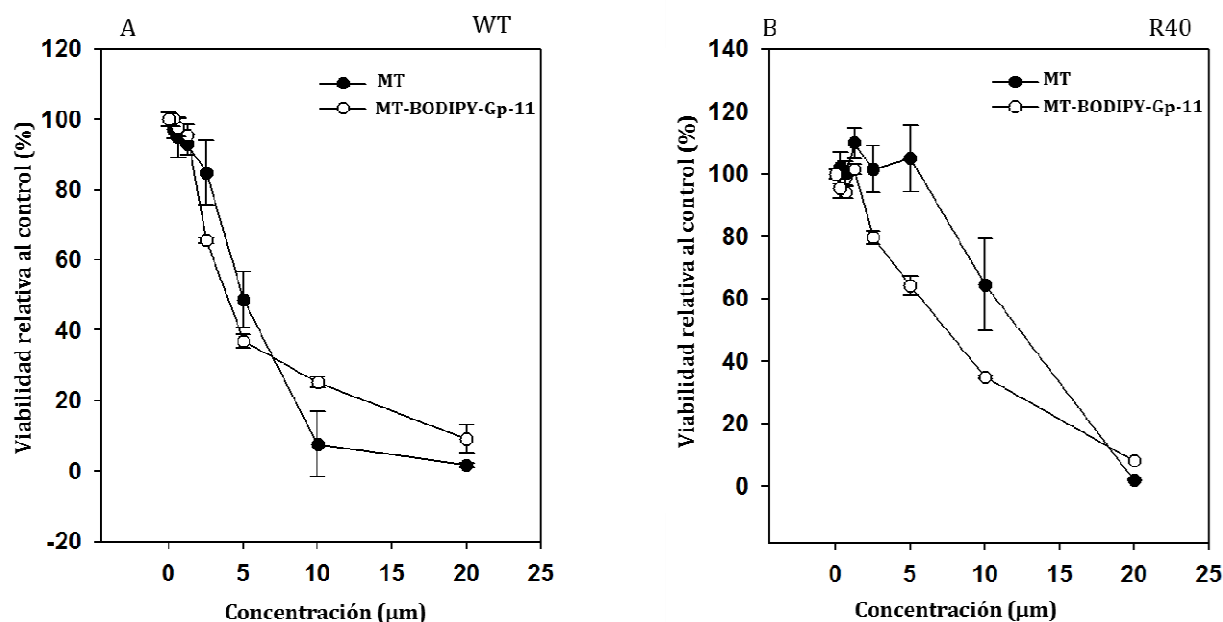


Figura 35. Actividad leishmanicida del conjugado **MT-BODIPY-Gp-11** y de la miltefosina (**MT**), a diferentes concentraciones (0-20 μM) durante 4 h. Las incubaciones se realizaron con promastigotes de *Leishmania donovani* (A) cepa sensible a miltefosina (WT) (MHOM/ET/67/L82); (B) cepa resistente a miltefosina (MHOM/ET/67/L82R40). La gráfica representa la viabilidad respecto al control.

i) Citometría de flujo

Se realizaron ensayos de citometría de flujo para determinar la inhibición de la entrada del conjugado en presencia de heparina. La heparina es un polianión soluble, que interactúa con el conjugado imposibilitando la unión de este compuesto a la superficie celular e inhibiendo la entrada a la célula. Para ello se preincubó el conjugado **MT-BODIPY-Gp-11** con heparina (1 mg/mL) y las células se incubaron con esta mezcla durante 3 h a 26°C. En ausencia de heparina las células incubadas con el conjugado **MT-BODIPY-Gp-11** mostraron valores elevados de intensidad de fluorescencia, indicando la internalización del compuesto (Figura 36). Los resultados obtenidos en presencia de heparina indican una fuerte inhibición en la entrada del conjugado provocado por la interacción de la heparina con el conjugado **MT-BODIPY-Gp-11**.

ii) Microscopía confocal

Los ensayos de microscopía confocal confirmaron los resultados anteriormente encontrados en la citometría de flujo. En las imágenes obtenidas para los promastigotes incubados con el conjugado en presencia de heparina no se observó la entrada del conjugado. En ausencia de heparina, las imágenes confirman la internalización de este compuesto (Figura 37).

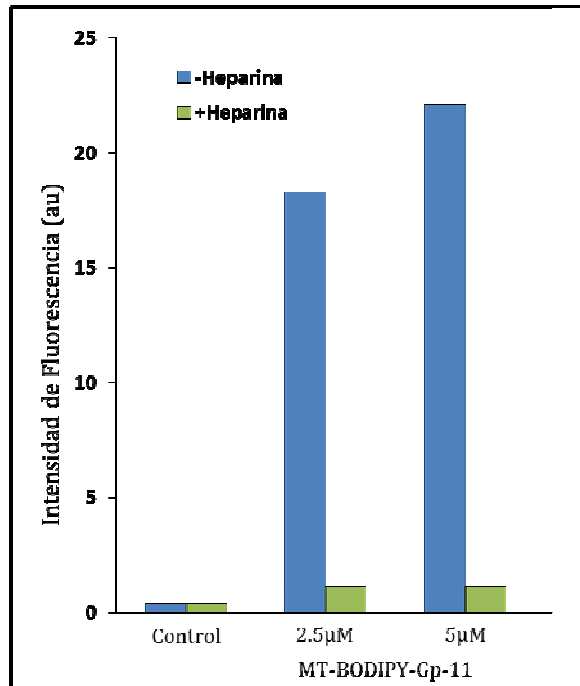


Figura 36. Inhibición de la entrada celular del conjugado **MT-BODIPY-Gp-11** en presencia de heparina a dos concentraciones (2.5 y 5 μM). Las incubaciones se realizaron en promastigotes de *Leishmania donovani* durante 3 h a 26°C.

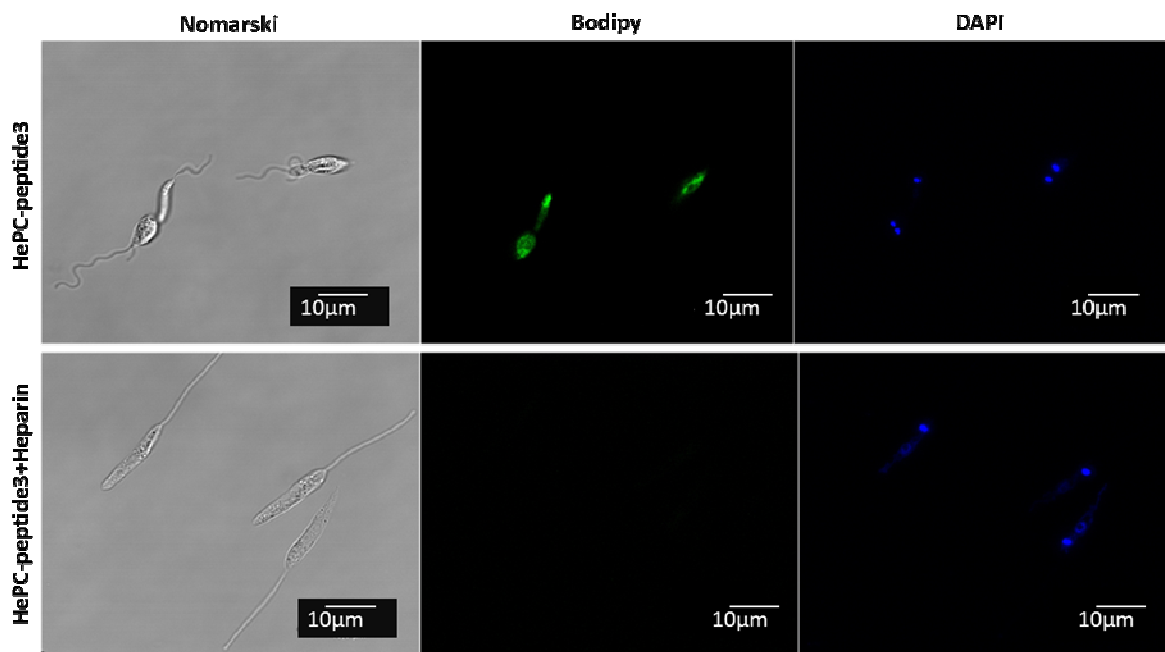


Figura 37. Imágenes de microscopía confocal. Inhibición de la entrada del conjugado **MT-BODIPY-Gp-11**, luego de preincubar el compuesto con heparina (1 mg/mL) durante 15 minutos. Los promastigotes se incubaron 15 minutos a 26°C.

2.3 Discusión

Se obtuvieron 5 γ -péptidos derivados del **CF-Gp-11** (Tabla 14) con las purezas adecuadas ($\geq 95\%$) para realizar los diferentes ensayos biológicos en promastigotes de *Leishmania donovani*. Todos fueron caracterizados mediante espectrometría de masas.

Estos compuestos son péptidos miméticos derivados de prolina, característica estructural que les confiere una elevada estabilidad frente a la proteólisis enzimática, lo que los convierte en potenciales candidatos como CPPs.

2.3.1 Relación estructura/capacidad de entrada celular en la familia derivada del CF-Gp-11.

Los resultados obtenidos en los ensayos de citometría de flujo (Figura 25) y microscopía confocal (Figura 26, parte I) demostraron que el número de grupos guanidínios influye en la propiedad de los péptidos para penetrar la membrana celular de *Leishmania*. En comparación con el control positivo **CF-Tat**, los péptidos con 2 o 4 grupos guanidínios no tuvieron la capacidad de atravesar la membrana de este parásito. En cambio, los péptidos con 6, 8 y 10 residuos guanidilados atraviesan la membrana celular de este parásito. El péptido **CF-Gp-11** mostró un valor de intensidad de fluorescencia 3 veces mayor que el control positivo **CF-Tat**, mientras que el **CF-Gp-14** y el **CF-Gp-15** mostraron valores extremadamente superiores. La capacidad de atravesar la membrana se incrementa en los péptidos miméticos a medida que aumenta la presencia de los residuos guanidilados (10 > 8 > 6 residuos) (Figura 25). Sin embargo, la toxicidad también se incrementó con el número de grupos guanidínios en cada secuencia, siendo el más tóxico el péptido que presenta 10 monómeros **CF-Gp-15** (Figura 26, parte II). Estos resultados demostraron la influencia marcada de los grupos guanidínios en la eficiencia de entrada celular, pero también su limitación relacionada con la toxicidad.

La presencia de residuos guanidínios en las cadenas laterales se asocian con la carga neta positiva de estos compuestos. En ningún caso se observó ninguna limitación en la entrada de estos péptidos relacionada con el aumento de la masa molecular. En cuanto a la toxicidad, el aumento de esta con el incremento de los residuos de grupos guanidínios, podría estar relacionado con la influencia de estos compuestos en la integridad de la membrana celular y con el tiempo de exposición. Al aumentar, tanto el tamaño como la carga neta de estas moléculas, podría incrementarse la superficie de interacción con la membrana celular, favoreciendo la entrada de estos compuestos a la célula, pero provocando alteraciones irreparables en la membrana, lo que explicaría el incremento de la toxicidad.

Podemos concluir que el péptido con seis prolinas modificadas con grupos guanidínios (**CF-Gp-11**) resultó el más eficiente para ser utilizado como transportador de fármacos para este tipo de parásitos. El **CF-Gp-11** mostró que internaliza en las células a niveles tres veces superiores que el control positivo **CF-Tat**, además de tener una baja toxicidad. Este comportamiento fue consistente con resultados publicados previamente acerca de la importancia de la presencia de los grupos guanidínios^{45,110,182} y los residuos prolina^{87,89} en la internalización de los péptidos en células de mamíferos.

Teniendo en cuenta los resultados alcanzados en este estudio, decidimos utilizar el **Gp-11** como transportador de fármacos con actividad leishmanicida como la **Doxo** y la **MT**.

2.3.2 Conjugados doxorubicina-Gp-11 (**Doxo-Gp-11**) y Miltefosina-BODIPY-Gp-11 (**MT-BODIPY-Gp-11**).

Al analizar las estructuras químicas de los fármacos (**Doxo** y **MT**), decidimos utilizar un espaciador no lábil como el SMCC para la unión entre la **Doxo** y el **Gp-11** y la formación de un puente disulfuro para unir la **MT-BODIPY** al **Gp-11** (Figura 38). Como explicamos anteriormente (Epígrafe 2.2.3.1 y 2.2.3.2) fue necesario realizar una pequeña modificación en la secuencia peptídica, adicionando una cisteína al extremo N-terminal del **Gp-11**.

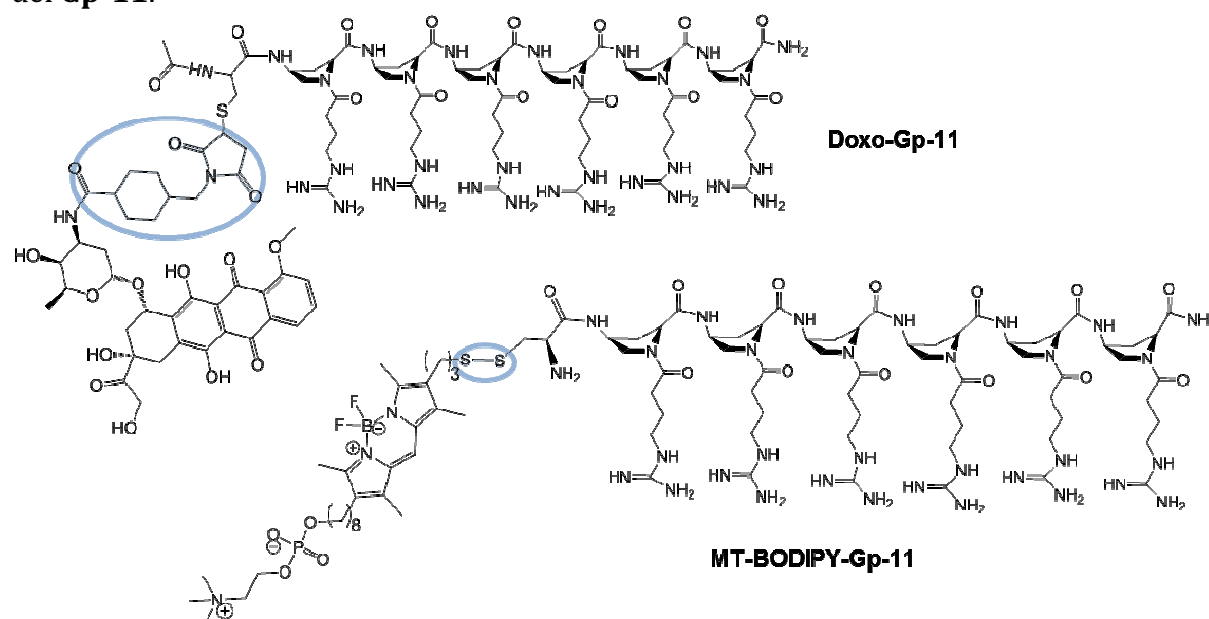


Figura 38. Conjugados doxorubicina-Gp-11 (**Doxo-Gp-11**) y miltefosina-BODIPY-Gp-11 (**MT-BODIPY-Gp-11**) sintetizados en este trabajo.

Mientras que la utilización del SMCC como espaciador nos permitió obtener un conjugado estable, el puente disulfuro presente en el conjugado **MT-BODIPY-Gp-11** tiene la capacidad de reducirse en el interior de la célula y liberar el fármaco. Ambas estrategias han sido utilizadas con éxito con anterioridad.^{94,177,183} El objetivo fue demostrar la eficacia de la secuencia peptídica **Gp-11** como transportador de fármacos.

2.3.2.1 Capacidad del Gp-11 de transportar Doxo en *Leishmania donovani*: Conjugado Doxo-Gp-11.

i) Doxo-Gp-11 como agente leishmanicida.

La actividad leishmanicida determinada para el conjugado **Doxo-Gp-11**, se comparó con la actividad de la **Doxo**, del **Gp-11**, así como de una mezcla 1:1 de estos compuestos (**Doxo+Gp-11**). Luego de 4 h de incubación, el conjugado mostró una elevada actividad a concentraciones inferiores a 10 μM ($\text{IC}_{50}=6 \mu\text{M}$), mientras que el resto de las muestras probadas no mostraron una disminución considerable de la viabilidad celular en este rango de concentraciones. Estos resultados evidencian la importancia de la unión

covalente entre el **Gp-11** y el fármaco (**Doxo**). El péptido fue capaz de internalizar cantidades suficientes de **Doxo** como para provocar el efecto detectado. A concentraciones superiores a 10 μM , excepto la **Doxo**, todas las muestras analizadas provocaron una disminución en la viabilidad celular (Figura 30, A).

Al aumentar el tiempo de exposición de los parásitos frente a estos compuestos, resultó que a concentraciones de 10 μM y luego de 72 h de incubación, todas las muestras (**Doxo**, **Doxo-Gp-11** y **Doxo+Gp-11**) excepto el **Gp-11**, provocaron una disminución de la viabilidad celular a valores inferiores al 20%. A partir de concentraciones de 25 μM , el **Gp-11** comenzó a afectar la viabilidad celular, comportándose de manera similar al resto de las muestras. Este resultado es consistente con lo que se conoce acerca de la relación entre la actividad y la concentración y el tiempo de exposición de las células a los diferentes compuestos (Figura 30, B).

ii) Capacidad del conjugado Doxo-Gp-11 de internalizar en promastigotes de *Leishmania donovani*.

Los estudios de citometría de flujo realizados (Figura 31, A), permitieron determinar que, a diferencia de la **Doxo**, el conjugado **Doxo-Gp-11** internaliza en los promastigotes de *Leishmania donovani*. Por otra parte, los ensayos realizados a 26°C y 4°C (Figura 31, B) avalan la hipótesis de que el mecanismo de entrada del conjugado sea dependiente de energía, debido a la disminución de la capacidad de entrada celular del conjugado **Doxo-Gp-11** al realizar la incubación de las células a 4°C.

El estudio cinético realizado para analizar la entrada del conjugado **Doxo-Gp-11** (Figura 32) demostró que **Doxo-Gp-11** es capaz de internalizarse en las células desde los primeros 5 min, con el transcurso del tiempo, la entrada continuó de manera gradual. Para el caso de la **Doxo**, sólo se observó su entrada a la célula a las 2 h de incubación, reafirmando la importancia de la unión fármaco-CPP.

Adicionalmente, se determinaron los niveles de ATP intracelular de *Leishmania donovani* (cepa 3-Luc) incubadas con **Doxo-Gp-11** y **Doxo** a diferentes concentraciones (Figura 33). El conjugado **Doxo-Gp-11** fue capaz de variar considerablemente los niveles de ATP intracelular a valores que resultaron inferiores, a medida que aumentamos la concentración utilizada del conjugado. Este efecto, podría estar directamente relacionado con que ante la presencia de este compuesto, la glicólisis no es capaz de compensar la bajada de ATP, afectándose la proliferación de promastigotes.¹⁸¹

Las imágenes de microscopía confocal avalaron todos los ensayos anteriormente realizados, confirmando la entrada del conjugado **Doxo-Gp-11** a los promastigotes de *Leishmania donovani*, mientras que la **Doxo** no fue detectada (Figura 34).

Todos los ensayos realizados, indican que la unión covalente entre el **Gp-11** y la **Doxo**, favorecen la entrada del fármaco a la célula. Por otra parte, el conjugado presentó una actividad leishmanicida elevada a bajas concentraciones y se comprobó que su entrada ocurre desde los primeros 5 minutos de exposición. La utilización de **Gp-11** como CPP transportador de **Doxo** constituye el primer ejemplo que confirma el potencial de este péptido para su utilización en la distribución de fármacos.

2.3.2.2 Capacidad de MT-BODIPY-Gp-11 de internalizar en promastigotes de *Leishmania donovani*.

Como mencionamos anteriormente, la **MT** es un reconocido fármaco leishmanicida frente al que algunas cepas de *Leishmania* (como la R40) han desarrollado resistencia. En este trabajo, se analizó la capacidad de un conjugado formado mediante un enlace covalente del tipo puente disulfuro entre el fármaco **MT** y el **Gp-11**, de internalizarse en células de *Leishmania donovani*, tanto sensibles como aquellas resistentes a **MT**.

El conjugado **MT-BODIPY-Gp-11** mostró una actividad leishmanicida muy similar a la **MT**, a diferentes concentraciones en las cepas sensibles a **MT**. A concentraciones inferiores a 10 μM , ambos compuestos mostraron una viabilidad celular inferior al 20 %. Al utilizar cepas resistentes a **MT**, a concentraciones menores de 10 μM , el conjugado mostró niveles de viabilidad celular inferiores a la **MT**. El efecto de ambos a concentraciones superiores presentó una tendencia similar. El resultado mostrado por ambos compuestos, **MT-BODIPY-Gp-11** y **MT** frente a cepas resistentes, demuestra que a bajas concentraciones ($\leq 5 \mu\text{M}$), el parásito no mostró resistencia frente al conjugado y si frente a la **MT**. Al aumentar la concentración de ambos, el efecto leishmanicida se dispara debido a factores asociados con la elevada concentración de ambos compuestos en el medio (Figura 35).

Por otra parte, los estudios de la inhibición de la entrada celular del conjugado **MT-BODIPY-Gp-11** y del **Gp-11** en presencia de heparina, demostraron que el conjugado interacciona con la heparina, impidiéndose de esta manera su interacción con la superficie de la membrana celular y su entrada a la célula (Figura 36). Este comportamiento se debe a que la heparina es un polianión soluble que interacciona con la secuencia peptídica **Gp-11** que forma parte del conjugado, impidiendo su interacción con los proteoglicanos expuestos en la superficie de la membrana celular. Resultados similares se han encontrado para estudios realizados con el péptido **Tat** en células humanas.¹⁸⁴ Las imágenes de promastigotes incubados con **MT-BODIPY-Gp-11** y con el conjugado preincubado con heparina, confirmaron que el conjugado fue capaz de atravesar la membrana plasmática, mientras que en presencia de heparina no se observó internalización del compuesto.

La actividad leishmanicida del conjugado **MT-BODIPY-Gp-11** fue similar a la de la **MT** a las diferentes concentraciones probadas en los promastigotes sensibles a **MT**. Frente a promastigotes resistentes a **MT** y a concentraciones inferiores a 5 μM , mientras la cepa evidenció su resistencia ante la **MT**, el conjugado afectó la viabilidad celular hasta valores de un 60% a una concentración de 5 μM . Al aumentar la concentración de ambos compuestos, se observa una tendencia similar hacia la disminución de la viabilidad celular. Estos resultados nos indicaron que a bajas concentraciones ($\leq 5 \mu\text{M}$) la cepa R40 no mostró resistencia ante el conjugado **MT-BODIPY-Gp-1** y si ante la **MT** libre. Esto resulta esperanzador en la búsqueda de una estrategia de respuesta farmacológica ante el desarrollo de resistencia por parte del parásito frente a los diferentes fármacos.

Conclusiones

- Se sintetizaron cinco γ -péptidos derivados del **CF-Gp-11** formados por 2, 4, 6, 8 y 10 monómeros cíclicos *cis*- γ -amino-L-prolina, en los cuales el grupo N $^{\alpha}$ está modificado con un grupo alquil-guanidinio.
- Se demostró que los compuestos **CF-Gp-12** y **CF-Gp-13**, con 2 y 4 residuos guanidinos respectivamente, no atraviesan la membrana celular. Los γ -péptidos con 6, 8 y 10 residuos guanidilados, **CF-Gp-11**, **CF-Gp-14** y **CF-Gp-15**, respectivamente; atravesaron la membrana celular a cantidades superiores al control positivo **CF-Tat**. La capacidad de entrada a los promastigotes de *Leishmania donovani* fue proporcional al número de residuos guanidilados (**CF-Gp-11**<<**CF-Gp-14**<**CF-Gp-15**)
- Los γ -péptidos con 8 y 10 monómeros guanidilados **CF-Gp-14** y **CF-Gp-15**, respectivamente, presentaron una elevada toxicidad, en comparación con el **CF-Gp-11**.
- El **CF-Gp-11** resultó el mejor candidato para su evaluación como transportador de fármacos.
- Se sintetizaron dos conjugados de la **Doxo** y la **MT-BODIPY** con la secuencia peptídica **Gp-11**. Se utilizó la formación de un enlace covalente entre el espaciador no lábil SMCC y la secuencia peptídica **Gp-11** para la **Doxo** y la formación de un enlace disulfuro para la **MT-BODIPY**.
- El conjugado **Doxo-Gp-11** internalizó en promastigotes de *Leishmania donovani*, a diferencia de la **Doxo**, que no fue capaz de atravesar la membrana celular, en ensayos realizados con 4 h de incubación. Al aumentar el tiempo de exposición a 72 h, ambos compuestos fueron capaces de atravesar la membrana celular.
- Se determinó que el conjugado **Doxo-Gp-11** internalizó en los promastigotes de *Leishmania donovani* mediante un mecanismo dependiente de energía. Además, el estudio cinético demostró que la entrada a la célula ocurre desde los primeros 5 min aumentando gradualmente con el tiempo; a diferencia de la **Doxo** que sólo fue detectada a las 2 horas.
- El conjugado **Doxo-Gp-11** provocó una bajada de ATP citoplasmático a diferentes concentraciones, efecto que no fue observado para la **Doxo** bajo las mismas condiciones.
- El conjugado **MT-BODIPY-Gp-11** presentó una actividad leishmanicida similar a la **MT** libre, frente a cepas de *Leishmania donovani* sensibles a **MT**.
- Frente a cepas de *Leishmania donovani* resistentes a **MT**, el conjugado **MT-BODIPY-Gp-11** presentó actividad leishmanicida a concentraciones $\leq 5 \mu\text{M}$,

mientras que en este mismo rango de concentraciones, se evidencia la resistencia del parásito frente a la **MT**. A mayores concentraciones, ambos compuestos provocan la disminución progresiva de la viabilidad celular.

- El conjugado **MT-BODIPY-Gp-11** preincubado con heparina, no atravesó la membrana celular de promastigotes de *Leishmania donovani*, esto sugiere que la unión del péptido **Gp-11** catiónico a los componentes altamente aniónicos de la membrana del parásito es un paso importante en la entrada celular.
- Se demostró que el **Gp-11** puede ser una buena elección como CPP a utilizar en la distribución de fármacos.

CAPÍTULO 3. Evaluación de γ -péptidos como potenciales transportadores a través de la barrera hematoencefálica en el modelo *Drosophila melanogaster*.

Contribuciones a este capítulo: Todo el trabajo de microscopía confocal de este capítulo, se realizó en colaboración con la Dra. Elena Rebollo (Unidad de Microscopía de Fluorescencia avanzada, IBMB-PCB). Los conjugados Atto, así como algunos de los péptidos modelos fueron sintetizados por Imma Farràs (Unidad de Química Combinatoria, PCB)

3.1 Introducción

3.1.1 La barrera hematoencefálica (BHE) en vertebrados.

La barrera hematoencefálica (BHE) es una estructura compleja constituida principalmente por células endoteliales de la red capilar del sistema nervioso central (SNC), cuyas funciones son la protección del cerebro y el transporte selectivo de la red capilar al parénquima cerebral. Para ello la BHE actúa como una barrera física, metabólica y de transporte que regula selectivamente: la entrada de nutrientes, la salida de moléculas tóxicas, mantiene el equilibrio iónico y proporciona un ambiente óptimo para llevar a cabo las funciones neuronales.^{185,186,187}

Desde el punto de vista morfológico, la BHE de los vertebrados es una formación densa de células endoteliales que recubre los capilares del cerebro. Se caracteriza porque cada borde celular está íntimamente unido a la célula adyacente, formando lo que se denominan uniones estrechas intercelulares, que hacen impermeable a la pared interna del capilar. Además, la BHE está cubierta por una matriz extracelular, la lámina basal abluminal y los pericitos, así como terminaciones neuronales y prolongaciones de los astrocitos perivasculares.^{185,188-190} (Figura 39)

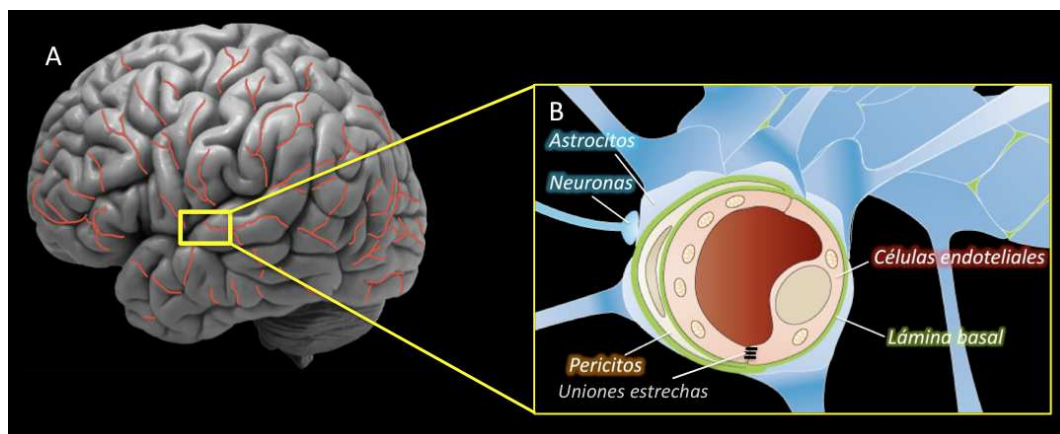
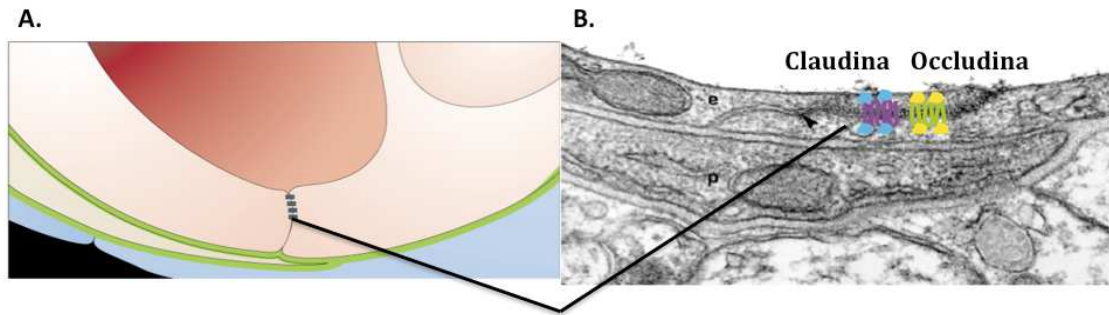


Figura 39. Anatomía de la barrera hematoencefálica en vertebrados. A. Cerebro humano con los microcapilares. B. Composición de la BHE en vertebrados.

Las uniones estrechas (TJ, *Tight Junction*) presentes entre las células endoteliales adyacentes son las responsables del funcionamiento como barrera física de la BHE, encargándose, de controlar el transporte paracelular o difusión de moléculas pequeñas (por ejemplo: moléculas gaseosas como el CO₂ y O₂, iones, agentes lipofílicos), entre el compartimento humoral e intersticial del SNC. El sellado del endotelio se asocia a la formación de intrincados complejos entre proteínas de membrana (claudinas, ocludina y molécula de adhesión de la unión-1) con otras proteínas citoplasmáticas accesorias (proteínas de la *zonula occludens*, ZO-1 y ZO-2, cingulina, afadina, AF-6, y 7H6). Estos están vinculados con el citoesqueleto de actina, formando así íntimas conexiones intercelulares (Figura 40).¹⁸⁶



Uniones estrechas

Figura 40. Esquema de la BHE con las uniones estrechas, las cuales están compuestas principalmente por claudinas y ocludinas.

El papel del BHE como barrera metabólica es controlado por diferentes enzimas, tales como proteasas, nucleotidasas, citocromo P450, oxidasas, entre otras, las cuales metabolizan las moléculas en tránsito.¹⁸⁶

Por último, el rol de BHE como barrera de transporte se debe a la expresión y localización polarizada de transportadores que involucran diferentes mecanismos y que regulan el paso de soluto.^{3,186,191-193} El transporte de moléculas a través de la BHE es controlado de forma bidireccional e intervienen diferentes mecanismos de transporte entre los que se encuentran (Figura 41):

- El transporte mediado por lípidos o difusión transcelular, en especial para moléculas lipofílicas.^{44,194}
- El transporte mediado por proteínas transportadoras, estas últimas transfieren nutrientes, vitaminas y hormonas.¹⁸⁹
- El transporte activo de salida que restringe la entrada de medicamentos y moléculas exógenas al cerebro. Dentro de este grupo se encuentran los transportadores ABC (*ATP Binding Cassette*) dependientes de energía, tales como la glicoproteína P-1 (P-gp) o las proteínas con resistencia asociada a multifármacos (MRP, *Multidrug Resistance-associated Protein family*). Estos transportadores son proteínas transmembranales que utilizan la hidrólisis del adenosina trifosfato (ATP) para translocar solutos a través de la membrana en los mamíferos.^{3,192,195,196} También, existe otra clase de transportadores no dependientes de energía, que son miembros de la familia génica de transportadores de soluto (SLC, *Solute Carrier*) e incluye transportadores iónicos orgánicos (OATP, *Organic Anion-Transporting Polypeptide* y OAT, *Organic Anion Transporter*).¹⁹⁷
- El transporte mediado por adsorción para moléculas catiónicas, que es un mecanismo poco específico en comparación a la transcitosis por receptor.¹⁹⁸⁻²⁰²
- El transporte mediado por receptores, los cuales son expresados por las células endoteliales y las terminaciones de los astrocitos de los capilares del cerebro y facilitan el transporte de macromoléculas en el cerebro. En este grupo se

encuentran los receptores de transferrina (TfR), de insulina, de la lipoproteína de baja densidad (LDLR, *Low density Lipoprotein Receptor*) y los receptores de las proteínas 1 y 2 relacionadas con la lipoproteína de baja densidad (*Low-density lipoprotein related proteins 1 and 2 receptors*, LRP1 y LRP2), entre otros.^{44,201,203}

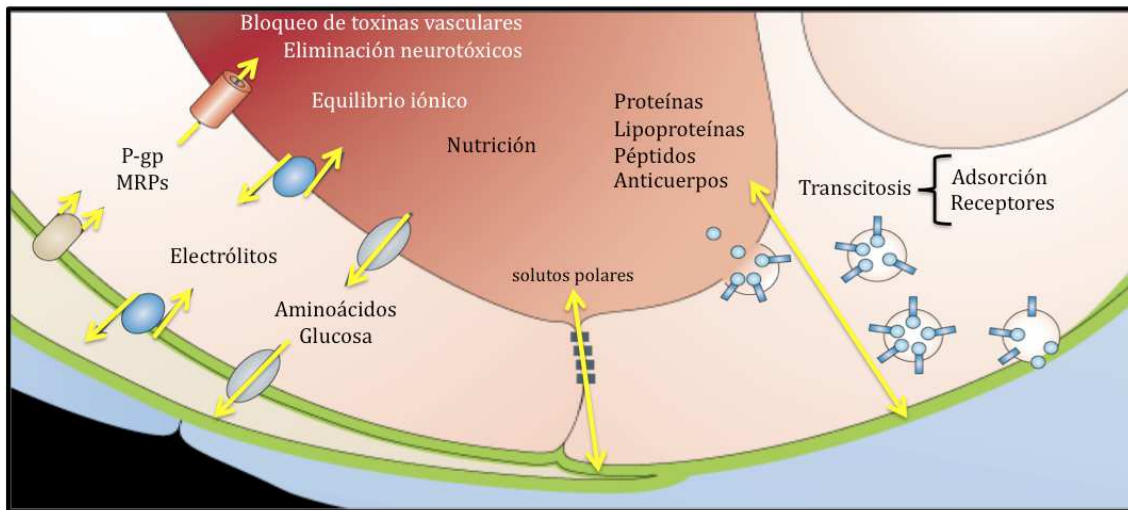


Figura 41. Principales mecanismos de transporte para atravesar la BHE de vertebrados.

3.1.2 Importancia de la BHE en aplicaciones terapéuticas.

En los mamíferos, la BHE protege al cerebro de organismos patogénicos, de moléculas tóxicas y también de su propio sistema inmune. La disfunción de la BHE o la alteración en los sistemas de transporte asociados a la misma, se han detectado en pacientes que sufren desórdenes neurológicos como esclerosis múltiple, Alzheimer, encefalitis, meningitis bacteriana, edema y trauma cerebral.^{188,190,204,205}

Los cambios evolutivos que ha tenido la BHE de los organismos invertebrados a vertebrados aseguran la función de homeostasis del cerebro,²⁰⁶ pero a su vez, son un gran impedimento para la entrada de moléculas terapéuticas en este órgano, convirtiéndose en un obstáculo para el tratamiento de enfermedades neuronales.^{188,204,207} De todos los fármacos neurológicos estudiados, el 98-100% de las moléculas pequeñas y también las de mayor tamaño como los neuropéptidos (péptidos recombinantes, proteínas, fármacos basados en RNA de interferencia y terapia génica) no atraviesan la BHE.^{197,202}

Actualmente, existen diferentes modelos desarrollados para realizar una estimación de la permeabilidad de la BHE frente a una gran variedad de moléculas, aunque la mayoría presentan ciertas desventajas. Por ejemplo, los modelos *in vitro* de BHE que se basan en el cultivo de células endoteliales de los microcapilares del cerebro bovino (BBMEC, *Bovine Brain Microvessel Endothelial Cell*)²⁰⁸ o en el co-cultivo de estas junto a células gliales, comúnmente astrocitos. Estos ensayos se utilizan para estudiar las propiedades de transporte y fisiología de la BHE, más que como una técnica de cribado de alto rendimiento (HTS, *High throughput screening*) debido a su complejidad técnica y a su baja correlación con los ensayos *in vivo*.²⁰⁹

La correlación baja entre los resultados de modelos *in vitro* e *in vivo*, demuestra que existen otros factores que influyen en la permeabilidad y distribución de los compuestos en el cerebro *in vivo*. Factores como la unión a proteínas, el flujo sanguíneo, la estabilidad metabólica, la lipofilicidad del compuesto a ensayar, así como la afinidad a transportadores expresados en la BHE, se tienen en cuenta al realizar una predicción en un experimento *in vivo*.²¹⁰ Todo esto sugiere que todavía no se dispone de un modelo *in vitro*, con capacidad para predecir lo que ocurre en condiciones *in vivo*.²⁰⁹ Aunque los modelos *in vitro* no pueden reemplazar un modelo *in vivo*, son una herramienta complementaria para ayudar a la adquisición de nuevo conocimiento y facilitar el descubrimiento de fármacos con potencial capacidad de atravesar al BHE.²¹¹

Por otra parte, existen otras técnicas para estudiar la BHE y que no requieren la utilización de células tales como el ensayo de permeabilidad en membranas artificiales paralelas (PAMPA, *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) y la cromatografía de membrana artificial inmovilizada (IAM, *Immobilized Artificial Membrane*). En estas técnicas se intenta mimetizar el ambiente de la membrana lipídica presente en las células vivas,²¹¹ permitiendo una estimación eficaz de la permeabilidad pasiva del compuesto,²⁰⁹ pero carecen de propiedades que reflejen los sistemas de transporte activo o las transformaciones metabólicas que los fármacos pueden sufrir al atravesar la BHE *in vivo*.

También se utilizan los modelos *in silico* que se basan en la simulación por ordenador (diseño de fármacos basados en la estructura asistido por ordenador). El principal atractivo de esta estrategia, es su potencial para acelerar el descubrimiento de fármacos, con una predicción teórica de la eficacia y la biodisponibilidad de nuevas moléculas en relación con la permeabilidad de la BHE. Este proceso de predicción se fundamenta en parámetros fisicoquímicos y se considera una herramienta útil en la etapa inicial, acelerando el desarrollo de los procesos de búsqueda de una molécula potencialmente activa (*hit*) de forma efectiva, pero no pueden ser utilizados para predecir la distribución de un compuesto en el cerebro.²¹¹

El uso de ratones manipulados genéticamente como modelos *in vivo* para estudiar la BHE, han demostrado el papel fundamental de los transportadores y las uniones estrechas de la BHE en el transporte a través de esta.²¹² Además, el uso de modelos *in vivo* actualmente no permite determinar cuantitativamente si un fármaco atraviesa o no la BHE a tiempo real, necesitando el sacrificio del animal a un tiempo determinado para analizar entonces el contenido del compuesto en estudio en el cerebro vs plasma u otros órganos. Estos estudios evidencian que los cribados farmacológicos de alto rendimiento (HTS) de grandes bibliotecas no resultan experimentalmente viables, debido a su elevado coste y a la complejidad experimental de los ensayos a realizar.²¹³

Desde el punto de vista de la industria farmacéutica, poder disponer de métodos que permitan realizar HTS de modo que permitan para determinar la capacidad de atravesar la BHE de un número grande de compuestos, es un hecho que impulsa el desarrollo de nuevos modelos para estudiar la BHE. En los últimos años, la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* y el saltamonte, *Locusta migratoria* se han convertido en atractivos modelos *in vivo* para estudiar la permeabilidad de la BHE mediante HTS, debido a las similitudes que presentan con las uniones estrechas presentes en vertebrados.^{187,213-216}

A pesar del progreso de modelos *in vitro*, *in silico* e *in vivo* para estudiar y predecir la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, continúa siendo un reto la búsqueda de modelos *in vivo* que sean sencillos, económicos y no requieran largos períodos de tiempo de experimentación, para que resulten útiles en la fase inicial del descubrimiento de fármacos.^{186,187}

3.1.3 *Drosophila melanogaster* como modelo para estudiar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE).

Drosophila melanogaster se utiliza como modelo animal alternativo de acuerdo al principio 3R (reducción, reemplazamiento y refinamiento) en investigaciones biomédicas, principalmente para estudios de toxicología^{217,218} y enfermedades humanas^{219,220,221} y además ha sido recomendado por el ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*) para la validación de métodos alternativos.^{218,222}

El genoma de *Drosophila* es relativamente pequeño y contiene aproximadamente 13.500 genes, de los cuales el 70% de los fragmentos de lectura abierta (ORF, *open reading frame*) son homólogos a los humanos.^{213,223} Es un modelo en el que se puede combinar herramientas de genética molecular, genómica, química biológica y fisiología integrativa. A diferencia de los vertebrados, el sistema circulatorio es abierto, de manera que la hemolinfa fluye a través de todo el cuerpo e irriga los órganos externamente.

En general, el modelo *in vivo* que utiliza a *Drosophila melanogaster* para estudiar la fisiología y la función de la BHE presenta las siguientes características:

- La BHE de *Drosophila* está formada principalmente por dos capas celulares, la glía perineural (GP) más externa y la glía subperineural (entre la GP y el SNC). Además es topológicamente más simple que la BHE de los vertebrados (Figura 42). La principal función de la BHE en este insecto es proteger a las neuronas de la alta concentración de iones potasio de la hemolinfa, para evitar la despolarización de las neuronas y proteger el sistema nervioso.²²⁴ Por otra parte, *Drosophila* presenta dos capas de glía análogas, fenestrada y pseudocartucho, que mantienen la barrera entre la retina y la hemolinfa o barrera hemato-ocular (BHO).²¹³
- A nivel estructural, la BHE de *Drosophila* comparte características con la de los vertebrados. En particular, la glía subperineural (SPG) presenta un complejo sistema de uniones homotópicas o uniones septadas (SJ, *Septate Junctions*) localizadas lateralmente entre células adyacentes, análogas a las uniones estrechas de los vertebrados, que crean una barrera de difusión paracelular (Figura 42).²²⁵⁻²²⁷ A nivel molecular, las proteínas que componen estas uniones septadas (SJ) son homólogas a las proteínas de los vertebrados que componen las uniones estrechas. El rompimiento de las SJ genera defectos en la función de la BHE de *Drosophila* (Figura 43).²²⁷⁻²³⁰

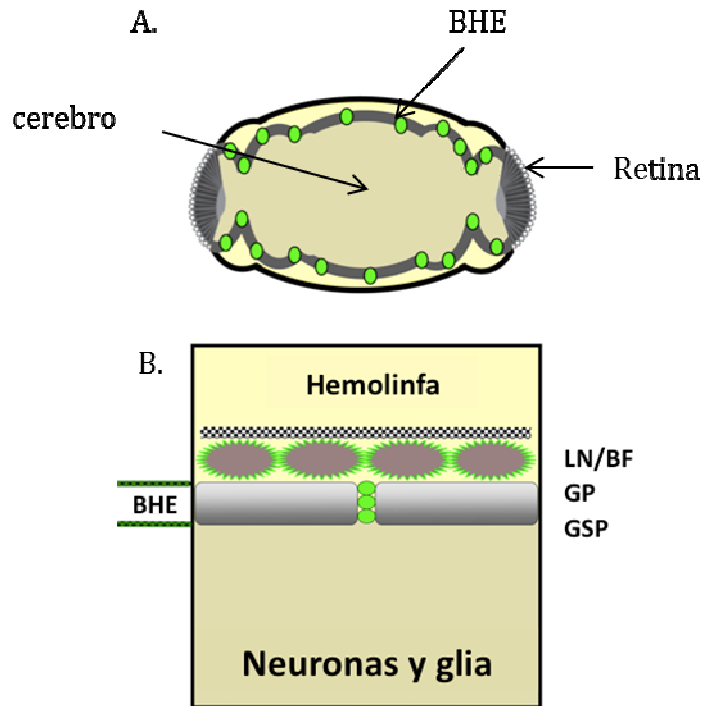


Figura 42. Anatomía de la barrera hematoencefálica en *Drosophila melanogaster*. A. Cerebro B. Ampliación de una sección de la BHE que rodea el cerebro y lo separa de la hemolinfa.

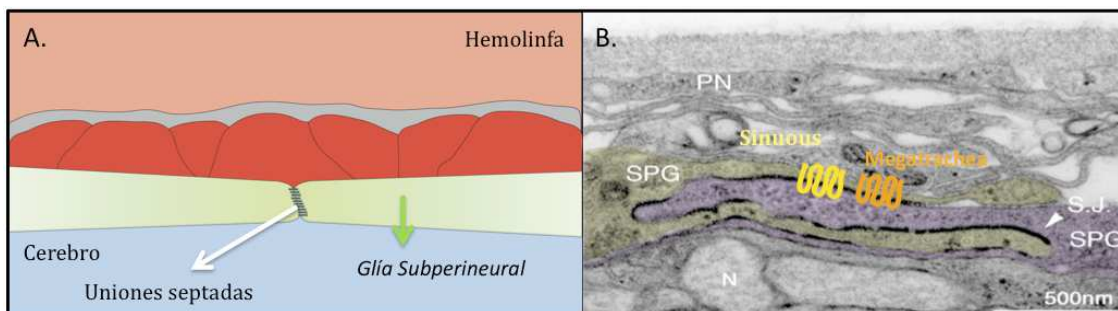


Figura 43. Uniones septadas en la glía subperineuronal de *Drosophila melanogaster*.

- *Drosophila* tiene transportadores xenobióticos pertenecientes a la familia de transportadores dependientes de ATP (ABC) y de soluto, que participan en el transporte activo de los fármacos entre los compartimentos biológicos. Por ejemplo, el Mdr65 presente en *Drosophila*, es homólogo al MDR1/Pgp humano, el cual constituye uno de los principales transportadores ABC de los vertebrados. El Mdr65 está localizado en la SPG y juega un papel importante en la protección química del cerebro de *Drosophila*.²³¹
- También *Drosophila* posee otros dos tipos de transportadores de xenobióticos: OATP58Dc y OATP74D. Estos son homólogos de proteínas que transportan aniones orgánicos en vertebrados (OATPs).²³² Por ejemplo, se ha demostrado que OATP58Dc está implicado en el mantenimiento de la barrera química frente a la entrada de fluoresceína en el cerebro.

- A nivel metodológico, existen herramientas disponibles para marcar de modo fluorescente la BHE en *Drosophila*, que hacen posible estudiar la distribución de los fármacos a través de la membrana hematoencefálica al cerebro. Estas herramientas abarcan desde la inyección de fluoróforos en el abdomen para que queden retenidos en la BHE, el uso de anticuerpos específicos para inmunohistoquímica, la generación de mutantes que expresen proteínas que se encuentren en la BHE convenientemente modificadas con una GFP o mutantes similares, que contengan la supresión o sobreexpresión de proteínas específicas que regulan el funcionamiento de la BHE.²³³⁻²³⁴

Los resultados de los estudios ultraestructurales de *Drosophila* sobre la glía y las uniones septadas,²²⁶ acerca de la fisiología de la barrera y la identificación de poblaciones celulares responsables de la formación de estas uniones, han contribuido a que se desarrollen nuevas metodologías que utilizan *Drosophila* como sistema modelo *in vivo*, para estudiar la permeabilidad de las membranas frente a fluoróforos.²¹³ El desarrollo de nuevos fenotipos mutantes que carecen de una propiedad funcional de la BHE, constituye una importante aportación al modelo, permitiendo descifrar aspectos relacionados con la fisiología de la BHE.^{213,227-235}

Diferentes mutantes de *Drosophila melanogaster* (*NeuroxinIV*, *coracle*, *gmc*, *nervana 2*, *Neuroglian*, *contactin*, *sinuos*, *megatrachea*) expresan fenotipos que son permeables a los dextranos, ya que los genes mutados son importantes en el desarrollo de las uniones septadas, lo que conduce a una reducción en la función barrera.²³⁵

Bainton y cols.⁹⁸ identificaron el gen *moody* en un cribado genético de mutantes *Drosophila* (mutante *white*), utilizando técnicas de permeabilidad de fluoróforos, el cual codifica dos tipos de receptores que se acoplan a la proteína G (GPCRs). Las proteínas Moody- α y Moody- β , se expresan en la superficie de la glía que rodea el sistema nervioso en la mosca adulta y se requieren en forma activa para mantener la integridad de la BHE. Estas también se expresan en la capa de células localizadas entre el cerebro y la retina y es conocido que estas células forman parte de la glía pseudocartucho, la cual se ha demostrado que forma parte de la BHE en los dípteros.⁹⁸

El mutante *white* de *Drosophila melanogaster* se utilizó para estudiar la permeabilidad de fluoróforos frente a la BHE. La razón es que la eliminación de los pigmentos retinales oscuros en este tipo de mosca, mejora la visibilidad de los fluoróforos inyectados y bloquea la dispersión de la luz.⁹⁸

En los mutantes *moody* ($\Delta C17moody$ *Null*) se ha perdido por completo la función del gen *moody*, por lo que no expresan las proteínas Moody- α y Moody- β .⁹⁸ Esta mutación resulta letal, tan solo aproximadamente el 1% de las hembras homocigotas y los machos heterocigotas alcanzan la edad adulta. Las moscas que sobreviven presentan defectos en las habilidades motoras y un tiempo de vida más corto como adultas.

En 2008 Stork y cols.²³⁵ caracterizaron las diferentes capas de glía en la superficie del SNC en embriones y larvas de tercer estadio, a través del análisis en el microscopio electrónico, de experimentos de permeabilidad con dextrano y diferentes mutantes con distintos marcadores celulares. Los resultados de este estudio indican que la función principal de la BHE está mediada por las uniones septadas formadas por las células de la glía subperineural, mientras que las células que forman parte de la glía perineural y la

lamela neural contribuyen a la barrera selectiva frente a las moléculas de elevado peso molecular.²³⁵

Moody-Gal4 es otra línea de mosca mutante que se utiliza para estudios *in vivo*. En este tipo de mosca, el activador transcripcional Gal4 se coloca bajo el control del promotor de la transcripción de *Moody* para producir un patrón de expresión Gal4 específico para la capa de glía subperineural, la GFP marca el correceptor CD8 (CD-GFP) presente en la membrana de las células de la SPG, en este tipo de moscas la función BHE no está alterada.^{235,236}

Por otra parte, se han utilizado metodologías de permeabilidad con diferentes fluoróforos o conjugados (fluoresceína (FITC), rodamina 123 (Rho 123), Texas rojo dextrano (TR-Dextrano), prazosina-BODIPY) en diferentes mutantes, para estudiar el transportador Mdr65, homólogo al transportador ABC humano.²³¹

Además, se han desarrollado metodologías en las cuales se inyectan fluoróforos en el abdomen para luego observar la fluorescencia de las retinas a tiempo real, y posteriormente determinar la intensidad de fluorescencia en cerebros disectados de las moscas inoculadas, como un procedimiento para identificar las características fisiológicas de la glía y evaluar el paso de los xenobióticos a través de la BHO y la BHE en adultos de *Drosophila melanogaster*.^{213,237} Estas metodologías utilizando fluoróforos han contribuido también al estudio de la fisiología de transportadores de aniones orgánicos (OATP58Dc) a través de la BHE.²³² La similitud en la composición de la BHO con la BHE en *Drosophila melanogaster* permite establecer un método en el cual mediante la observación de la fluorescencia del ojo de moscas inoculadas con compuestos marcados con una sonda fluorescente se pueda determinar la entrada en cerebro.

3.1.4 Péptidos como transportadores de moléculas terapéuticas al cerebro.

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes sistemas de transporte mediante los cuales las moléculas terapéuticas pueden atravesar la BHE. El estudio de estos mecanismos favorece el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos que faciliten la entrada al cerebro sacando partido de uno de los mecanismos planteados, aumentando así su potencial farmacológico.²³⁸

En los últimos años los péptidos han emergido como potenciales transportadores a través de la BHE. Concretamente, se han desarrollado tres estrategias fundamentales para favorecer la entrada en cerebro de distintos tipos de moléculas: (a) procedimientos invasivos como la administración directa intraventricular de fármacos, mediante el uso de catéter ventricular implantado quirúrgicamente, así como la alteración temporal de la BHE mediante la infusión intracarótida de soluciones sobresaturadas, (b) estrategias farmacológicas basadas en el incremento de la solubilidad lipídica de compuestos hidrofílicos como péptidos y proteínas, incrementando la lipofilidad de las moléculas vía modificación química o mediante la inclusión del compuesto en pequeños liposomas y (c) estrategias fisiológicas que explotan distintos mecanismos de transporte de la BHE, los cuales han sido caracterizados para nutrientes, hormonas peptídicas y no peptídicas, así como para el transporte de proteínas.^{202,239}

Algunos péptidos son capaces de aprovechar mecanismos de transporte de la BHE como la transcitosis por adsorción y la transcitosis mediada por receptores para entrar en el cerebro. El primero, es un mecanismo dependiente de energía que ocurre gracias a la interacción electrostática entre las cargas positivas de la molécula y las cargas negativas de la superficie de la membrana.²⁴⁰ Este tipo de mecanismo involucra la endocitosis mediante vesículas de compuestos con carga, similar al mecanismo de transporte por receptores, pero sin ser un mecanismo específico. En el caso de los péptidos, parámetros como la estructura del extremo C-terminal y el carácter básico de la molécula, determinaron su entrada en las células endoteliales de cerebro bovino.^{199,201} Además, al aumentar el carácter catiónico de péptidos y proteínas se generan entidades capaces de atravesar la BHE mediante este mecanismo, el cual, a diferencia del transporte mediado por receptores, presenta saturación a concentraciones altas.^{199,200}

En la transcitosis mediada por receptores, las células endoteliales de los capilares del cerebro expresan receptores que facilitan el transporte de macromoléculas. Este proceso involucra la unión de un ligando a un receptor de membrana concreto en la superficie de las células endoteliales del cerebro. Luego, este complejo ligando-receptor es endocitado y la vesícula endosomal lo transporta a los lisosomas o al citoplasma, para que ocurra la exocitosis en la membrana abluminal del parenquima cerebral.^{44,201,241,242} En general, este mecanismo, permite la entrada al cerebro de moléculas de mayor tamaño y diferente complejidad estructural como péptidos, proteínas, anticuerpos, liposomas y nanopartículas, y además podría asistir la entrada de partículas pequeñas, sin importar si son o no lipofílicas.^{44,242}

La BHE contiene receptores que permiten la entrada de distintos tipos de ligandos. Entre los receptores más importantes se encuentran la transferrina, la insulina, la leptina, el factor de crecimiento semejante a la insulina, las lipoproteínas de baja densidad (LDL, *low density lipoprotein*), la toxina difteria, entre otros. El estudio de estos receptores y su relación con la BHE es primordial para el desarrollo de nuevas entidades capaces de atravesar, como sus ligandos naturales, la BHE.¹⁹⁷

Por otra parte, solo existen dos estudios previos que han explorado a *Drosophila* como modelo en el estudio de la capacidad de compuestos peptídico para atravesar la BHE.^{214,215} Sarantseva y cols.²¹⁴ desarrollaron una metodología en la cual utilizaron compuestos como la Penetratina (**pAntp** 43-58) y Cog133 unidos a biotina e inyectados por vía abdominal en *Drosophila melanogaster*, para estudiar la permeabilidad de la BHE. Los resultados obtenidos demostraron que estos compuestos atravesaron la BHE de este insecto, a diferencia de los controles negativos pAntp rev (58-43) y pAntp (41-55).²¹⁴

Posteriormente, utilizando la misma metodología, se demostró que el péptido Penetratina (**pAntp**), dendrímeros de homolisinas (D5) y el conjugado D5-U2AF presentaron capacidad de atravesar la BHE de *Drosophila melanogaster*. El péptido U2AF es un fragmento de la hormona de crecimiento humano que no puede atravesar la BHE. La mayor coloración se detectó con el péptido penetratina biotinilado, que se acumuló principalmente en las células nerviosas y neuropilo. El dendrímero D5 y el conjugado D5-U2AF se distribuyeron principalmente en las células nerviosas del cerebro y ligeramente en el neuropilo.²¹⁵

El estado del arte de la temática analizada demuestra que, a pesar de todos los estudios realizados, continúa siendo importante la búsqueda tanto de moléculas con potencial capacidad para atravesar la BHE, como de un modelo viable científica y económicamente, que permita determinar la capacidad real de cualquier entidad química para atravesar dicha barrera. Teniendo en cuenta los resultados promisorios de los estudios realizados en *Drosophila melanogaster*,^{213,231,237} la finalidad de este capítulo es diseñar y poner a punto un método para estudiar la permeabilidad de la BHE, utilizando *Drosophila melanogaster* mutante *white* (*w-iso* y *moody*) como modelo y péptidos conocidos, como controles para validarlo. Este nuevo método parte de la similitud en su composición de la BHO y la BHE en *Drosophila melanogaster*, hecho que podría permitir una determinación de la capacidad de atravesar la BHE de distintos compuestos, mediante la observación de la fluorescencia de la retina de moscas inoculadas con estos, marcados con una sonda fluorescente. Adicionalmente, se sintetizaran γ -péptidos con capacidad de atravesar membranas probados en capítulos anteriores y se determinará su capacidad de atravesar la BHE utilizando este modelo.

Objetivo

Validar *Drosophila melanogaster* como modelo para estudiar la permeabilidad de la BHE frente a diferentes péptidos y establecer la capacidad de entrada de los mismos, así como de γ -péptidos seleccionados.

Objetivos específicos

- Seleccionar y sintetizar péptidos con capacidad de atravesar la BHE por distintos mecanismos, para utilizarlos como péptidos control en el ensayo de permeabilidad de la BHE con *Drosophila melanogaster*.
- Seleccionar y sintetizar siete γ - péptidos representativos de la quimioteca para utilizarlos en el ensayo de permeabilidad de la BHE con *Drosophila melanogaster*.
- Realizar estudios de epifluorescencia utilizando *Drosophila melanogaster* inoculadas con todos los péptidos sintetizados para establecer distintos parámetros del ensayo.
- Desarrollar una metodología de microscopía confocal de barrido de láser para estudiar la permeabilidad de la BHE del modelo *Drosophila melanogaster* frente a los diferentes péptidos sintetizados, así como la distribución espacial de estos compuestos en el interior de la retina.
- Establecer la capacidad de entrada a través de la BHE en *Drosophila melanogaster* de los distintos péptidos. Confirmar la entrada en cerebro de un péptido seleccionado, mediante la realización de un estudio de microscopía confocal de cerebro disectado de *Drosophila melanogaster* previamente inoculada con el mismo.

3.2 Resultados

Como mencionamos anteriormente, Bainton y cols.^{98,213,231,237} utilizaron imágenes *in vivo* en tiempo real (epifluorescencia y microscopía confocal) de la retina de *Drosophila*, como herramienta novedosa para identificar las características fisiológicas de la BHE, extrapolando sus resultados a lo que probablemente ocurre en la BHE de los vertebrados. Basándonos en esta metodología, en nuestro trabajo diseñamos una serie de experimentos utilizando *Drosophila melanogaster*: mutante *white w*¹¹¹⁸, *w-iso*, *moody* y *moody-Gal4*, para validar dicho procedimiento como método de cribado, pero que además, permita estudiar la capacidad potencial de compuestos activos como los péptidos, para atravesar la BHE de *Drosophila*.

Para realizar este estudio se seleccionaron y se sintetizaron varios péptidos modelo con reconocida capacidad de atravesar o no la BHE (controles positivos o negativos), así como 7 γ -péptidos con aptitudes para atravesar membranas celulares de distintos tipos.

3.2.1 Péptidos modelos y γ péptidos

Se seleccionaron varios péptidos modelos representativos para los distintos mecanismos de entrada, basándonos en trabajos previos descritos en la literatura (Tabla 15). Todos los péptidos modelos seleccionados han sido estudiados en modelos *in vitro* e *in vivo* frente a la BHE de vertebrados. Según la bibliografía consultada, todos atraviesan en menor o mayor grado la BHE.

Péptido y secuencia	Mecanismos de transporte en BHE	Ref.
Péptido RGV H-YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG-NH ₂	Transporte por receptor: acetilcolina y GABA. Endocitosis vía caveola y clatrina.	243-247
Péptidos que se unen al receptor de transferrina H-HAIYPRH-NH ₂ (pTf-1) H-THRPPMWSVPVWP-NH ₂ (pTf-2)	Interactúan con el receptor de la transferrina pero en un sitio diferente del ligando natural (la transferrina)	248,249
Angiopep-2 H-TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-NH ₂	Transporte por receptor: transcitosis mediada por el receptor de la Proteína 1 relacionada de la lipoproteína de baja densidad. Entra al cerebro de ratones, en una proporción más baja en comparación que el Angiopep-2	250-252
Angiopep-7 H-TFFYGGSRGRRNNFRTEEY-NH ₂		
Tat H-RRRQRRKKRG-NH ₂	Transporte mediado por adsorción. Se desconoce el mecanismo de entrada específico a través de la BHE	24,119,253, 254
Penetratina (pAntp). H-RQIKIWFQRRMKWKK-NH ₂	Transporte mediado por adsorción. Se desconoce el mecanismo de entrada específico a través de la BHE	114,214, 255

Tabla 15. Péptidos modelos seleccionados y sintetizados para ser utilizados como controles.

Además de los péptidos modelos, se seleccionaron 6 γ -péptidos, miembros de la librería previamente sintetizada y evaluada su capacidad como CPPs en nuestro grupo de

investigación (Figura 44).⁴⁹ Se seleccionaron los péptidos **CF-Gp-4**, **CF-Gp-7**, **CF-Gp-10** y **CF-Gp-11** que mostraron una elevada capacidad para atravesar la membrana celular en experimentos *in vitro* realizados con células HeLa (ver Capítulo 1, Resultados y Discusión). Además, los péptidos **CF-Gp-10** y el **CF-Gp-11** mostraron aptitudes para atravesar la membrana celular de *Leishmania donovani* (ver Capítulo 2, Resultados y Discusión). Considerando su estructura primaria, los γ -péptidos **CF-Gp-4**, **CF-Gp-7**, **CF-Gp-10** y **CF-Gp-11** presentan un alto contenido de cargas positivas. Mientras que los péptidos **CF-Gp-4**, **CF-Gp-7** y **CF-Gp-11** contienen grupos guanidínios, el péptido **CF-Gp-7** presenta aminas cuaternarias en toda la secuencia peptídica, como consecuencia de las *N*-metilaciones de la amina terciaria de cada monómero que compone la secuencia. La *N*-metilación es una modificación química que aumenta la lipofilidad, reduce la capacidad de formar puentes de hidrógeno e incrementa la difusión a través de la membrana.²⁵⁶ Además, esta modificación mejora la estabilidad metabólica y la permeabilidad intestinal.²⁵⁷ También se escogieron los péptidos **CF-Gp-3** y **CF-Gp-9**, los cuales prácticamente no atravesaron la membrana citoplasmática de células HeLa.⁵⁰

Para llevar a cabo los estudios de imágenes en tiempo real, todos los péptidos seleccionados se conjugaron a la CF (Figura 44).

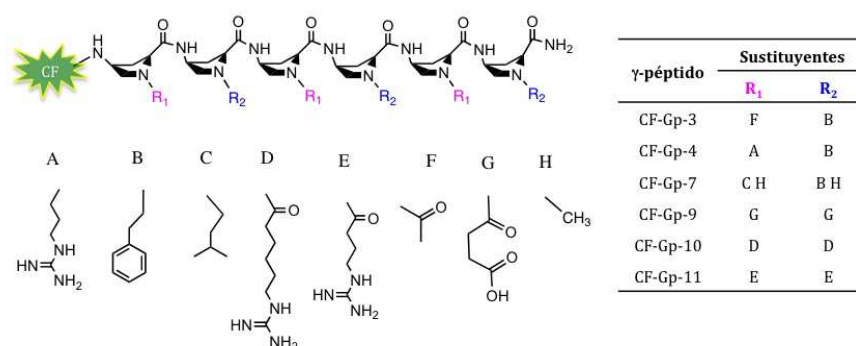


Figura 44. γ -péptidos seleccionados y sintetizados para estudiar la permeabilidad a través de la BHE.

Los péptidos modelos y los γ -péptidos, todos marcados con sondas fluorescentes, fueron sintetizados en fase sólida utilizando la estrategia Fmoc/tBu o Fmoc/Boc, respetivamente. En todos los casos se purificaron mediante RP-HPLC acoplado a masas y se utilizaron con una pureza superior a 95%. Las cantidades a inyectar para cada péptido se estandarizó utilizando las rectas de calibración elaboradas para el fluoróforo (Materiales y Métodos).

3.2.2 Estudios de Epifluorescencia

La epifluorescencia es una herramienta que utilizamos como primera aproximación, para estudiar de modo cualitativo la capacidad de permeabilidad de la BHE frente a las entidades químicas ensayadas. Las imágenes de epifluorescencia integran toda la luz transmitida en dos dimensiones, de tal forma que se pierde la resolución espacial para delinear los diferentes espacios anatómicos dentro del ojo.²¹³ Los estudios de epifluorescencia se realizaron utilizando moscas de la línea *white w*¹¹¹⁸ y los péptidos **RGV**, **pTf-1**, **pTf-2**, **Angiopep-2**, **Angiopep-7**, **CF-Tat**, **pAntp** conjugados a **CF**, así como

los γ -péptidos (**CF-Gp-4**, **CF-Gp-7**, **CF-Gp-10**, **CF-Gp11**), todos disueltos en tampón fosfato libre de Mg^{2+} y Ca^{2+} (pH 8.2). Se inyectó cada compuesto (200 nL a una concentración de 0,7 mM) en 20 moscas vía abdominal y se observaron con la lupa fluorescente, determinando en cuántas de ellas se detecta señal fluorescente en la retina (Figura 45). La localización diferencial de la fluorescencia en la retina, resultó indicativo de cuales de los péptidos marcados con **CF** eran capaces de atravesar la BHE, en comparación con las retinas de las moscas inyectadas sólo con la **CF** (Figura 45).

Los resultados obtenidos (Figura 45, parte II) mostraron que a las 4 h post-inoculación, un 95% de las moscas inyectadas con los péptidos **CF-RGV** y **CF-Tat** presentaron zonas de fluorescencia en la retina. Por otra parte, sólo presentaron fluorescencia en la retina el 45 y 30% de las moscas inyectadas con los péptidos **CF-Angiopep-2** y **CF-Angiopep-7**, respectivamente. Estos últimos resultados, podrían estar relacionados no solo con las propiedades de estos péptidos, sino también con la baja solubilidad que presentaron estos en el tampón utilizado.

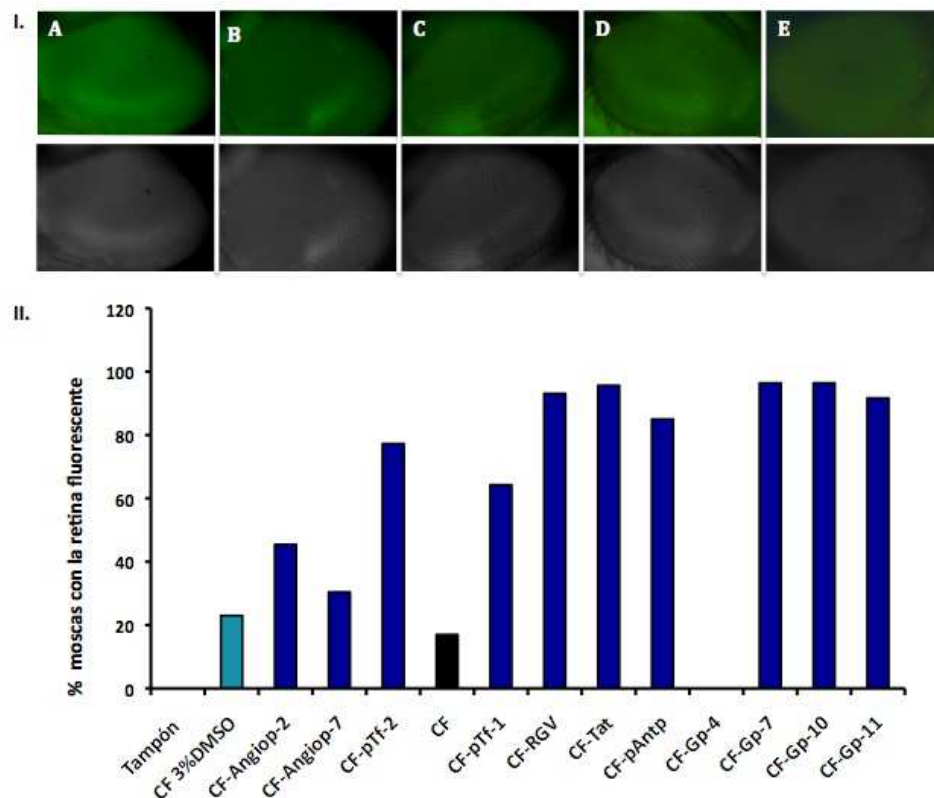


Figura 45. I. Imágenes de las retinas de *Drosophila melanogaster white* (w^{1118}) inoculadas con los péptidos control y los γ -péptidos: A. **CF-RGV**, B. **CF-Tat**, C. **CF-Gp-7**, D. **CF-Gp-10**, E. **CF**. Las imágenes fueron tomadas 4 h post-inyección. **II.** Porcentaje de *Drosophila melanogaster white* (w^{1118}) que presentaron fluorescencia en la retina con 4 h post-inoculación. Los controles se corresponden con el estudio de las moscas inoculadas con CF y con CF con un 3% DMSO, este último control se utilizó para disolver los péptidos con baja solubilidad como fueron **CF-Angiopep-2**, **CF-Angiopep-7** y **CF-pTf-2**

En cuanto a los γ -péptidos, se observó que el péptido **CF-Gp-7** y los representantes de la familia de homoguanidilados, como los péptidos **CF-Gp-10** y **CF-Gp-11**, tuvieron la capacidad de llegar hasta la retina de *Drosophila* en porcentajes similares

(aproximadamente 95%) a los péptidos control **CF-RGV** y **CF-Tat** (Figura 45). También se encontró que las moscas inyectadas con el péptido **CF-Gp-4** no presentaron fluorescencia en la retina, aunque este resultado podría deberse, como en el caso de los angiopeps, a la baja solubilidad de este péptido en el tampón utilizado.

Con el fin de determinar la posible toxicidad de los compuestos ensayados en *Drosophila melanogaster in vivo*, se registró el número de moscas vivas a las 4 h después de la inoculación (Figura 46). La tasa de supervivencia de las moscas inyectadas con el tampón utilizado para disolver los péptidos, refleja que entre 15% y el 25% de la mortalidad se debe a efectos de la manipulación durante la inyección. En general, los péptidos ensayados no influyeron en la supervivencia de las moscas a la concentración utilizada, con excepción de las moscas inoculadas con los péptidos **CF-Angiopep-7** y **CF-pTf-2** que presentaron tasas de supervivencia más bajas, del 57 y 43%, respectivamente.

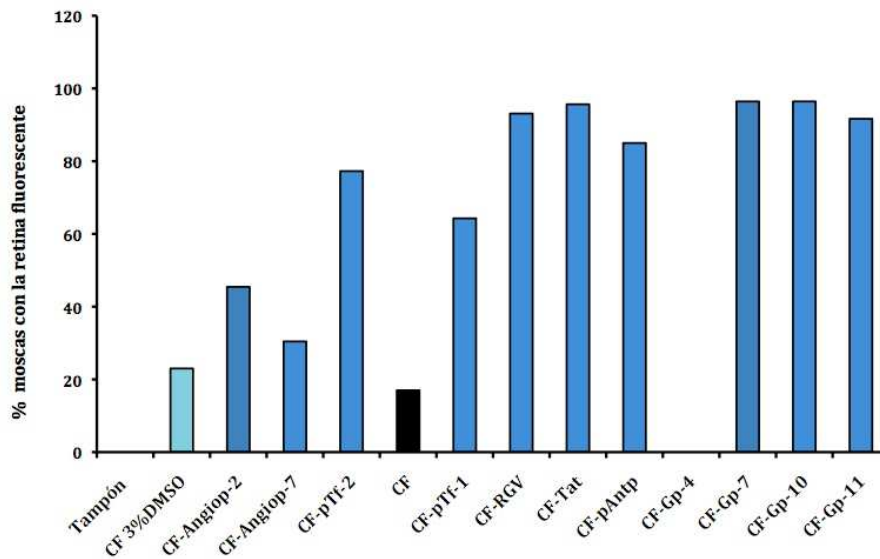


Figura 46. Tasa de supervivencia de *Drosophila melanogaster white* (w^{1118}) a 4 h post-inoculación con los péptidos control y los γ -péptidos. Los péptidos fueron inyectados en la región abdominal. Cada péptido se inyectó en 20 moscas adultas.

Con el fin de profundizar en los resultados e intentar definir la capacidad de entrada de cada péptido en el cerebro se realizaron nuevos estudios de epifluorescencia con dos líneas de *Drosophila melanogaster*, la *w-iso* y la *moody* (*moody Null*). Como mencionamos anteriormente (Introducción, ep. 3.1.3), las moscas *moody* presentan la BHO y la BHE afectadas, específicamente en las uniones septadas, favoreciendo la permeabilidad paracelular, con lo que se pueden considerar controles claramente positivos. Las moscas *w-iso* son mutantes *white* con la retina no pigmentada, sin ninguna modificación adicional por lo que preservan intacta la BHE. Este tipo de moscas fue seleccionado para corroborar el resultado obtenido con las moscas w^{1118} .

Todos los péptidos y la CF, se disolvieron en agua, con el fin de determinar el efecto del tampón en la supervivencia de las moscas inoculadas y se inyectaron en 15 moscas de cada línea por compuesto, para ser observadas con la lupa fluorescente a las 2 h post-inoculación (Figura 47) y determinar cuántas presentaron fluorescencia en la retina (Figura 48). Se decidió estudiar las moscas a las 2 h post-inoculación, ya que experimentos preliminares mostraron que la observación a las 2 h era mas clara que a las 4 h post-inoculación.

Las imágenes obtenidas (Figura 47) permitieron visualizar y determinar las moscas inoculadas en las que no se observaba fluorescencia retinal (Figura 47, A), así como aquellas en las que se observaba de manera evidente la señal de fluorescencia en la retina (Figura 47, B-H). Las imágenes obtenidas de los cuerpos (Figura 47, I y J) permitieron confirmar si la inyección de los compuestos fue correcta y descartar aquellas imágenes correspondientes a errores experimentales en el proceso de inoculación.

El análisis de las imágenes de la retina de todas las moscas inoculadas por cada compuesto, nos permitió determinar el porcentaje de aquellas que presentaron retina fluorescente (Figura 48). Como se esperaba, entre un 80-100% de las moscas *moody* inyectadas presentaron una clara señal fluorescente, excepto aquellas inoculadas con el péptido **CF-Gp-4** que presentaron retina fluorescente en un 64% del conjunto inyectado con el mismo. En las moscas *w-iso* los resultados mostraron variabilidad dependiendo del compuesto inoculado. Los péptidos **CF-Angiopep-2**, **CF-Angiopep-7**, **CF-pTf-1**, **CF-pTf-2**, **CF-RGV**, **CF-Tat**, **CF-Gp-3**, **CF-Gp-7**, **CF-Gp-10**, y **CF-Gp-11**, presentaron resultados similares a aquellos obtenidos para la línea *moody* inoculada con el mismo compuesto (80-100%). La presencia de fluorescencia retinal en las moscas *w-iso* inyectadas resultó más baja para la **CF** y para los péptidos **CF-Gp-4**, **CF-pAntp** y **CF-Gp-9**, siendo del 40%, 46%, 57% y 64%, respectivamente (Figura 48).

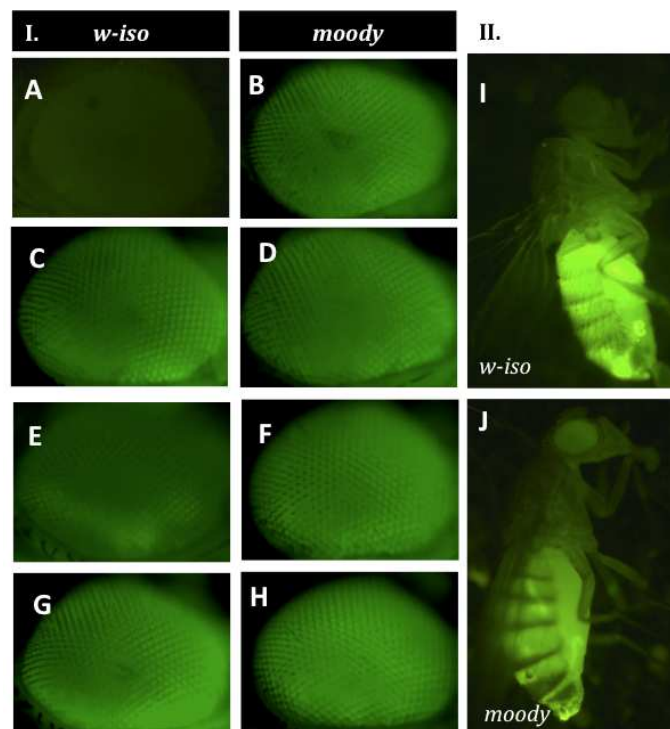


Figura 47. I. Imágenes de las retinas de *Drosophila melanogaster* *w-iso* y *moody* inyectadas con **CF** (A, B), **CF-pTf-2** (C, D) y los γ péptidos: **CF-Gp-10** (E, F), **CF-Gp-11** (G, H). II Imágenes de moscas *w-iso* (I) y *moody* (J) inyectadas con **CF**, las cuales fueron tomadas 2 h post-inyección.

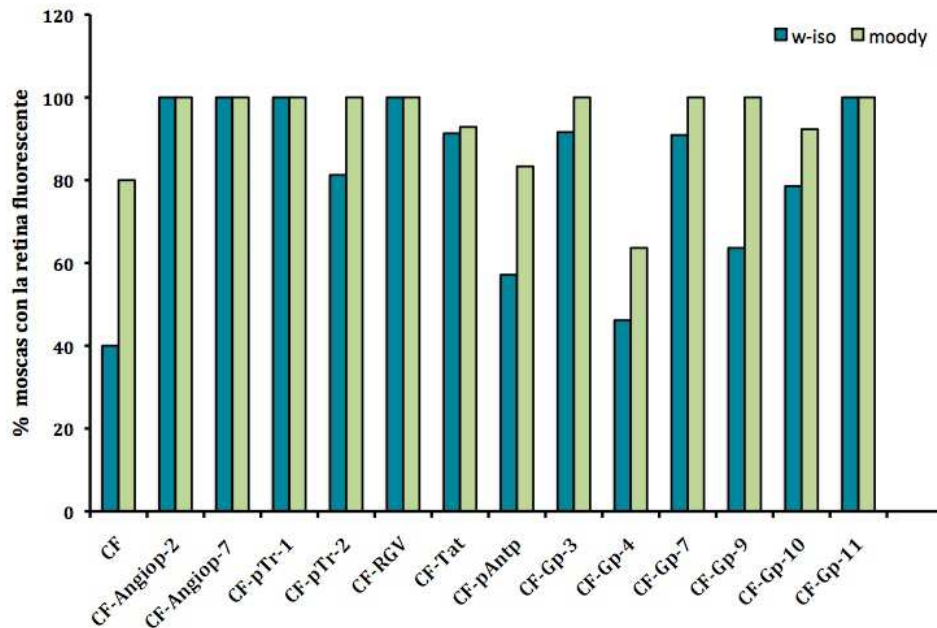


Figura 48. Porcentaje de *Drosophila melanogaster w-iso* y *moody* que presentaron fluorescencia en la retina a las 2 h post-inoculación.

Simultáneamente a los estudios de epifluorescencia, se determinaron los porcentajes de supervivencia de las moscas a las 2 horas de inyectar cada compuesto, obteniendo en todos los casos, porcentajes de supervivencia superiores al 80 %. Esto corrobora el resultado previo (Figura 46), que indicaba que hasta un 25 % de la mortalidad podía atribuirse a factores relacionados con la manipulación o a la solución utilizada para disolver las muestras a inyectar.

A pesar de que los estudios de epifluorescencia permiten discernir entre compuestos que entran en la retina con aquellos que no, las imágenes que generan son de difícil interpretación, generando dudas en aquellos compuestos en los que su entrada en la retina no parece elevada. Con el objetivo de profundizar y a su vez complementar la validación del modelo *Drosophila* en el estudio de la potencial capacidad de los compuestos para atravesar la BHE, se decidió buscar una metodología de mayor resolución para la observación de las retinas de las moscas inoculadas.

3.2.3 Microscopía confocal de barrido de láser.

3.2.3.1 Imágenes retinales a tiempo real.

Para el estudio de microscopía confocal, se utilizaron 15 moscas post-inoculadas (2 h) con los diferentes compuestos diluidos en agua (pH 7.2), las cuales fueron seleccionadas mediante epifluorescencia.

Para poder estudiar más detalladamente la entrada de los compuestos a evaluar en la retina de *Drosophila melanogaster* y corroborar que la presencia de estos en la retina es indicativo de su entrada en cerebro, se decidió estudiar las retinas de las moscas inoculadas con los compuestos utilizando microscopía confocal de barrido de láser. A diferencia de la epifluorescencia, la microscopía confocal de barrido de láser permite obtener imágenes de planos a lo largo del eje Z, que posteriormente permiten una

reconstrucción 3D de alta resolución. Estos resultados no se pueden obtener mediante epifluorescencia, ya que con esta técnica sólo se captan imágenes que comprenden toda la luz transmitida en dos dimensiones y que corresponden a un sección gruesa superficial. Este tipo de imágenes son de baja resolución y nos permiten la reconstrucción espacial que nos permitiría ver distintas partes de la retina.

Para una mejor comprensión de los resultados que se muestran en este apartado, se procede a realizar un breve descripción de la composición del ojo de *Drosophila melanogaster*. La retina de *Drosophila melanogaster* está formada por 750-800 unidades idénticas sensibles a la luz llamadas omatidios, los cuales se disponen en un patrón hexagonal y regular. Cada omatidio está compuesto por ocho células fotorreceptoras (R1-R8), cuatro células del cono y dos células pigmentarias primarias ordenadas en un patrón estereotípico. Estas unidades a su vez, están rodeadas por células pigmentarias primarias y secundarias (Figura 49).^{258,259}

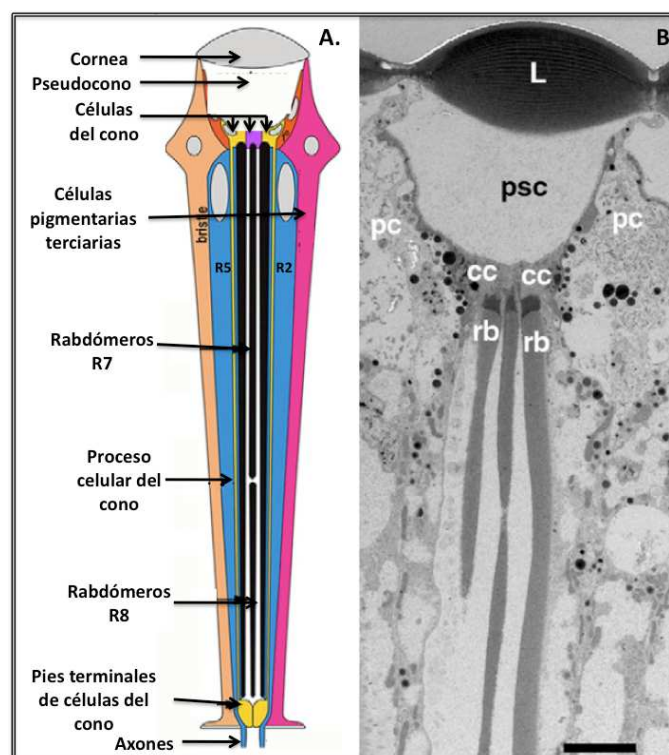


Figura 49. A. Omatidio de adulto y sus diferentes partes. B. Micrografía electrónica sección longitudinal a través de un omatidio de adulto. (L) lente de la córnea, (psc) cavidad pseudocono, (pc) células pigmentarias primarias, (cc) células del cono, (rb) rabdomeros; modificado de Benerjee y cols.²⁶⁰

En la parte apical del omatidio, se encuentran las células del cono que producen una secreción extracelular llamado lente corneal (córnea) y debajo de estas células, se encuentra la cavidad del pseudocono (Figura 49) que aparece en el estadio pupal tardío. Las células pigmentarias primarias que forman parte de las paredes del pseudocono están cubiertas por microvellosidades que ayudan a la secreción del lente. Las cuatro células del cono actúan como soporte del pseudocono y de la cubierta de los rabdomeros de las células fotorreceptoras. Las células fotorreceptoras dirigen sus

axones hacia el lóbulo óptico del cerebro, inervando los dos ganglios separados que la componen, la lámina y la médula (Figura 50).²⁵⁸⁻²⁶⁰

En la parte basal del omatidio adulto, se encuentran los pies terminales de las células del cono y las fibras extensoras. Estas últimas constituyen los terminales de las células pigmentarias secundarias y terciarias. Estas terminaciones se transforman en una estructura anatómicamente conocida como membrana fenestrada, la cual se observa en el fondo de la retina. Los axones de las células fotorreceptoras pasan en medio de los pies terminales de las células del cono y los pies de las células pigmentarias (Figura 50). Se ha observado la presencia de uniones septadas en la región basal del omatidio rodeando los pies de las células del cono y la membrana fenestrada. Las células del cono y las células pigmentarias son células accesorias no neuronales que establecen el aislamiento alrededor de las células fotorreceptoras.^{260,261} Las uniones septadas localizadas en la región basal son similares a las que están presentes barrera hematoencefálica del cerebro de *Drosophila melanogaster*.

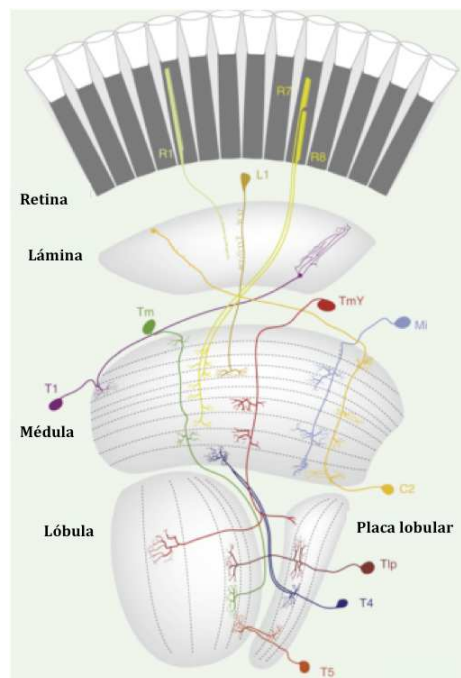


Figura 50. Sistema visual de una mosca. (modificado de Borst, 2009²⁶²)

El estudio de la entrada y distribución de los compuestos inoculados en *Drosophila melanogaster* mediante microscopía confocal de barrido de láser se realizó utilizando las líneas *w-iso* y *moody* inoculadas con los diferentes compuestos. Para cada compuesto y tipo de mosca se inyectaron 15 individuos, entre los cuales se seleccionaron mediante epifluorescencia aquellos que se iban a estudiar mediante microscopía confocal, 4-5 en el caso de las moscas *w-iso* y 2-3 en el caso de las *moody*. Los péptidos se disolvieron en tampón o en agua y se cuantificaron utilizando las rectas de calibración elaboradas con el fluoróforo. Las imágenes se realizaron a tiempo real con moscas vivas.

Con el objetivo de delimitar claramente la distribución de los compuestos dentro de la retina, se realizaron inyecciones de los distintos péptidos, de CF y de Texas rojo-dextrano (TR-dextrano, 10.000 Da) en moscas *moody* y *w-iso*, y transcurridas 2 h se observaron las retinas mediante microscopía confocal. Se incluyó el TR-dextrano, ya que

se ha descrito que los dextrans (MW 3.000 - 10.000 Da) no son capaces de atravesar la BHE de *Drosophila melanogaster* y que en su visualización en retina se observaron acumulados en el exterior de la misma cuando se realizó el experimento con moscas que tienen la BHE funcional. También se realizaron co-inyecciones de los distintos péptidos y CF con TR-dextrano con el fin de delimitar si el péptido estaba dentro o fuera de la retina. Las imágenes obtenidas permitieron confirmar que, como se esperaba, en las moscas *moody* tanto el TR-dextrano como el péptido utilizado se detectaron en el interior de la retina. Para las moscas *w-iso*, el TR-dextrano se acumuló en el exterior de la retina, mientras que los péptidos se detectaron en mayor o menor grado dentro y una parte se acumuló en el exterior de la retina. A modo de ejemplo, en la figura 51 se puede observar las imágenes que corresponden a una sección de la retina de moscas *w-iso* y *moody* coinyectadas con γ -péptido **CF-Gp-11** y TR-dextrano. En las moscas *moody* se observa el péptido **CF-Gp-11** (verde) y el TR-dextrano (rojo) en el interior de la retina, donde co-localizan parcialmente. El TR-dextrano se observó también delimitando el exterior de la retina, donde se aprecia una zona que muestra una mayor acumulación y que corresponde a la línea de exclusión de la hemolinfa. En esta zona también se detecta co-localización del péptido **CF-Gp-11** con el dextrano. En cambio con las moscas *w-iso*, el péptido **CF-Gp-11** se encontró localizado en el interior de la retina y en la línea de exclusión, mientras que el dextrano solo se localizó en el exterior de la retina y en la línea de exclusión, pero no en el interior de la retina. Sólo se observó co-localización de ambos compuestos en la línea de exclusión.

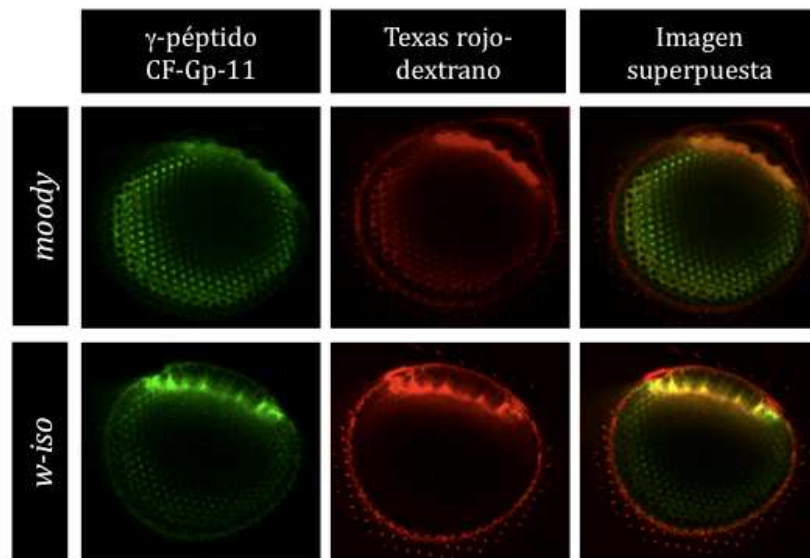


Figura 51. Imagen de la retina de *Drosophila melanogaster w-iso* y *moody* coinyectada con **CF-Gp-11** y Texas rojo-dextrano (TR-dextrano) por medio de microscopía confocal. En las imágenes de las moscas *moody* tanto la TR-dextrano como el péptido **CF-Gp-11** se detectan en el interior del ojo. Para las moscas *w-iso*, TR-dextrano se acumuló en el exterior de la retina, mientras que una parte del péptido **CF-Gp-11** se detectó dentro y una parte se acumuló en el exterior de la retina.

Al relizar las reconstrucciones 3D de la retina de los experimentos realizados, se pudieron observar diferentes zonas de fluorescencia, variables en cada caso. A modo de ejemplo, la Figura 52 muestra la reconstrucción 3D de la retina de mutante *moody* coinyectada con el γ -péptido **CF-Gp-11** y TR-dextrano (10.000 Da), en la cual se detectó

fluorescencia en la parte apical del omatidio, donde se puede distinguir la córnea y el pseudocono (Figura 52, A, C), luego, en forma secuencial aparecen las células pigmentarias (Figura 52, A, C), rabdómeros (Figura 52, A, B, C) y finalmente, se observó la capa más interna que corresponde a la lámina (Figura 52, A).

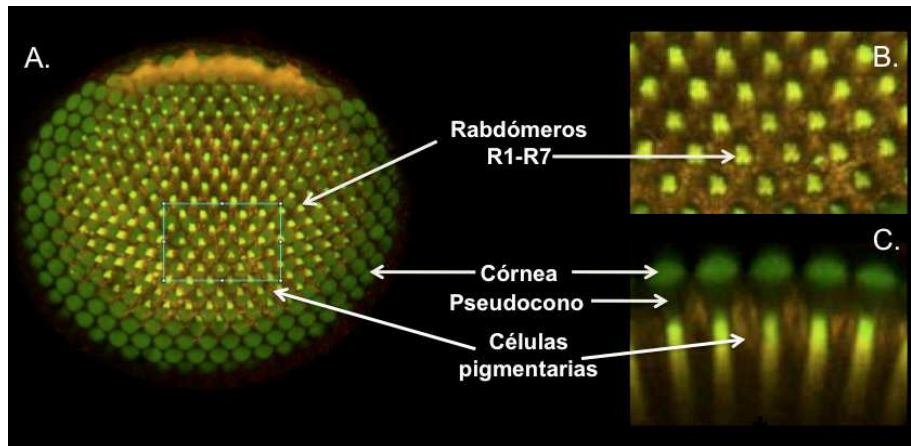


Figura 52. (A) Imágenes de microscopía confocal de la reconstrucción 3D de la retina de *Drosophila melanogaster moody* coinyectada con el γ -péptido **CF-Gp-11** y el TR-dextrano (10.000 Da, rojo). La imagen permite la localización de diferentes partes, en la parte apical del omatidio se puede distinguir la córnea y el pseudocono, luego en forma secuencial aparecen las células pigmentarias, rabdómeros y finalmente, se observa la capa más interna que corresponde a la lámina. (B) Sección ampliada donde se muestra los rabdómeros R1-R7, (C) Proyección Z de las reconstrucciones retinales, que muestra las partes del omatidio.

Así, las reconstrucciones 3D de la retina de las moscas *moody* y *w-iso* inyectadas con los diferentes péptidos, mostraron diferencias tanto en la distribución espacial de los péptidos en las retinas, como en su capacidad para atravesar la BHO (Figura 53). En las moscas *moody* se observó que el control **CF** se distribuye preferencialmente en las células pigmentarias y un poco en la córnea; en cambio en las moscas *w-iso*, la **CF** no fue capaz de atravesar la BHO (Figura 53, **CF**). Resultados similares fueron publicados por Bainton y cols.^{231,98,237} en los cuales demostraron que la **CF** inoculada en moscas *white w¹¹¹⁸* se acumula alrededor de la retina sin atravesar la BHO; mientras que en las moscas *moody*, la permeabilidad paracelular de este compuesto resulta visible debido a la función anormal de la barrera.

En el análisis de las moscas *moody* inoculadas con los diferentes péptidos se observó que todos ellos atravesaron la BHO, pero cada péptido se distribuyó en diferentes zonas de la retina (Figura 53). El péptido **CF-RGV** se localizó en los rabdómeros, las células pigmentarias y en la córnea de la retina de estas moscas e igual comportamiento se observó para los péptidos **CF-pTf-1**, **CF-pTf-2**, **CF-pAntp** y **CF-Tat**; mientras que los angiopeps mostraron un patrón similar al de la **CF** inoculada en *moody*. En cuanto a los γ -péptidos (**CF-Gp-3**, **CF-Gp-4**, **CF-Gp-7**, **CF-Gp-9**, **CF-Gp-10**, **CF-Gp-11**), sus distribuciones en la retina de estas moscas resultó muy similar entre ellos, encontrándose principalmente en los rabdómeros y en menor grado en las células pigmentarias. Adicionalmente, el péptido **CF-Gp-11** también se observó en la córnea (Figura 53, **CF-Gp-9**, **CF-Gp-10**, **CF-Gp-11**).

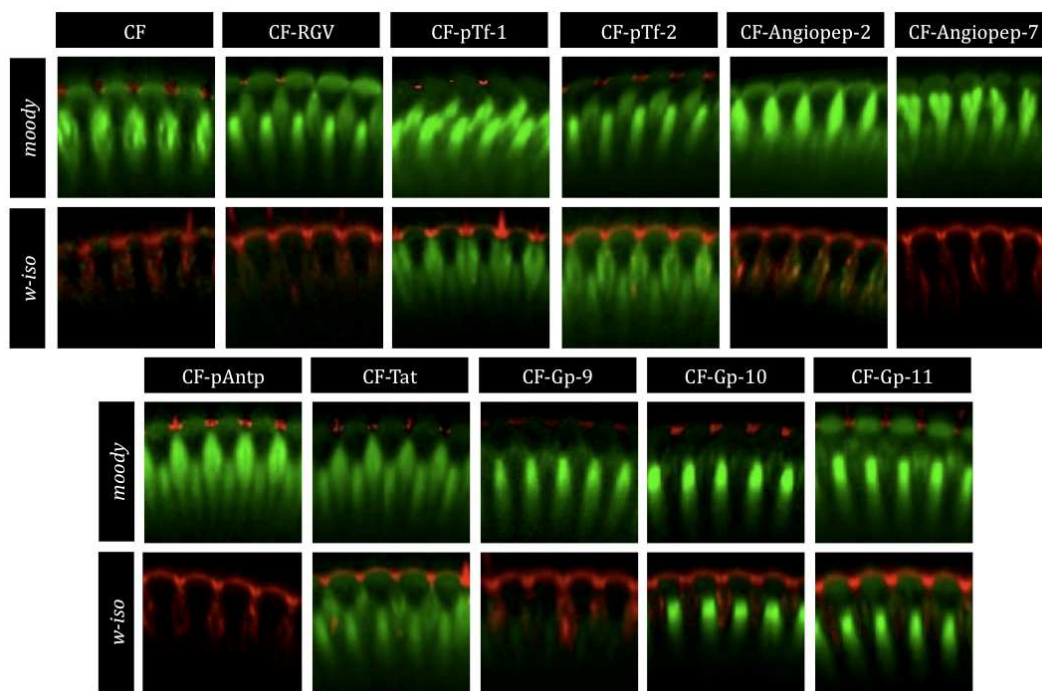


Figura 53. Imágenes de las reconstrucciones 3D de retinas de *Drosophila melanogaster* *w-iso* y *moody* inyectadas con **CF**, **CF-RGV**, dos péptidos que se unen al receptor de transferrina (**CF-pTf-1** y **CF-pTf-2**), **CF-Angiopep-2**, **CF-Angiopep-7**, **CF-Antp**, **CF-Tat** y los γ -péptidos **CF-Gp-9**, **CF-Gp-10**, **CF-Gp-11**. Las imágenes fueron tomadas 2 h post-inyección. Se utilizó como control negativo las moscas inyectadas con **CF**.

El análisis mediante microscopía confocal de las moscas *w-iso* inoculadas, permitió determinar si los compuestos inyectados atraviesan o no la barrera, así como las principales zonas de localización de estos en la retina. Los compuestos **CF-RGV**, **CF-Angiopep-2**, **CF-Angiopep-7**, **CF-Antp** y el γ -péptido **CF-Gp-11** mostraron un entrada muy baja o inexistente en la retina, similar al comportamiento de la **CF** inoculada en estas moscas. Los péptidos **CF-pTf-1**, **CF-pTf-2** y **CF-Tat** se localizaron en células pigmentarias, rabdómeros y un poco en la córnea. Finalmente, los γ -péptidos **CF-Gp-10** y **CF-Gp-11** mostraron señal de fluorescencia principalmente en rabdómeros (Figura 53).

A pesar de que los péptidos **CF-Gp-3**, **CF-Gp-4** y **CF-Gp-7** fueron inoculados tanto en moscas *moody* como en *w-iso*, no fue posible realizar reconstrucciones debido a que estos compuestos son fotosensibles, por lo que solo se capturaron las imágenes de las retinas en un solo plano. Estas imágenes muestran evidencias de la entrada de estos compuestos en la retina, aunque esta no pudo ser cuantificada.

La descripción cualitativa de la distribución espacial de los péptidos en la retina, se complementó con la valoración cuantitativa de la intensidad de la fluorescencia de un fragmento central de la retina de tamaño definido, lo cual representa una estimación indirecta del péptido fluorescente que atraviesa la barrera hematoencefálica de *Drosophila melanogaster* (Figura 54 y 55). Se selecciona un fragmento central con el objetivo de eliminar la fluorescencia de los péptidos retenidos en el exterior de la retina que no atravesaron la barrera. Como se esperaba, la intensidad de fluorescencia en las

moscas *moody* para todos los péptidos fue mayor que la detectada para cada uno de ellos en los experimentos realizados con las moscas *w-iso*.

A pesar de que todos los compuestos mostraron una entrada en la retina en las moscas *moody* inyectadas claramente superior, estos presentaron una variabilidad en la entrada dependiendo del compuesto inyectado. Todos los compuestos analizados, con excepción del **CF-Gp-9**, presentaron mayor intensidad de fluorescencia que la **CF**. El **CF-pTf-1**, **CF-Angiopep-2** y **CF-Gp-11** fueron los compuestos que presentaron valores de entrada mayores (Figura 54). Probablemente, la variación de los valores de intensidad de fluorescencia detectadas para los compuestos inoculados en *moody*, se deba a parámetros como la solubilidad y la interacción de estos con la hemolinfa. Los experimentos realizados con las moscas *moody* inyectadas con los diferentes péptidos pueden utilizarse como controles positivos de entrada masiva y además, corroboran la importancia de la función de la barrera, tanto en el cerebro como en la retina.

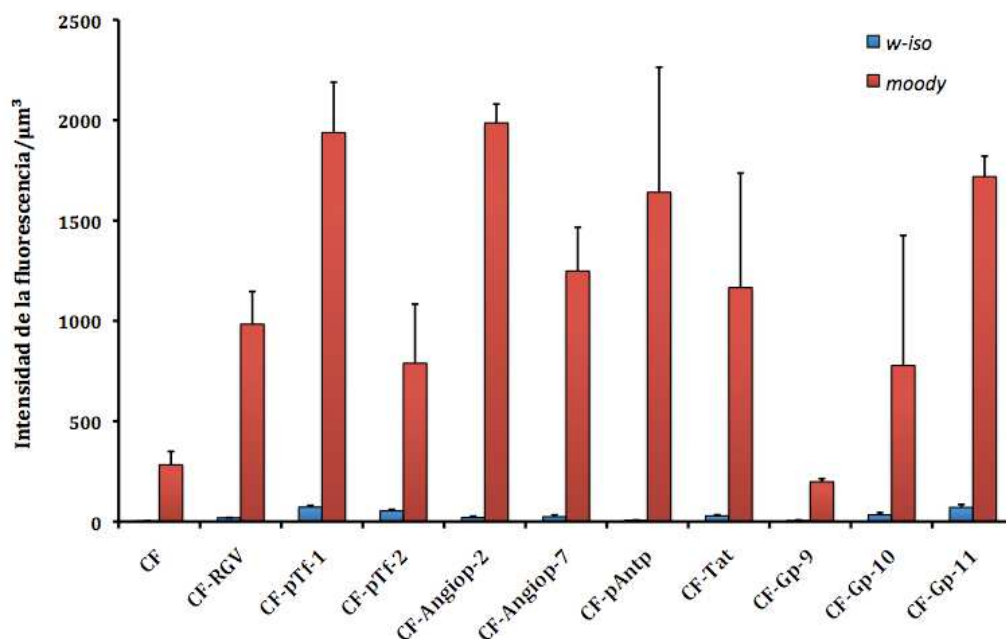


Figura 54. Determinación de la intensidad de fluorescencia mediante microscopía confocal en un fragmento de retina de *Drosophila melanogaster w-iso* (barra azul) y *moody* (barra rojas) inoculadas con los diferentes péptidos. Se detectó la intensidad de la fluorescencia en un área específica de las reconstrucciones de la retina de moscas *w-iso* inyectadas con **CF** y con los péptidos **CF-RGV**, **CF-pTf-1**, **CF-pTf-2**, **CF-Angiopep-2**, **CF-Angiopep-7**, **CF-pAntp**, **CF-Tat** y los γ -péptidos **CF-Gp-9**, **CF-Gp-10**, **CF-Gp-11**.

El análisis de la intensidad de fluorescencia determinada de los diferentes péptidos que se inyectaron en moscas *w-iso* que presentaban una barrera hematoencefálica intacta (Figura 55) mostró valores de intensidad de fluorescencia mucho más bajos, remarcando el efecto de la barrera. De todos los péptidos control ensayados, aquellos que se unen al receptor transferrina (**CF-pTf-1** y **CF-pTf-2**) fueron los que presentaron valores de entrada superiores.

Por otra parte, la intensidad de fluorescencia de los γ -péptidos **CF-Gp-10** y **CF-Gp-11** en las retinas de las moscas *w-iso* fue significativamente superior a la **CF**, siendo el γ -

péptido **CF-Gp-11** el que mostró capacidad para atravesar la BHO con valores similares a los obtenidos con los péptidos que se unen al receptor transferrina (Figura 55).

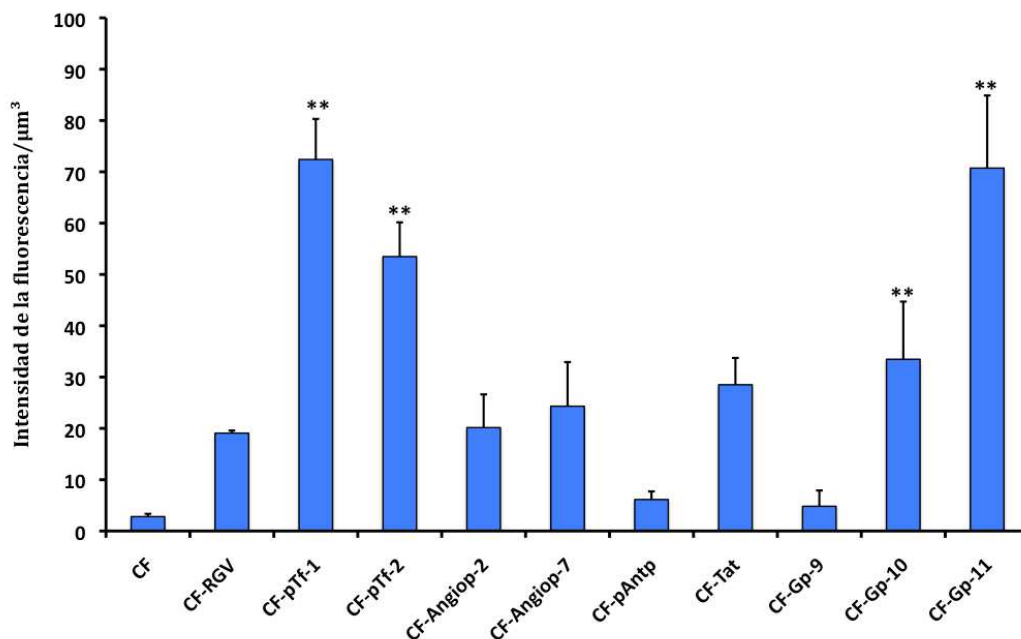


Figura 55. Determinación de la intensidad de fluorescencia mediante microscopía confocal en un fragmento de retina de *Drosophila melanogaster w-iso* previamente inoculadas con los diferentes péptidos. Se detectó la intensidad de la fluorescencia en un área específica de las reconstrucciones de la retina de moscas *w-iso* inyectadas con **CF** y con los péptidos **CF-RGV**, **CF-pTf-1**, **CF-pTf-2**, **CF-Angiopep-2**, **CF-Angiopep-7**, **CF-pAntp**, **CF-Tat** y los γ -péptidos **CF-Gp-9**, **CF-Gp-10**, **CF-Gp-11**. Se analizaron 4 moscas por compuesto. Las barras representan la desviación estándar (SD) del valor medio de la intensidad de fluorescencia detectada en el fragmento seleccionado de la retina. La prueba de Tukey se utilizó para comparar las diferencias de las medias con un $p < 0.05$ (*) y 0.01 (**).

A diferencia de los resultados en moscas *moody*, se observó que los péptidos **CF-RGV**, **CF-Angiopep-2**, **CF-Angiopep-7**, **CF-Tat**, **CF-pAntp** y el γ -péptido **CF-Gp-9** mostraron valores de intensidad de fluorescencia menores, lo cual indica que no fueron capaces de atravesar la barrera o lo hicieron en cantidades inferiores a las anteriormente determinadas (Figura 55). El **CF-pAntp** y el **CF-Gp-9** presentaron valores de intensidad de fluorescencia similares a los de la **CF**. El péptido **CF-Tat** presentó un valor de intensidad de fluorescencia medio, siendo ligeramente superior a los de los **CF-Angiopeps**.

3.2.3.2 Disección del cerebro de moscas *moody-Gal4* inoculada con γ -péptido **Atto 565-Gp-11**.

Con el objetivo de corroborar inequívocamente los resultados obtenidos, se realizó la disección del cerebro de moscas *moody-Gal4* a las 2 h de inyectar en el abdomen el **Gp-11** marcado con **Atto 565** (**Atto 565-Gp-11**).

Para llevar a cabo este estudio, decidimos utilizar las líneas de moscas *moody-Gal4*, inoculadas con el péptido **Atto 565-Gp-11**. Este péptido se seleccionó tomando en

cuenta los resultados de entrada obtenidos, tanto en los estudios previos de epifluorescencia como de microscopía confocal.

Las moscas *moody-Gal4* presentan un patrón de expresión Gal4 específico para la capa de glía subperineural y pseudocartucho, generando individuos con la BHE delineada con GFP (marcador verde). En esta línea de moscas la barrera hematoencefálica no está alterada, presentando una función normal a diferencia de la línea utilizada anteriormente *moody (moody Null)*. Las moscas *moddy-Gal4* se seleccionaron con el objetivo de verificar la localización real del péptido, asegurando si este se encuentra dentro del cerebro o simplemente se ha acumulado en la superficie externa de la barrera (Figura 56).

Debido al color verde de la BHE generada por la expresión de la GFP en las moscas *moody-Gal4*, fue necesario cambiar el fluoróforo utilizado en los experimentos anteriores (**CF** de color verde), por **Atto 565** (de color rojo). El uso de este fluoróforo sólo permite observar la distribución de este en el cerebro de mosca disectado, pero no es compatible al ensayo que mide la fluorescencia en retina, ya que estas moscas (*moddy-Gal4*) presentan pigmentación roja dificultando la detección del fluoróforo en ellas.

Como se conoce el cambio de fluoróforo *per se* puede generar resultados diferentes a los encontrados previamente para el péptido marcado con **CF**, por lo que se realizaron estudios de microscopía confocal en retina de moscas *moody* y *w-iso* con el fluoróforo **Atto 488**, que presenta características de fluorescencia similares a la **CF**. Comparando la fluorescencia en la retina de la **CF** y el **Atto 488** se mostró similitud entre ambos. Además, se analizaron mediante microscopía confocal moscas inoculadas con **Gp-11** conjugado a **CF** ó a **Atto 488**, respectivamente, confirmando en ambos casos resultados similares, por lo que se puede considerar que el fluoróforo no influye en el resultado obtenido. Los fluoróforos **Atto 565** y **Atto 488** son más estables que la **CF** pero más costosos.

El péptido **Gp-11** conjugado al **Atto 565 (Atto 565-Gp-11)** se inyectó en moscas *moody-Gal4*, a las 2 horas se disectó el cerebro y se analizó por microscopía confocal la zona correspondiente al lóbulo óptico (Figura 56).

Las imágenes del lóbulo óptico del cerebro de las *moody-Gal4* inyectadas con **Atto 565-Gp-11**, confirmaron la presencia del péptido por debajo de la glía sub-perineural marcada (Figura 56).

Los estudios de microscopía confocal realizados en los cerebros disectados, nos permitió corroborar que el péptido **Atto 565-Gp-11** atraviesa la BHE. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal del lóbulo óptico del cerebro disectado de las moscas *moody-Gal4*, mostraron la presencia de fluorescencia en las proyecciones axonales provenientes de la lámina, confirmando que este compuesto llega a la retina por esta vía, por lo que se demuestra que atraviesa la BHE (Figura 56).

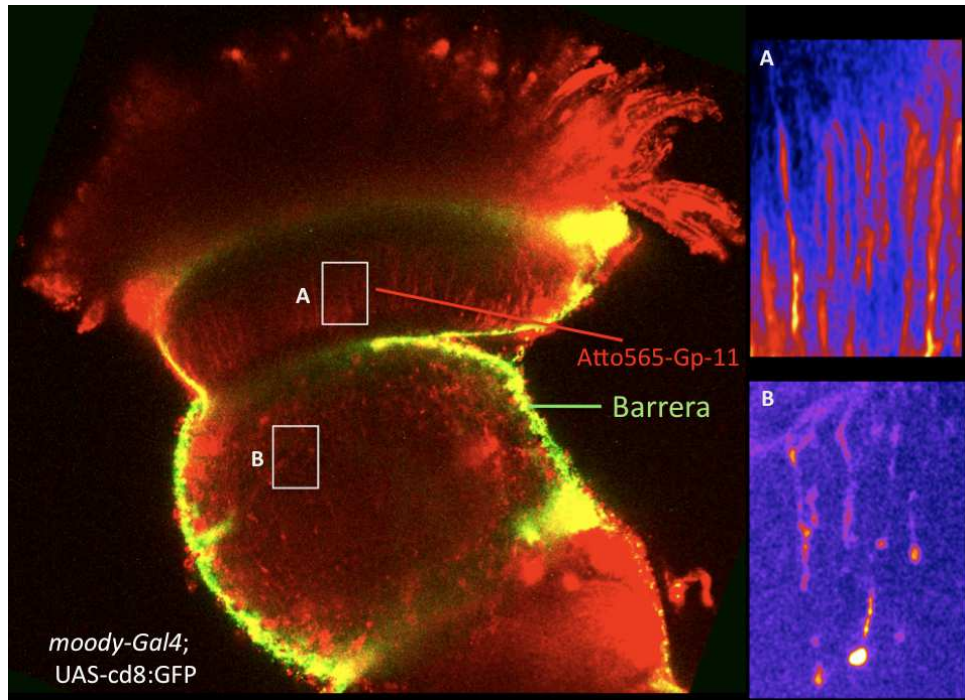


Figura 56. Lóbulo óptico disectado de moscas *moody-Gal4* previamente inoculado con el **Atto 565-Gp-11**. A. Lámina y B. Médula. Proyecciones axonales en las cuales esta presente el **Atto 565-Gp-11** (rojo).

3.3 Discusión.

3.3.1 Epifluorescencia como primer acercamiento a *Drosophila melanogaster* como modelo para estudiar la BHE

Los estudios de epifluorescencia, mostraron la potencialidad del modelo para estudiar la capacidad de los péptidos de atravesar la barrera de *Drosophila melanogaster*, aunque no resultaron concluyentes.

En las moscas *w*¹¹¹⁸ inyectadas con todos los péptidos ensayados, previamente diluïdos en el tampón correspondiente, se observó a las 4 h post-inoculación diferentes porcentajes de moscas con fluorescencia en la retina, siendo los péptidos Angiopeps los que presentaron un porcentaje más bajo (Figura 45). Estudios de supervivencia frente a los diferentes péptidos, realizados en grupos de 20 moscas por péptido, mostraron un elevado porcentaje de sobrevivencia ($\geq 75\%$), excepto en el caso de los péptidos **CF-Angiopep-7** y el **CF-pTf-2** (Figura 46). Los resultados permiten concluir que la supervivencia de las moscas está relacionada con la manipulación al llevar a cabo el proceso de inyección, además del compuesto inoculado *per se* o la solución utilizada para disolverlo.

Los estudios de epifluorescencia realizados en las moscas *moody* nos permitieron disponer de un patrón positivo de señal en retina útil para comparar con las moscas *w-iso* inoculadas (Figura 47 y Figura 48). Como se ha mencionado anteriormente, los estudios de epifluorescencia resultaron útiles como primera aproximación, pero no mostraron resultados concluyentes debido a que su interpretación depende en gran medida de la educación del ojo del experimentador al captar la fluorescencia. Este hecho podía inducir a la detección de “falsos positivos” causados por una interpretación errónea, al visualizar la retina en el microscopio. Se ha de tener en cuenta, que los estudios de epifluorescencia implican la observación directa por parte del ojo humano, de la imagen generada por la lupa, con el consecuente error implícito en la observación subjetiva del ensayo.

3.3.2 Microscopía confocal de barrido de láser: herramienta eficiente para estudiar la permeabilidad de la BHE en *Drosophila melanogaster*.

Los estudios de microscopía confocal de barrido de láser, nos permitieron profundizar en el comportamiento de todos los compuestos seleccionados en el modelo *in vivo* *Drosophila melanogaster* (*moody* y *w-iso*). Los resultados de las moscas *moody* avalan su utilidad como controles positivos, aunque también podrían utilizarse como modelo para estudiar la entrada de distintos compuestos en enfermedades asociadas con defectos en la BHE. Los estudios realizados con moscas *w-iso* presentan una variabilidad en los datos obtenidos, tanto de carácter cualitativo como cuantitativo, pudiendo discriminar entre compuestos que presentan entrada en retina como entre los que no lo hacen. Esto confirma la potencialidad de este modelo para estudiar la capacidad de los compuestos de atravesar la barrera.

Los estudios de coinyección realizados en *Drosophila melanogaster* (*w-iso* y *moody*) (Figura 51) permitieron establecer el patrón de ubicación dentro de la retina de los compuestos inoculados. Por ejemplo, en las moscas *moody* coinyectadas, tanto el TR-dextrano como el **CF-Gp-11** se detectaron en el interior del ojo. Para las moscas *w-iso*, el TR-dextrano se acumuló en el exterior de la retina, mientras que una parte del **CF-Gp-11** se detectó dentro y una parte se acumuló en el exterior de la retina. Estos estudios, facilitaron la interpretación posterior de las imágenes complejas de microscopía confocal, correspondientes a las reconstrucciones 3D.

Las reconstrucciones 3D de la retina de las moscas *moody* y *w-iso* inyectadas con los diferentes péptidos, así como la cuantificación de la fluorescencia de una sección determinada (Figuras 53, 54 y 55) demostraron que los péptidos que se unen al receptor transferrina (**CF-pTf-1** y **CF-pTf-2**)²⁴⁸ atravesaron la BHE hasta llegar a la retina en *Drosophila melanogaster w-iso*. Anteriormente, Prades y cols.²⁴⁹ demostraron que nanopartículas funcionalizadas con **CF-pTf-2** atravesaban la BHE de ratones. Nuestro resultado podría evidenciar la presencia en *Drosophila* de receptores homólogos a los receptores transferrina presentes en el cerebro de ratón, a pesar de que el análisis del genoma de este insecto ha revelado que contiene varias proteínas con características similares al receptor transferrina, pero sin reconocerse un homólogo al mismo receptor presente en los vertebrados.^{263,264} Por otra parte, los datos obtenidos también podrían indicar la existencia de un mecanismo de entrada alternativo a través de la barrera para estos compuestos (**CF-pTf-1** y **CF-pTf-2**). A pesar de los esfuerzos que se han hecho para encontrar receptores transferrina en insectos similares al TfR1 de los humanos, hasta el momento no se han identificado, a pesar de que existe homología entre la transferrina Tfs1 de los insectos y la transferrina de la sangre humana.²⁶⁵ Dada la abundancia de transferrina en la hemolinfa de los insectos, es probable que tengan el mismo gen ancestral del receptor transferrina de mamíferos, pero que este haya divergido en su secuencia y no pueda ser reconocido, por lo que la entrada de la transferrina en las moscas sea independiente del receptor.²⁶⁶

En cuanto a los γ -péptidos guanidilados que tuvieron la capacidad de atravesar la barrera en *Drosophila melanogaster w-iso* (**CF-Gp-10** y **CF-Gp-11**, Figuras 53 y 55), probablemente esta se deba a que estos presentan varios grupos guanidínicos en su secuencia, lo que les convierte en especies con carga positiva neta. Además, su secuencia los hace más resistentes que los péptidos naturales frente a las proteasas de la hemolinfa y la retina. Esta familia de γ -péptidos⁴⁹ y las secuencias peptídicas que contienen residuos prolina^{267,268} han mostrado ser más resistentes a las peptidasas.^{49,267,268} Estos resultados evidencian que la presencia de cargas positivas en el péptido puede ser importante en la permeabilidad de la BHE. La densidad de carga del péptido depende del pH del medio circundante y en igual medida se modifica su grado de ionización. Se ha demostrado que aumentando el carácter catiónico de moléculas como péptidos y proteínas, se incrementa su capacidad para atravesar la BHE.^{199,200} Resultados similares se obtuvieron al sustituir una prolina y adicionar un guanidinio a la Endomorfin II para cargar positivamente la molécula consiguiendo mejorar la entrada al SNC de este péptido opioide.²⁶⁹

Por otra parte, los péptidos como **CF-RGV**, los **CF-angiopeps**, **CF-pAntp**, **CF-Tat** y **CF-Gp-9**, no fueron detectados o se visualizaron en menor proporción en las retinas de

Drosophila melanogaster w-iso. Este resultado podrían estar relacionado con el aumento de masa molecular para el caso del **CF-RGV**. El **CF-Angiopep-2**, presentó un comportamiento similar a su control negativo **CF-Angiopep-7**, lo cual podría deberse a que los receptores de la LRP similares o con propiedades homólogas presentes en *Drosophila*,²⁷⁰ no son capaces de reconocer esta secuencia específica. Los resultados de **CF-pAntp** y **CF-Tat**, fueron consistentes con observaciones anteriores, en los que se demostraba que estos compuestos atraviesan la BHE de ratones en cantidades poco significativas,²⁷¹ aunque resultó contradictorio con los resultados obtenidos por Sarantseva y cols. 2009²¹⁴ para el **CF-pAntp**, en los cuales observan la acumulación de este péptido en el cerebro de *Drosophila melanogaster*. El péptido **CF-Gp-9** se comportó tal y como se esperaba como un claro ejemplo de compuesto que no atraviesan la BHE, teniendo en cuenta que esta molécula presenta cadenas laterales funcionalizadas con grupos ácidos (-COOH), por lo que presenta menos densidad de carga positiva que el resto de los compuestos analizados (Figuras 53 y 55).

Una novedad de la metodología diseñada en este trabajo es que nos ha permitido observar la distribución espacial de los péptidos presentes en el interior de la retina de *Drosophila (moody y w-iso)*. Los estudios de microscopía confocal de la retina de moscas inyectadas con los γ -péptidos, demostraron que los péptidos **CF-Gp-10** y **CF-Gp-11** se localizaron fundamentalmente en los rabdómeros (Figura 53, **CF-Gp-10** y **CF-Gp-11**). Teniendo en cuenta que la fluorescencia detectada en los rabdómeros está relacionadas con la presencia de las células fotorreceptoras R1-R7, la señal observada podría ser el resultado de la distribución del compuesto que atraviesa las proyecciones axonales, desde la lámina y la médula, hasta llegar a las células fotorreceptoras R1-R6 y R7, respectivamente. Esta hipótesis se corroboró mediante el estudio de microscopía confocal del cerebro disectado de moscas *moody-Gal4* inyectadas con el **Atto 565-Gp-11** (Figura 56). Este estudio demostró la presencia del compuesto por debajo de la barrera hemotencéfálica. Ampliaciones de la lámina y la médula del lóbulo óptico, corroboran la presencia del péptido **CF-Gp-11** en las proyecciones axonales, que se conectan directamente a la retina (Figura 56).

Los péptidos que demostraron que atraviesan la BHE de *Drosophila*, como **CF-pTf-1**, **CF-pTf-2** y los γ -péptidos **CF-Gp-10** y **CF-Gp-11**, en un futuro podrían servir como moléculas portadores de fármacos y/o nanotransportadores y facilitar el transporte de estas entidades químicas a través de la barrera.

Los análisis de microscopía de fluorescencia (epifluorescencia y microscopía confocal) realizados, nos permiten validar a *Drosophila melanogaster* como modelo *in vivo* viable, para el desarrollo de un método de evaluación en la búsqueda de compuestos capaces de atravesar la BHE mediante transcitosis inespecífica y de esta manera acceder a estructuras novedosas como transportadores o fármacos, frente a enfermedades relacionadas con el SNC. Además, nos ha permitido confirmar que la BHO se encuentra estructuralmente relacionada con la BHE en *Drosophila*.

Conclusiones

- Los péptidos modelos seleccionados (**CF-RGV**, **CF-pTf-1**, **CFpTf-2**, **CF-Angiopeps**, **CF-pAntp** y **CF-Tat**), así como los 6 γ -péptidos (**CF-Gp-3**, **CF-Gp-4**, **CF-Gp-7**, **CF-Gp-9**, **CF-Gp-10** y **CF-Gp-11**) se sintetizaron, purificaron y caracterizaron, alcanzando la pureza necesaria para los estudios de fluorescencia.
- La epifluorescencia no resultó una metodología concluyente al estudiar la permeabilidad de la BHE. Mediante las observaciones de la presencia o no de fluorescencia en la retina, la mayoría de los compuestos fluorescentes estudiados atravesaron la barrera, demostrando la debilidad de este método. Sin embargo, podría resultar de utilidad como herramienta adicional a estudios de microscopía confocal, debido a que permite detectar errores asociados con el proceso de inyección, así como en la selección de individuos a analizar en microscopía confocal.
- La microscopía confocal de barrido de láser permitió validar a *Drosophila melanogaster* como modelo apropiado para estudiar la permeabilidad de la BHE frente a diferentes compuestos. Con esta metodología se realizaron estudios tanto cualitativos como cuantitativos, de la capacidad de los diferentes compuestos testados para atravesar la BHE:
 - De los péptidos modelos seleccionados, aquellos reconocidos por receptores transferinas **CF-pTf-1** y **CF-pTf-2** atravesaron la barrera y se localizaron en las células pigmentarias y rabdómeros, mientras que los péptidos **CF-RGV**, **CF-angiopeps**, **CF-pAntp** y **CF-Tat** no fueron detectados.
 - De la familia de γ -péptidos estudiados, los péptidos **CF-Gp-10** y **CF-Gp-11** atravesaron la barrera y se localizaron mayoritariamente en rabdómeros y en menor proporción en córnea y células pigmentarias. Estos compuestos resultaron candidatos promisorios en la búsqueda de compuestos que atraviesan la BHE.
- El análisis de microscopía confocal, del cerebro disectado de moscas *moody-Gal4* inyectadas con el péptido **Atto565-Gp-11**, mostró la presencia del mismo en las proyecciones axonales del lóbulo óptico, las cuales se conectan directamente a la retina, confirmando inequívocamente que el péptido **Gp-11** atraviesa la barrera.
- La diversidad de líneas mutantes de *Drosophila melanogaster* (*w¹¹¹⁸*, *w-iso*, *moody* y *moody-Gal4*), utilizadas para realizar el estudio de microscopía confocal, ayudaron a esclarecer e interpretar los resultados obtenidos.

DISCUSIÓN GENERAL

El estudio de los γ -péptidos miméticos basados en *cis*- γ -amino prolina con capacidad de atravesar la membrana celular en diferentes organismos, constituye una temática de gran interés en el área de biomedicina, para su futuro desarrollo como transportadores moleculares. Estos análisis ayudan a profundizar y entender como las características intrínsecas de cada compuesto, asociadas a su estructura, como la composición de las cadenas laterales, la carga neta de la molécula, así como la estabilidad metabólica, son factores cruciales para su desarrollo como transportadores. Como continuación de una línea de trabajo de nuestro grupo de investigación, en este trabajo se estudió la capacidad de translocación en distintos tipos de barreras biológicas, de una pequeña quimioteca de γ -péptidos previamente seleccionados en un cribado realizado con anterioridad. Algunos de los γ -péptidos seleccionados, tuvieron la capacidad de atravesar la membrana plasmática de células HeLa y MAEC (Ej. **CF-Gp-7** y **CF-Gp-10**, respectivamente), la membrana plasmática de los promastigotes de *Leishmania donovani* (Ej. **CF-Gp-11** y conjugados del mismo) y la BHE de *Drosophila melanogaster* (Ej. **CF-Gp-11**) (Figura 57).

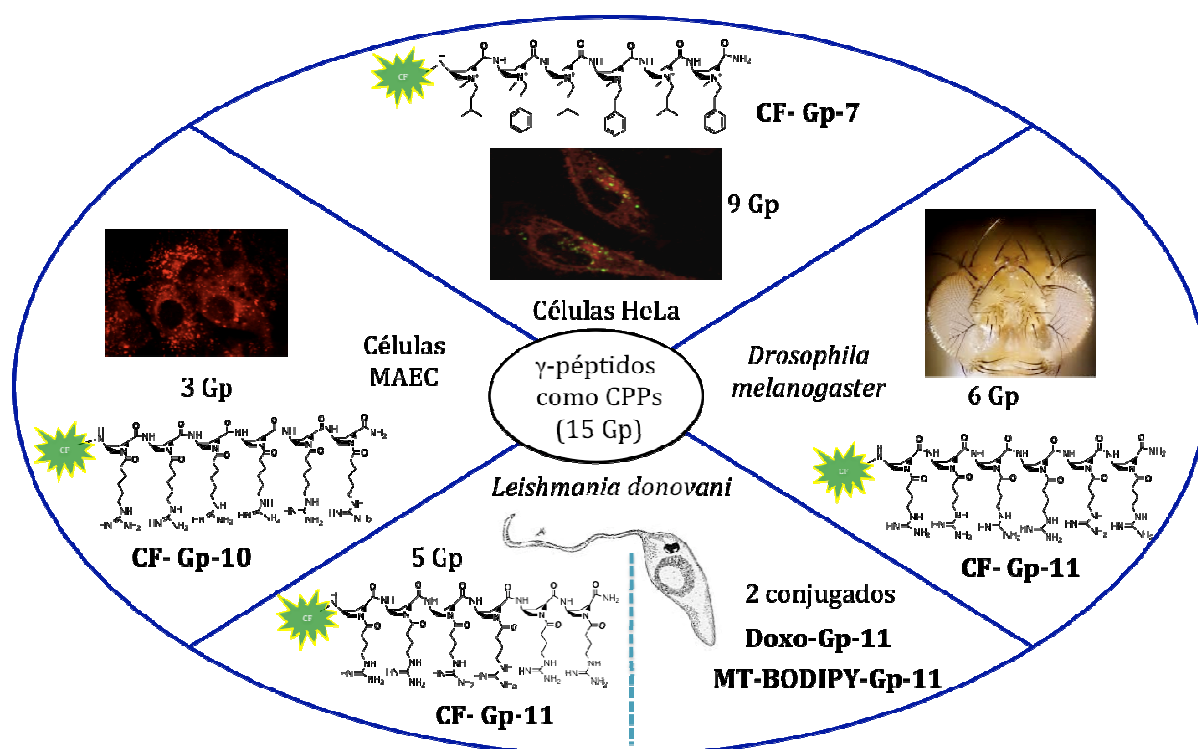


Figura 57. Estudios de γ -péptidos como CPPs realizados en este trabajo.

γ -péptidos en células HeLa.

Los compuestos utilizados en este estudio, fueron seleccionados a partir de los resultados obtenidos en una evaluación previa de una quimioteca de 106 γ -péptidos. Los estudios de citometría de flujo y microscopía confocal de estos compuestos en células HeLa, permitieron evaluar su capacidad de atravesar la membrana plasmática de estas células, así como su localización intracelular. La incubación durante 2 h de estos péptidos en este tipo de células, permitió identificar varios compuestos con capacidad de entrada celular, presentando sólo tres de ellos (**CF-Gp-4**, **CF-Gp-7** y **CF-Gp-8**)

porcentajes de entrada superiores al 50% con respecto a **CF-Tat**. Uno de los compuestos ensayados (**CF-Gp-7**) mostró una capacidad de entrada igual que la del control positivo utilizado (**CF-Tat**). Los péptidos **CF-Gp-7** y **CF-Gp-8**, con entradas del 100% y 80%, respectivamente respecto a **CF-Tat**, presentan una estructura similar conteniendo ambas aminas cuaternarias en su secuencia y una alternancia de cadenas laterales de tipo alifático y aromático. El péptido **CF-Gp-4**, que tiene un porcentaje de entrada ligeramente inferior al 80% presenta en su estructura aminas terciarias funcionalizadas con cadenas alifáticas guanidiladas y cadenas alquilaromáticas. Los péptidos **CF-Gp-10** y **CF-Gp-11** que son homooligómeros con cadenas laterales funcionalizadas con grupos guanidinos mostraron un porcentaje de entrada cercano al 50%, mientras que el resto mostró valores de entrada inferiores, por debajo del 40%.

Cuando estos compuestos se incubaron durante tiempos largos (24 h) en células HeLa, en todos se incrementó su capacidad de atravesar la membrana citoplasmática de las células, aunque sólo cinco de ellos (**CF-Gp-1**, **CF-Gp-2**, **CF-Gp-5**, **CF-Gp-7**, **CF-Gp-8**) mostraron un incremento relevante en la capacidad de entrada con respecto al control positivo **CF-Tat**. El control positivo es un α -péptido por lo que resulta fácilmente vulnerable a la acción de proteasas,⁴⁷ mientras que las características estructurales de nuestros compuestos han demostrado ser más resistentes a estas.⁴⁹ En este caso los péptidos **CF-Gp-7** y **CF-Gp-8** también mantuvieron su capacidad de entrada celular, poniendo en evidencia que la presencia de aminas cuaternarias a lo largo de la secuencia y una alternancia de cadenas laterales alifáticas y aromáticas constituyen un patrón estructural que favorece la capacidad de entrada de estos péptidos. Resultó significativo el caso del péptido **CF-Gp-5** que fue el que presentó mayor porcentaje de entrada en estas condiciones, mientras que a tiempos cortos era uno de los que tenía menor capacidad de entrada. En cambio el péptido **CF-Gp-4** que a tiempos de incubación cortos mostraba un porcentaje de entrada del 80%, en estas condiciones presenta valores de entrada ligeramente superiores al **CF-Tat**. Ambos péptidos tienen estructuras similares, presencia de aminas terciarias en el esqueleto y alternancia de cadenas guanidiladas e hidrofóbicas, pero en un caso estas son de carácter alquílico (**CF-Gp-5**) y en el otro de carácter alquilaromático (**CF-Gp-4**). Con esto datos en mano podría suponerse que la permanencia de grupos alifáticos en la cadena, aunque propician una entrada más lenta al interior de la célula, favorecen su permanencia en esta a tiempos más largos.

Tres γ -péptidos representativos a nivel estructural fueron seleccionados del conjunto de compuestos analizados (Figura 58) y se utilizaron en estudios de localización intracelular mediante microscopía confocal en células vivas. Estos estudios se realizaron en presencia de diferentes marcadores específicos de organelos (citoplasma, lisosomas o endosomas tardíos, mitocondrias, retículo endoplasmático y aparato de Golgi) y se determinó la colocalización tanto cualitativa como cuantitativa, mediante el empleo de los coeficientes de correlación (Pearson y Manders). Los resultados demostraron que estos γ -péptidos se localizan en el citoplasma de la célula en forma de vesículas y no se encuentran unidos a la membrana nuclear ni al núcleo, evidenciando una entrada celular principalmente por vía endocítica.⁴⁹ Esto coincide con otros estudios reportados anteriormente donde se postula la endocitosis como una de las principales vías que permiten la internalización del **Tat** y de péptidos ricos en argininas (R9).¹¹³

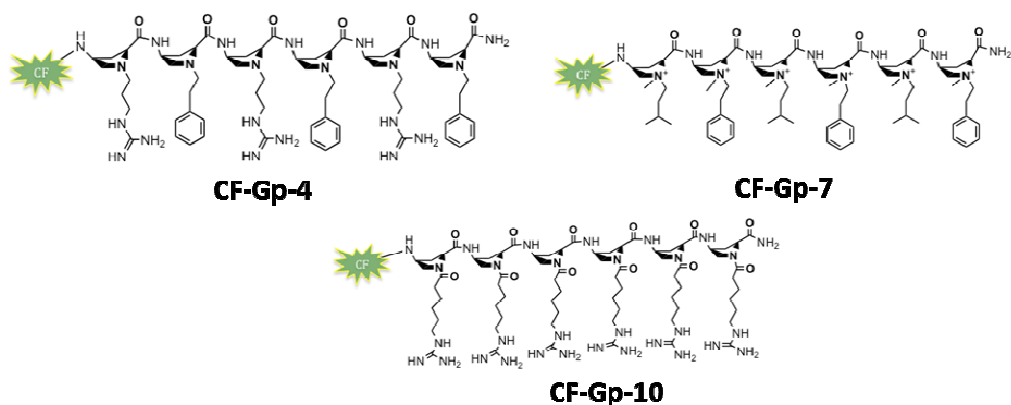


Figura 58. Estructuras químicas de los tres γ -péptidos seleccionados de la quimioteca.

En los experimentos para determinar la localización intracelular de los γ -péptidos utilizando las sondas fluorescentes específicas para marcar orgánulos, solo se observó colocalización cualitativa y cuantitativa con los lisosomas y endosomas tardíos, mientras que no se detectó colocalización con las mitocondrias, el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático. En todos los péptidos estudiados, una parte del compuesto internalizado no colocalizó con ningún organelo, resultado que puede estar relacionado con una entrada celular vía macropinocitosis¹²² o a que se encuentren en endosomas tempranos, los cuales no son marcados por la sonda fluorescente correspondiente. Las trayectorias determinadas en este estudio para los tres γ -péptidos, confirmaron la interacción de estos con los lisosomas o endosomas tardíos.

Los perfiles de distribución obtenidos en este estudio avalaron la posible entrada de estos γ -péptidos vía endocítica. Estos perfiles de distribución están estrechamente relacionados con las estructuras químicas de estos compuestos y sus propiedades físico-químicas. El número de partículas fluorescentes detectadas para los dos compuestos guanidilados (**CF-Gp-4** y **CF-Gp-10**) fue muy similar a la determinada para el **CF-Tat**, mientras que para el compuesto que presenta aminas cuaternarias y cadenas laterales hidrofóbicas (**CF-Gp-7**) resultó muy superior. Todas las partículas mostraron un tamaño promedio entre 0.15-0.24 μm^3 , resultando el compuesto con las aminas cuaternarias el de mayor tamaño. La combinación entre las cadenas hidrofóbicas y las cargas positivas de las aminas cuaternarias presentes en este compuesto, favorecen las interacciones no covalentes como las Van der Waals, puentes de hidrógeno, así como interacciones electrostáticas que favorecen la mayor agregación de este compuesto, en comparación con el resto de los γ -péptidos analizados y el **CF-Tat**.

En cuanto al resultado del número de partículas, el γ -péptido que presenta seis residuos guanidilados, los cuales son superiores en tamaño a las cadenas laterales presentes en los otros γ -péptidos analizados, a pesar de las interacciones no covalentes generadas en esta estructura, no fueron suficientes para favorecer su agregación, dando lugar a partículas esféricas más pequeñas y en mayor cantidad.

Aunque los resultados de los perfiles de distribución avalaron la vía endocítica como posible mecanismo de entrada, no podemos considerarlos concluyentes, teniendo en cuenta estudios anteriores, que demostraron que las células HeLa internalizan rápidamente partículas no esféricas con dimensiones de hasta de 3 μm .¹⁴⁰ El tamaño de

las partículas, nos permite descartar la vía endocítica mediada por caveola, debido a que todas presentaron tamaños superiores a los 0.060 μm determinados para las invaginaciones generadas en este mecanismo.¹²⁸ Cualquiera de los otros mecanismos conocidos son probables, teniendo en cuenta que los tamaños determinados para nuestras partículas fluorescentes se encuentran en el rango de los valores determinados en estudios similares para los liposomas y las vesículas recubiertas de clatrina.¹²⁸

Los experimentos de internalización de los tres γ -péptidos (Figura 58) en células HeLa en presencia de inhibidores específicos de distintos mecanismos, demostraron que en general, en la entrada de estos péptidos están involucrados al menos dos mecanismos endocíticos, la vía clatrina y la macropinocitosis. Adicionalmente, el péptido **CF-Gp-7** presentó inhibición frente a filipina que es un inhibidor de la vía caveola, por lo que este mecanismo también coexiste con los anteriormente señalados para este péptido. Similar comportamiento se ha mostrado en estudios de inhibición de la internalización del péptido **Tat** y otros péptidos ricos en argininas en células HeLa.^{113,123,128,131}

γ péptidos en células MAEC.

Adicionalmente, se realizaron estudios de internalización de los tres γ -péptidos (Figura 58) en un cultivo primario de células MAEC y en presencia de una sonda fluorescente que marca los lisosomas. Los resultados mostraron que los péptidos **CF-Gp-4** y **CF-Gp-10**, con tres y seis residuos guanidilados a lo largo de su secuencia, fueron capaces de entrar en este tipo de células y colocalizar con los lisosomas, mientras que el γ -péptido con aminos cuaternarios lo hizo en baja proporción. Esto pone en evidencia que tal y como ya se había visto en trabajos previos del grupo,⁵⁰ estos péptidos mostraron distinta capacidad de entrada frente a distintas líneas celulares, mostrando un patrón de estructura-actividad distinto en cada línea celular. Esto hace que los γ -péptidos no puedan ser considerados CPPs o transportadores universales como en general se considera al **Tat**, sino que es necesario establecer su patrón de entrada en cada caso. En células MAEC la presencia de grupos guanidínicos en la secuencia parece favorecer tanto la entrada a través de la membrana como la acumulación en lisosomas frente a la presencia de aminos cuaternarios.

γ péptidos guanidilados en *Leishmania donovani*.

Tomando como punto de partida los resultados obtenidos previamente en nuestro grupo de investigación, que demostraban que el γ -péptido **CF-Gp-11** con seis residuos guanidilados, internalizaba en *Leishmani donovania* y en *Leishmania pifanoi*, se llevó a cabo la síntesis en fase sólida y la caracterización de una familia de γ -péptidos inspirada en este compuesto (Figura 59), con lo que se pretendía explorar el efecto del tamaño del péptido y el número de residuos guanidilados, en la capacidad de atravesar la membrana plasmática de estos compuestos en *Leishmania donovani*. La presencia de grupos guanidínicos en una secuencia peptídica se ha considerado un elemento estructural importante para el proceso de internalización de células mamíferas, ya que estos grupos funcionales permiten establecer una interacción electrostática entre el péptido catiónico y los grupos fosfatos en la superficie de la membrana celular.^{89,182}

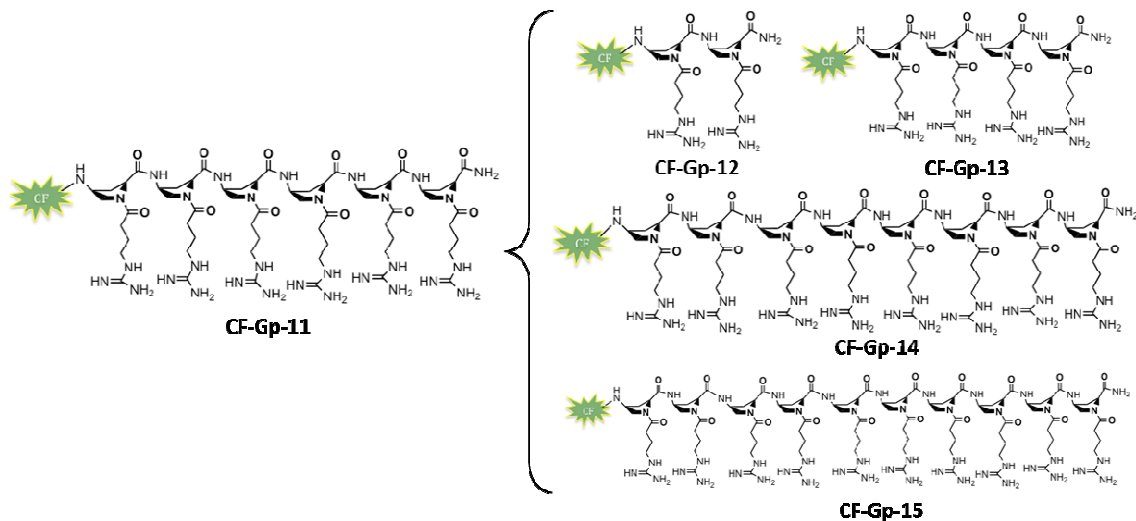


Figura 59. Estructura química de **CF-Gp-11** y la familia sintetizada.

Los estudios de citometría de flujo y microscopía confocal de los cinco γ -péptidos en promastigotes de este parásito, demostraron que la presencia de los grupos guanidinos influye directamente en la capacidad de internalización celular, así como en la toxicidad de estos compuestos en los parásitos. Los γ -péptidos que contienen dos o cuatro residuos guanidinos no atravesaron la membrana citoplasmática de estos parásitos y tampoco resultaron tóxicos. Sin embargo, los compuestos con 6, 8 y 10 grupos guanidinos fueron capaces de internalizar dichos parásitos. La capacidad de atravesar la membrana plasmática aumentó en forma proporcional con el número de residuos guanidinos ($10 > 8 > 6$), pero también se incrementó la toxicidad de estos compuestos en el mismo orden. Estos resultados evidencian la influencia marcada de los grupos guanidinos en la eficiencia de entrada celular, pero también en el incremento de la toxicidad, lo cual es una limitación para el uso de γ -péptidos poliguanidilados con más de seis residuos en su secuencia.

Los resultados de toxicidad de los péptidos **CF-Gp-14** y **CF-Gp-15** (con 8 y 10 grupos guanidinos en su secuencia) se relacionan con la influencia de estos compuestos en la integridad de la membrana celular que es más evidente al incrementar el tiempo de exposición. Estos péptidos al ser de mayor tamaño y tener un carácter catiónico más elevado, tienen la posibilidad de aumentar la superficie de interacción con la membrana celular, favoreciendo así la entrada de estos compuestos a la célula, pero provocando alteraciones irreparables en la misma lo que explicaría el incremento de la toxicidad.^{272,273}

El péptido **CF-Gp-11**, que presenta seis prolinas modificadas con grupos guanidinos, mostró una internalización en promastigotes tres veces superior a la del control positivo **CF-Tat**, además de tener una baja toxicidad. Por todo ello, este péptido fue seleccionado para ser empleado como vehículo transportador de fármacos. Como compuestos que presentan propiedades leishmanicidas se decidió utilizar la doxorubicina y miltefosina (Figura 60). La conjugación de ambas drogas al péptido **Gp-11** se llevó a cabo utilizando la secuencia peptídica, previamente modificada mediante la adición de una cisteína en el extremo N-terminal. El conjugado **Doxo-Gp-11** se obtuvo mediante el uso de un espaciador biduncional (**SMCC**) y el **MT-BODIPY-Gp-11** mediante la formación de un

puente disulfuro. Los análisis de viabilidad celular, citometría de flujo y microscopía confocal, permitieron establecer que **Doxo-Gp-11** podría considerarse de modo preliminar como una estrategia quimioterapéutica alternativa para el tratamiento de la leishmaniasis, mientras que **MT-BODIPY-Gp-11** se utilizaría como estrategia quimioterapéutica frente a la resistencia farmacológica generada por el parásito frente a este fármaco.

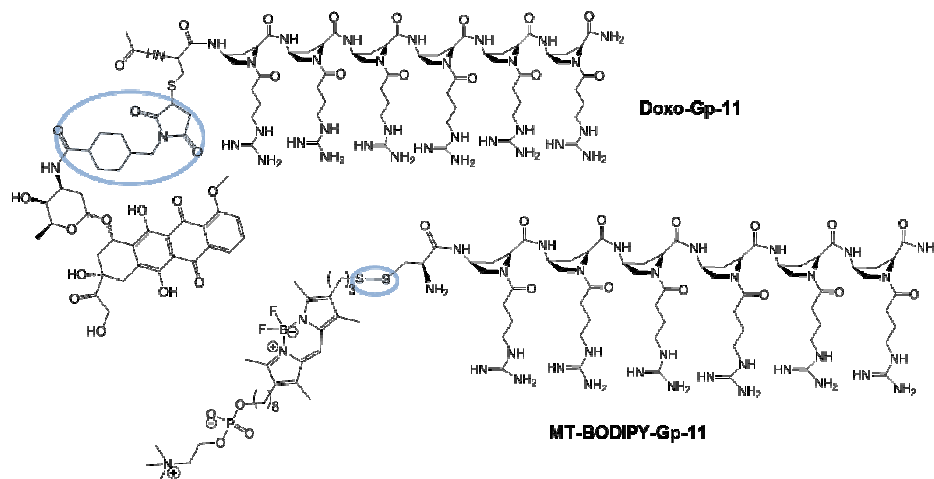


Figura 60. Estructuras químicas de los conjugados sintetizados.

El conjugado **Doxo-Gp-11** resultó más eficiente en la internalización en promastigotes de *Leishmania donovani* que el fármaco libre. Además, los estudios realizados a diferentes temperaturas evidencian que el mecanismo de entrada de este compuesto es dependiente de energía. El conjugado mostró una marcada actividad leishmanicida a las 4 h de incubación a concentraciones inferiores a 10 μM ($\text{IC}_{50} = 6 \mu\text{M}$), a diferencia del fármaco libre, el péptido libre y de la mezcla de ambos (**Gp-11+Doxo**) lo que demostró que esta actividad está directamente relacionada con el conjugado y no a la presencia del resto de los componentes analizados. A tiempos de incubación más largos (72 h), la doxorubicina mostró igual actividad que el conjugado ($\text{IC}_{50} = 6\mu\text{M}$), a diferencia del péptido libre. El estudio cinético de internalización del conjugado mostró que éste se detectó en el interior de la célula desde los primeros 5 min, a diferencia de la doxorubicina, que se detectó por primera vez en el interior del parásito a las 2 h. Todo esto indicó que la presencia del péptido en el conjugado favorece la acción de doxorubicina a tiempos cortos. La determinación de la disminución de los niveles de ATP citoplasmático del parásito, provocado por el conjugado a diferentes concentraciones durante 30 min de incubación, confirmaron la eficacia del empleo de este híbrido molecular para transportar la doxorubicina al interior del parásito.

El conjugado **MT-BODIPY-Gp-11** se ensayó en cepas sensibles y en cepas resistentes a miltefosina. En cepas sensibles, no se observaron diferencias significativas de actividad leishmanicida entre la miltefosina libre y el conjugado. Sin embargo, al utilizar cepas resistentes a la miltefosina, a concentraciones $\leq 5\mu\text{M}$, el conjugado disminuyó la viabilidad celular del parásito, mientras que con el tratamiento con miltefosina, los parásitos mostraron la resistencia esperada. A concentraciones superiores a 5 μM , tanto el conjugado como el fármaco libre presentaron actividad leishmanicida. Estudios de

inhibición realizados en presencia de heparina, demostraron que su presencia inhibe la entrada de nuestro conjugado.

Todos estos resultados muestran que conjugar un γ -péptido a moléculas con propiedades terapéuticas como la doxorubicina y la miltefosina, así como demostrar su capacidad de acción en promastigotes de *Leishmania donovani*, incluso en cepas resistentes a uno de los fármacos, es la prueba fehaciente que demuestra del potencial de este péptido como sistema de transporte de moléculas de valor terapéutico, por lo que podría ser considerado como un posible elemento constitutivo de nanocompuestos.

γ péptidos en *Drosophila melanogaster*.

Con el objetivo de validar el uso de nuestros γ -péptidos en barreras biológicas más selectivas y especializadas como la barrera hematoencefálica, se decidió utilizar un método de cribado *in vivo* que permitiera la evaluación de una familia de compuestos de manera viable. Para ello se decidió validar a *Drosophila melanogaster* como modelo *in vivo* para estudiar la capacidad de los péptidos para atravesar la BHE mediante estudios de microscopía de fluorescencia (epifluorescencia y microscopía confocal de barrido de láser).

Para validar este modelo, se utilizaron diferentes mutantes de *Drosophila melanogaster* (w^{1118} , *w-iso*, *moody Null* y *moody-Gal4*) dependiendo del factor a analizar. Además, resultó necesario la preparación de una serie de péptidos modelos, cuya capacidad de atravesar la BHE había sido reportada con anterioridad en otros tipos de modelos *in vitro* e *in vivo*. Además, seis de nuestros γ -péptidos con distinta capacidad de atravesar la membrana celular fueron seleccionados para realizar este estudio. Todos los compuestos seleccionados, se inocularon en el abdomen de *Drosophila melanogaster* y posteriormente se analizaron las retinas de las moscas mediante técnicas de microscopía de fluorescencia.

Los estudios de epifluorescencia resultaron útiles como primera aproximación pero no mostraron resultados concluyentes, debido a que su interpretación depende en gran medida de la educación del ojo del experimentador al captar la fluorescencia. Este hecho podría inducir a la detección de “falsos positivos” causados por una interpretación errónea, al visualizar la retina en el microscopio. A pesar de ello esta técnica puede servir como herramienta adicional a los estudios de microscopía confocal, debido a que nos permite detectar errores asociados con el proceso de inyección, así como contribuir en la selección de individuos a analizar mediante microscopía confocal.

Los estudios de microscopía confocal de barrido de láser, nos permitieron validar *Drosophila melanogaster* como modelo *in vivo* para estudiar la capacidad de atravesar la BHE de los péptidos y profundizar en el comportamiento de todos ellos en este modelo.

Los resultados de las moscas *moody* avalaron su utilidad como controles positivos de entrada masiva para todos los compuestos analizados, mientras los estudios realizados con moscas *w-iso* presentaron variabilidad en los datos obtenidos, tanto de carácter cualitativo como cuantitativo y permitieron discriminar entre los compuestos que presentan entrada en retina de los que no. Además, como novedad de la metodología

evaluación de la entrada a través de la BHE, de bibliotecas peptídicas o biosimilares y de esta manera, acceder a estructuras novedosas como transportadores o fármacos, frente a enfermedades relacionadas con el SNC.

CONCLUSIONES GENERALES

En la presente tesis doctoral se ha estudiado el potencial de los γ -péptidos basados en *cis*- γ -amino prolina, como moléculas con capacidad de atravesar distintos tipos de barreras biológicas y consecuentemente, ser considerados transportadores. Para ello se ha estudiado su capacidad de entrada en células mamíferas (HeLa y MAEC) y en el parásito *Leishmania donovani* como modelos *in vitro*. También se ha determinado su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica mediante un sistema de cribado utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo. Esto último ha implicado la necesidad de poner a punto y validar *Drosophila melanogaster* como modelo *in vivo* para estudiar la capacidad de los péptidos para atravesar barreras biológicas. Los resultados de esta investigación nos permiten concluir que:

- Del conjunto de γ -péptidos estudiados, sólo tres de ellos (**CF-Gp-7**, **CF-Gp-10**, **CF-Gp-11**) mostraron a las dos horas de incubación un porcentaje de entrada celular superior al 50% con respecto a **CF-Tat**, siendo el **CF-Gp-7** el que presentó un comportamiento más similar al control positivo utilizado **CF-Tat**. Al aumentar el tiempo de incubación a 24 h se favoreció la entrada de cinco γ -péptidos en comparación al control **CF-Tat**. Estos resultados evidencian que tanto el carácter catiónico, como la hidrofobicidad de los γ -péptidos probados, juegan un rol importante en la capacidad de atravesar la membrana celular y que su resistencia a proteasas favorece su presencia intracelular a tiempos de incubación largos.
- Tres γ -péptidos representativos (**CF-Gp-4**, **CF-Gp-7** y **CF-Gp-10**) que previamente habían mostrado mayor capacidad de entrada, se localizaron en el citoplasma de la célula en forma de vesículas, lo cual constituye un primer indicio de un mecanismo de internalización vía endocítica para estos compuestos. Esto se corroboró con la observación de que una parte de estos péptidos se localizaron en los lisosomas y endosomas tardíos.
- El estudio del mecanismo de entrada en células HeLa de estos péptidos (**CF-Gp-4**, **CF-Gp-7** y **CF-Gp-10**) mediante el uso de inhibidores específicos de distintos mecanismos, demostró que la internalización de estos compuestos no ocurre por una sola vía endocítica, dependiendo de dos o más mecanismos de entrada que incluyen la vía caveola, clatrina y macropinocitosis, siendo esta última la más destacada en la entrada de **CF-Gp-7** y **CF-Gp-10**.
- El estudio de la capacidad de entrada de los péptidos, **CF-Gp-4**, **CF-Gp-7** y **CF-Gp-10** en células MAEC mostró que la presencia de grupos guanidínicos en las secuencias peptídicas (**CF-Gp-4** y **CF-Gp-10**) es crucial para favorecer la entrada en este tipo de células.
- El estudio de la internalización de los γ -péptidos (**CF-Gp-11**-**CF-Gp-15**) en promastigotes de *Leishmania donovani* mostró que la capacidad de entrada celular de estos es proporcional al número de residuos guanidilados presentes en la secuencia (**CF-Gp-11**<<**CF-Gp-14**<<**CF-Gp-15**). Paralelamente, la citotoxicidad que provocan estos péptidos en el parásito se incrementa proporcionalmente con el número de grupos guanidínicos presentes. El péptido **CF-Gp-11** que contiene seis residuos guanidínicos en su estructura, ha resultado ser el mejor candidato para su evaluación como transportador de fármacos debido a su baja toxicidad y a su buena

capacidad de entrada, empleándose para sintetizar conjugados con doxorubicina y miltefosina.

- El conjugado γ -péptido-doxorubicina (**Doxo-Gp-11**) internalizó en promastigotes de *Leishmania donovani* a las 4 h de incubación mediante un mecanismo de entrada dependiente de energía, a diferencia de la doxorubicina, que no fue capaz de atravesar la membrana celular. El tratamiento de promastigotes con el conjugado **Doxo-Gp-11** provocó una bajada de ATP citoplasmático que fue dependiente de la concentración del conjugado. Este efecto no fue observado con la doxorubicina en las mismas condiciones. Todo esto es indicativo del efecto de la doxorubicina en el parásito cuando esta ha podido entrar en el mismo mediante el transporte del péptido **Gp-11**.
- El conjugado del γ -péptido **Gp-11** con miltefosina marcada con BODIPY (**MT-BODIPY-Gp-11**) frente a cepas de *Leishmania donovani* resistentes a miltefosina (**MT**) presentó actividad leishmanicida a concentraciones $\leq 5 \mu\text{M}$, mientras que frente a **MT** libre se observó la resistencia esperada en el mismo rango de concentración. Este hecho demostró las aptitudes del péptido **Gp-11** como transportador de fármacos frente a la resistencia farmacológica desarrollada por el parásito.
- Los estudios de entrada celular del **MT-BODIPY-Gp-11** preincubado con heparina (un glicosaminoglicano), mostraron que en estas condiciones el conjugado no era capaz de atravesar la membrana celular de promastigotes de *Leishmania donovani*, esto sugiere que la unión del péptido **Gp-11** catiónico a los componentes altamente aniónicos de la membrana del parásito es un paso importante en la entrada celular.
- Se ha establecido una metodología basado en técnicas de microscopía de fluorescencia (epifluorescencia y microscopía confocal) que permite estimar la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), utilizando a *Drosophila melanogaster* como modelo *in vivo*.
- La epifluorescencia no resultó una metodología concluyente al estudiar la permeabilidad de la BHE. Mediante las observaciones de la presencia o no de fluorescencia en la retina, la mayoría de los compuestos fluorescentes estudiados mostraron resultados no concluyentes debido a la baja resolución espacial de esta técnica demostrando la debilidad de este método. Sin embargo, la epifluorescencia podría resultar de utilidad como herramienta adicional a estudios de microscopía confocal, debido a que permite detectar errores asociados con el proceso de inyección, así como en la selección de individuos a analizar en microscopía confocal.
- La microscopía confocal de barrido de láser, debido a su alta resolución y al desarrollo de métodos de análisis que permiten separar la autofluorescencia de la mosca de la señal fluorescente del péptido, resultó ser el método adecuado para el ensayo de la entrada en retina. Además, esta técnica permitió validar a *Drosophila melanogaster* como modelo *in vivo* apropiado para estudiar la permeabilidad de la BHE frente a diferentes compuestos mediante estudios tanto cualitativos como cuantitativos.

- De los péptidos modelo con capacidad de atravesar la BHE seleccionados, aquellos reconocidos por receptores transferina **CF-pTf-1** y **CF-pTf-2** atravesaron la barrera y se localizaron en las células pigmentarias y rabdómeros, mientras que los péptidos **CF-RGV**, **CF-angiopeps**, **CF-pAntp** y **CF-Tat** no fueron detectados.
- De la familia de γ -péptidos estudiados, los péptidos **CF-Gp-10** y **CF-Gp-11** mostraron capacidad de atravesar la barrera y se localizaron mayoritariamente en rabdómeros y en menor proporción en córnea y células pigmentarias. Estos compuestos han resultado ser candidatos prometedores en la búsqueda de compuestos que atraviesan la BHE.
- El análisis de microscopía confocal del cerebro disectado de moscas *moody-Gal4* inyectadas con el péptido fluorescente **Atto 565-Gp-11**, mostró la presencia del mismo en las proyecciones axonales del lóbulo óptico, las cuales se conectan directamente a la retina, confirmando inequívocamente que el péptido **Gp-11** atraviesa la barrera.
- El método desarrollado para la estimación de la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica de compuestos de carácter peptídico, ha mostrado ser adecuado para péptidos que atraviesan la BHE mediante transcitosis inespecífica, mientras que para compuestos que cursan mediante mecanismos mas específicos no es tan generalizable debido a que en *Drosophila melanogaster* no hay disponibilidad total en de receptores homólogos.
- Los γ -péptidos seleccionados han mostrado de manera fehaciente aptitudes como transportadores para atravesar la BHE.

Bibliografía

1. Schneider, M. *et al.* Crossing biological barriers for advanced drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **84**, 239–41 (2013).
2. Wang, F. *et al.* Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery. *J. Control. Release* **174**, 126–36 (2014).
3. Löscher, W. & Potschka, H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog. Neurobiol.* **76**, 22–76 (2005).
4. Horne, W. S. Peptide and peptoid foldamers in medicinal chemistry. *Expert Opin. Drug Discov.* **6**, 1247–62 (2011).
5. Witt, K. A., Gillespie, T. J., Huber, J. D., Egleton, R. D. & Davis, T. P. Peptide drug modifications to enhance bioavailability and blood-brain barrier permeability. *Peptides* **22**, 2329–43 (2001).
6. Trabulo, S. *et al.* Cell-penetrating peptide-based systems for nucleic acid delivery: a biological and biophysical approach. *Methods Enzymol.* **509**, 277–300 (2012).
7. Jätariu, A. N., Popa, M. & Peptu, C. A. Different particulate systems--bypass the biological barriers? *J. Drug Target.* **18**, 243–53 (2010).
8. Saunders, N. R., Daneman, R., Dziegielewska, K. M. & Liddelow, S. A. Transporters of the blood-brain and blood-CSF interfaces in development and in the adult. *Mol. Aspects Med.* **34**, 742–52 (2013).
9. Regberg, J., Srimanee, A. & Langel, Ü. Applications of Cell-Penetrating Peptides for Tumor Targeting and Future Cancer Therapies. *Pharmaceuticals* **5**, 991–1007 (2012).
10. Ruzza, P., Biondi, B., Marchiani, A., Antolini, N. & Calderan, A. Cell-penetrating peptides: a comparative study on lipid affinity and cargo delivery properties. *Pharmaceuticals* **3**, 1045–1062 (2010).
11. Kaspar, A. & Reichert, J. M. Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discov. Today* **18**, 807–17 (2013).
12. Munyendo, W. L., Huixia Lv, Benza-Ingoula, H., Baraza, L. D. & Zhou, J. Cell penetrating peptides in the delivery of biopharmaceuticals. *Biomolecules* **2**, 187–202 (2012).
13. Lindgren, M. *et al.* Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumour cells by the use of a new cell-penetrating peptide. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 416–25 (2006).
14. Lee, J. Y., Bae, K. H., Kim, J. S., Nam, Y. S. & Park, T. G. Intracellular delivery of paclitaxel using oil-free, shell cross-linked HSA--multi-armed PEG nanocapsules. *Biomaterials* **32**, 8635–44 (2011).
15. Nakase, I., Tanaka, G. & Futaki, S. Cell-penetrating peptides (CPPs) as a vector for the delivery of siRNAs into cells. *Mol. Biosyst.* **9**, 855–61 (2013).

16. Bai, H. *et al.* Antisense inhibition of gene expression and growth in gram-negative bacteria by cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids targeted to rpoD gene. *Biomaterials* **33**, 659–67 (2012).
17. Liu, B. R., Liou, J-S., Chen, Y-J., Huang, Y-W. & Lee, H-J. Delivery of nucleic acids, proteins, and nanoparticles by arginine-rich cell-penetrating peptides in rotifers. *Mar. Biotechnol. (NY)*. **15**, 584–95 (2013).
18. Galdiero, S. *et al.* Intracellular delivery: exploiting viral membranotropic peptides. *Curr. Drug Metab.* **13**, 93–104 (2012).
19. Santra, S. *et al.* Rapid and effective labeling of brain tissue using TAT-conjugated CdS:Mn/ZnS quantum dots. *Chem. Commun. (Camb)*. 3144–6 (2005).
20. Marín, S., Pujals, S., Giralt, E. & Merkoçi, A. Electrochemical investigation of cellular uptake of quantum dots decorated with a proline-rich cell penetrating peptide. *Bioconjug. Chem.* **22**, 180–5 (2011).
21. Juliano, R. L., Alam, R., Dixit, V. & Kang, M. Cell-targeting and cell-penetrating peptides for delivery of therapeutic and imaging agents. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **1**, 324–35 (2009).
22. Jiao, C-Y. *et al.* Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *J. Biol. Chem.* **284**, 33957–65 (2009).
23. Frankel, A. D. & Pabo, C. O. Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55**, 1189–1193 (1988).
24. Vives, E. A., Brondi P. & Lebleu B. Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *J. Biol. Chem.* **272**, 16010–16017 (1997).
25. Koren, E. & Torchilin, V. P. Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends Mol. Med.* **18**, 385–93 (2012).
26. Green, M., Ishino, M. & Loewenstein, P. M. Mutational analysis of HIV-1 Tat minimal domain peptides: identification of trans-dominant mutants that suppress HIV-LTR-driven gene expression. *Cell* **58**, 215–23 (1989).
27. Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G. & Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 10444–50 (1994).
28. Vives, E. Present and future of cell-penetrating peptide mediated delivery systems: “is the Trojan horse too wild to go only to Troy?”. *J. Control. Release* **109**, 77–85 (2005).
29. Wender, P. A. *et al.* The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13003–8 (2000).
30. Suzuki, T. *et al.* Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J. Biol. Chem.* **277**, 2437–43 (2002).

31. Futaki, S. *et al.* Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* **276**, 5836–40 (2001).
32. Wender, P. A., Cooley, C. B. & Geihe, E. I. Beyond cell penetrating peptides: designed molecular transporters. *Drug Discov. Today. Technol.* **9**, e49–e55 (2012).
33. Wadia, J. S. & Dowdy, S. F. Protein transduction technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 52–6 (2002).
34. Morris, M. C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F. & Divita, G. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2730–6 (1997).
35. Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. & Divita, G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **19**, 1173–6 (2001).
36. Gros, E. *et al.* A non-covalent peptide-based strategy for protein and peptide nucleic acid transduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 384–93 (2006).
37. Elmquist, A., Lindgren, M., Bartfai, T. & Langel U. VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp. Cell Res.* **269**, 237–44 (2001).
38. Schmidt, M. C. *et al.* Translocation of human calcitonin in respiratory nasal epithelium is associated with self-assembly in lipid membrane. *Biochemistry* **37**, 16582–90 (1998).
39. Krauss, U., Müller, M., Stahl, M. & Beck-Sickinger, A. G. *In vitro* gene delivery by a novel human calcitonin (hCT)-derived carrier peptide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 51–54 (2004).
40. Trabulo, S., Cardoso, A. L., Mano, M. & Pedroso de Lima, M. C. Cell-penetrating peptides—mechanisms of cellular uptake and generation of delivery systems. *Pharmaceuticals* **3**, 961–993 (2010).
41. Vivès, E., Schmidt, J. & Pèlegri, A. Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. *Biochim. Biophys. Acta* **1786**, 126–138 (2008).
42. Bechara, C. & Sagan, S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* **587**, 1693–702 (2013).
43. Erazo-Oliveras, A., Muthukrishnan, N., Baker, R., Wang, T.-Y. & Pellois, J.-P. Improving the endosomal escape of cell-penetrating peptides and their cargos: strategies and challenges. *Pharmaceuticals* **5**, 1177–1209 (2012).
44. Vlieghe, P. & Khrestchatsky, M. Peptide-based vectors for blood-brain barrier targeting and delivery of drugs to the central nervous system. *Ther. Deliv.* **1**, 489–94 (2010).
45. Milletti, F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* **17**, 850–60 (2012).
46. Gellman, S. H. Foldamers: A Manifesto. *Acc. Chem. Res.* **31**, 173–180 (1998).
47. Smith, B. J. *et al.* Structure-guided rational design of α/β -peptide foldamers with high affinity for BCL-2 family prosurvival proteins. *Chembiochem* **14**, 1564–72 (2013).

48. Farrera-Sinfreu, J. *et al.* A new class of foldamers based on cis-gamma-amino-L-proline. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 6048–57 (2004).
49. Farrera-Sinfreu, J., Giralt, E., Castel, S., Albericio, F. & Royo, M. Cell-penetrating cis γ -amino-L-proline-derived peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 9459–68 (2005).
50. Carbajo, D. γ -Peptides based on proline derivatives: novel applications and secondary structure. 1–223 (2012).
51. Cavalli, S. *et al.* Efficient γ -amino-proline-derived cell penetrating peptide-superparamagnetic iron oxide nanoparticle conjugates via aniline-catalyzed oxime chemistry as bimodal imaging nanoagents. *Chem. Commun. (Camb)*. **48**, 5322–4 (2012).
52. Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M. & Langel, U. Cell penetration by transportan. *FASEB J.* **12**, 67–77 (1998).
53. El-Sayed, A., Futaki, S. & Harashima, H. Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment. *AAPS J.* **11**, 13–22 (2009).
54. Verdurmen, W. P. R., Thanos, M., Ruttekkolk, I. R., Gulbins, E. & Brock, R. Cationic cell-penetrating peptides induce ceramide formation via acid sphingomyelinase: implications for uptake. *J. Control. Release* **147**, 171–9 (2010).
55. Vivès, E., Brodin, P. & Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* **272**, 16010–7 (1997).
56. Sugita, T. *et al.* Improved cytosolic translocation and tumor-killing activity of Tat-shepherdin conjugates mediated by co-treatment with Tat-fused endosome-disruptive HA2 peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **363**, 1027–32 (2007).
57. Kale, A. A. & T., V. P. Smart drug carriers: PEGylated TATp-modified pH-sensitive liposomes. *J. Liposomes Res* **17**, 197–203 (2007).
58. Liu, B. R. *et al.* Endocytic trafficking of nanoparticles delivered by cell-penetrating peptides comprised of nona-arginine and a penetration accelerating sequence. *PLoS One* **8**, 67–100 (2013).
59. Duchardt, F. *et al.* A cell-penetrating peptide derived from human lactoferrin with conformation-dependent uptake efficiency. *J. Biol. Chem.* **284**, 36099–108 (2009).
60. Abes, R. *et al.* Delivery of steric block morpholino oligomers by (R-X-R)₄ peptides: structure-activity studies. *Nucleic Acids Res.* **36**, 6343–54 (2008).
61. Rydström, A. *et al.* Direct translocation as major cellular uptake for CADY self-assembling peptide-based nanoparticles. *PLoS One* **6**, e25924 (2011).
62. Crombez, L. *et al.* A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells. *Mol. Ther.* **17**, 95–103 (2009).
63. Deshayes, S. *et al.* Primary amphipathic cell-penetrating peptides: structural requirements and interactions with model membranes. *Biochemistry* **43**, 7698–706 (2004).

64. Nan, Y. H., Park, I.-S., Hahm, K.-S. & Shin, S. Y. Antimicrobial activity, bactericidal mechanism and LPS-neutralizing activity of the cell-penetrating peptide pVEC and its analogs. *J. Pept. Sci.* **17**, 812–7 (2011).
65. Johansson, H. J. *et al.* Characterization of a novel cytotoxic cell-penetrating peptide derived from p14ARF protein. *Mol. Ther.* **16**, 115–23 (2008).
66. Magzoub, M. *et al.* N-terminal peptides from unprocessed prion proteins enter cells by macropinocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**, 379–85 (2006).
67. Zorko, M. & Langel, U. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 529–45 (2005).
68. Eguchi, A. & Dowdy, S. F. siRNA delivery using peptide transduction domains. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 341–5 (2009).
69. Pujals, S. & Giralt, E. Proline-rich, amphipathic cell-penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 473–84 (2008).
70. Fernández-Carneado, J., Kogan, M. J., Pujals, S. & Giralt, E. Amphipathic peptides and drug delivery. *Biopolymers* **76**, 196–203 (2004).
71. Mitchell, D. J., Kim, D. T., Steinman, L., Fathman, C. G. & Rothbard, J. B. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J. Pept. Res.* **56**, 318–25 (2000).
72. Delaroche, D. *et al.* Tracking a new cell-penetrating (W/R) nonapeptide, through an enzyme-stable mass spectrometry reporter tag. *Anal. Chem.* **79**, 1932–8 (2007).
73. Crombez, L., Morris, M. C., Heitz, F. & Divita, G. Therapeutic Oligonucleotides. **764**, 59–73 (2011).
74. Oehlke, J. *et al.* Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim. Biophys. Acta* **1414**, 127–39 (1998).
75. Scocchi, M., Romeo, D. & Zanetti, M. Molecular cloning of Bac7, a proline- and arginine-rich antimicrobial peptide from bovine neutrophils. *FEBS Lett.* **352**, 197–200 (1994).
76. Benincasa, M. *et al.* The proline-rich peptide Bac7(1-35) reduces mortality from *Salmonella typhimurium* in a mouse model of infection. *BMC Microbiol.* **10**, 178 (2010).
77. Daniels, D. S. & Schepartz, A. Intrinsically cell-permeable miniature proteins based on a minimal cationic PPII motif. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 14578–9 (2007).
78. Smith, B. a *et al.* Minimally cationic cell-permeable miniature proteins via alpha-helical arginine display. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 2948–9 (2008).
79. Fillon, Y. A., Anderson, J. P. & Chmielewski, J. Cell penetrating agents based on a polyproline helix scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 11798–803 (2005).
80. Martín, I., Teixidó, M. & Giralt, E. Design, synthesis and characterization of a new anionic cell-penetrating peptide: SAP(E). *Chembiochem* **12**, 896–903 (2011).

81. Watkins, C. L. *et al.* Cellular uptake, distribution and cytotoxicity of the hydrophobic cell penetrating peptide sequence PFVYLI linked to the proapoptotic domain peptide PAD. *J. Control. Release* **140**, 237–44 (2009).
82. Gao, H. *et al.* Ligand modified nanoparticles increases cell uptake, alters endocytosis and elevates glioma distribution and internalization. *Sci. Rep.* **3**, 2534 (2013).
83. Gao, C. *et al.* A cell-penetrating peptide from a novel pVII-pIX phage-displayed random peptide library. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 4057–65 (2002).
84. Lin, X. *et al.* Synthetic peptide F2A4-K-NS mimics fibroblast growth factor-2 in vitro and is angiogenic in vivo. *Int. J. Mol. Med.* **17**, 833–9 (2006).
85. Zhang, K. *et al.* FGF-P improves barrier function and proliferation in human keratinocytes after radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **81**, 248–254 (2011).
86. Li, L., Geisler, I., Chmielewski, J. & Cheng, J-X. Cationic amphiphilic polyproline helix P11LRR targets intracellular mitochondria. *J. Control. Release* **142**, 259–66 (2010).
87. Sadler, K., Eom, K. D., Yang, J-L., Dimitrova, Y. & Tam, J. P. Translocating proline-rich peptides from the antimicrobial peptide bactenecin 7. *Biochemistry* **41**, 14150–14157 (2002).
88. Ludevid, M. D., Torrent, M., Martinez-Izquierdo, J. A., Puigdomenech, P. & Palau, J. Subcellular localization of glutelin-2 in maize (*Zea mays* L.) endosperm. *Plant Mol. Biol.* **3**, 227–234 (1984).
89. Fernández-Carneado, J., Kogan, M. J., Castel, S. & Giralt, E. Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of gamma-zein. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**, 1811–4 (2004).
90. Schafmeister, C. E., Po, J. & Verdine, G. L. An all-hydrocarbon cross-linking system for enhancing the helicity and metabolic stability of peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 5891–5892 (2000).
91. Ochocki, J. D., Mullen, D. G., Wattenberg, E. V & Distefano, M. D. Evaluation of a cell penetrating prenylated peptide lacking an intrinsic fluorophore via in situ click reaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 4998–5001 (2011).
92. Covic, L., Gresser, A. L., Talavera, J., Swift, S. & Kuliopulos, A. Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 643–8 (2002).
93. Deshayes, S., Decaffmeyer, M., Bresseur, R. & Thomas, A. Structural polymorphism of two CPP: an important parameter of activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 1197–205 (2008).
94. Eriste, E. *et al.* Peptide-based glioma-targeted drug delivery vector gHoPe2. *Bioconjug. Chem.* **24**, 305–13 (2013).
95. De la Torre, B. G. *et al.* A BODIPY-embedding miltefosine analog linked to cell-penetrating Tat(48-60) peptide favors intracellular delivery and visualization of the antiparasitic drug. *Amino Acids* **46**, 1047–58 (2014).

96. Ohshima, T. *et al.* alpha-Galactosidase A deficient mice: a model of Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 2540–4 (1997).
97. Shu, L., Murphy, H. S., Cooling, L. & Shayman, J. a. An *in vitro* model of Fabry disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 2636–45 (2005).
98. Bainton, R. J. *et al.* moody encodes two GPCRs that regulate cocaine behaviors and blood-brain barrier permeability in *Drosophila*. *Cell* **123**, 145–56 (2005).
99. Madani, F., Lindberg, S., Langel, U., Futaki, S. & Gräslund, A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys.* **2011**, 414729 (2011).
100. Nakase, I., Takeuchi, T., Tanaka, G. & Futaki, S. Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 598–607 (2008).
101. Nakase, I. *et al.* Efficient intracellular delivery of nucleic acid pharmaceuticals using cell-penetrating peptides. *Acc. Chem. Res.* **45**, 1132–1139 (2012).
102. Mäger, I., Eiríksdóttir, E., Langel, K., EL Andaloussi, S. & Langel, U. Assessing the uptake kinetics and internalization mechanisms of cell-penetrating peptides using a quenched fluorescence assay. *Biochim. Biophys. Acta* **1798**, 338–43 (2010).
103. Persson, D., Thorén, P. E. & Nordén, B. Penetratin-induced aggregation and subsequent dissociation of negatively charged phospholipid vesicles. *FEBS Lett.* **505**, 307–12 (2001).
104. Lundin, P. *et al.* Distinct uptake routes of cell-penetrating peptide conjugates. *Bioconjug. Chem.* **19**, 2535–42 (2008).
105. Tiriveedhi, V. & Butko, P. A fluorescence spectroscopy study on the interactions of the TAT-PTD peptide with model lipid membranes. *Biochemistry* **46**, 3888–95 (2007).
106. Yang, H. *et al.* Chondroitin sulfate as a molecular portal that preferentially mediates the apoptotic killing of tumor cells by penetratin-directed mitochondria-disrupting peptides. *J. Biol. Chem.* **285**, 25666–76 (2010).
107. Letoha, T. *et al.* Cell-penetrating peptide exploited syndecans. *Biochim. Biophys. Acta* **1798**, 2258–65 (2010).
108. Morris, M. C., Deshayes, S., Heitz, F. & Divita, G. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol. cell* **100**, 201–17 (2008).
109. Deshayes, S., Morris, M., Heitz, F. & Divita, G. Delivery of proteins and nucleic acids using a non-covalent peptide-based strategy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 537–47 (2008).
110. Wender, P. A., Galliher, W. C., Goun, E. A., Jones, L. R. & Pillow, T. H. The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 452–72 (2008).
111. Tünnemann, G. *et al.* Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *J. Pept. Sci.* **14**, 469–476 (2008).

112. Rothbard, J. B., Jessop, T. C., Lewis, R. S., Murray, B. A & Wender, P. A. Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9506–7 (2004).
113. Richard, J. P. *et al.* Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* **278**, 585–90 (2003).
114. Derossi, D. *et al.* Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* **271**, 18188–18193 (1996).
115. Herce, H. D. & Garcia, A. E. Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 20805–10 (2007).
116. Bárány-Wallje, E., Gaur, J., Lundberg, P., Langel, U. & Gräslund, A. Differential membrane perturbation caused by the cell penetrating peptide Tp10 depending on attached cargo. *FEBS Lett.* **581**, 2389–93 (2007).
117. Drin, G., Déméné, H., Tamsamani, J. & Bresseur, R. Translocation of the pAntp peptide and its amphipathic analogue AP-2AL. *Biochemistry* **40**, 1824–34 (2001).
118. Potocky, T. B., Menon, A. K. & Gellman, S. H. Cytoplasmic and nuclear delivery of a TAT-derived peptide and a beta-peptide after endocytic uptake into HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 50188–94 (2003).
119. Drin, G., Cottin, S., Blanc, E., Rees, A. R. & Tamsamani, J. Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J. Biol. Chem.* **278**, 31192–201 (2003).
120. Murriel, C. L. & Dowdy, S. F. Influence of protein transduction domains on intracellular delivery of macromolecules. *Expert Opin. Drug Deliv.* **3**, 739–46 (2006).
121. Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R. & Brock, R. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* **8**, 848–66 (2007).
122. Conner, S. D. & Schmid, S. L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**, 37–44 (2003).
123. Wadia, J. S., Stan, R. V & Dowdy, S. F. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.* **10**, 310–5 (2004).
124. Kaplan, I. M., Wadia, J. S. & Dowdy, S. F. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J. Control. Release* **102**, 247–253 (2005).
125. Richard, J. P. *et al.* Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J. Biol. Chem.* **280**, 15300–6 (2005).
126. Fittipaldi, A. *et al.* Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 34141–9 (2003).
127. Jones, S. W. *et al.* Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *Br. J. Pharmacol.* **145**, 1093–102 (2005).

128. Nakase, I. *et al.* Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol. Ther.* **10**, 1011–22 (2004).
129. Futaki, S., Nakase, I., Tadokoro, A., Takeuchi, T. & Jones, A. T. Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 784–7 (2007).
130. Schmidt, N., Mishra, A., Lai, G. H. & Wong, G. C. L. Arginine-rich cell-penetrating peptides. *FEBS Lett.* **584**, 1806–13 (2010).
131. Säälik, P. *et al.* Protein cargo delivery properties of cell-penetrating peptides . A comparative study. *Bioconjug. Chem.* **15**, 1246–1253 (2004).
132. Vandebroucke, R. E., De Smedt, S. C., Demeester, J. & Sanders, N. N. Cellular entry pathway and gene transfer capacity of TAT-modified lipoplexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 571–9 (2007).
133. Maiolo, J. R., Ferrer, M. & Ottinger, E. A. Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1712**, 161–172 (2005).
134. Vercauteren, D. *et al.* The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Mol. Ther.* **18**, 561–9 (2010).
135. Ivanov, A. I. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol. Biol.* **440**, 15–33 (2008).
136. Singan, V. R., Jones, T. R., Curran, K. M. & Simpson, J. C. Dual channel rank-based intensity weighting for quantitative co-localization of microscopy images. *BMC Bioinformatics* **12**, 407 (2011).
137. Adler, J. & Parmryd, I. Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytometry. A* **77**, 733–42 (2010).
138. Manders, E. M. M., Verbeek, F. J. & Aten, J. A. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images.pdf. *J. Microsc.* **169**, 375–382 (1993).
139. Morris, M. C., Deshayes, S., Heitz, F. & Divita, G. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol. Cell* **100**, 201–17 (2008).
140. Gratton, S. E. a *et al.* The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 11613–11618 (2008).
141. Doan, N-D. *et al.* Design and characterization of novel cell-penetrating peptides from pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *J. Control. Release* **163**, 256–65 (2012).
142. Heuser, J. E. & Anderson, R. G. W. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J. Cell Biol.* **108**, 389–400 (1989).
143. Hao, X. *et al.* Caveolae-mediated endocytosis of biocompatible gold nanoparticles in living Hela cells. *J. Phys. Condens. Matter* **24**, 164207 (2012).
144. Pujals, S., Fernández-Carneado, J., López-Iglesias, C., Kogan, M. J. & Giralt, E. Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: relevance of CPP self-assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 264–79 (2006).

145. Singh, R. D. *et al.* Selective caveolin-1- dependent endocytosis of glycosphingolipids. *Mol. Biol. Cell* **14**, 3254–3265 (2003).
146. Anderson, R. G. W. The caveolae membrane. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 199–225 (1998).
147. World Health Organization. *Control of the leishmaniases. WHO technical report series, 949. World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 1–186 (2010).
148. Mishra, J. & Singh, S. Miltefosine resistance in *Leishmania donovani* involves suppression of oxidative stress-induced programmed cell death. *Exp. Parasitol.* **135**, 397–406 (2013).
149. Naderer, T., Vince, J. E. & McConville, M. J. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Curr. Mol. Med.* **4**, 649–65 (2004).
150. Kunjachan, S. *et al.* Physicochemical and biological aspects of macrophage-mediated drug targeting in anti-microbial therapy. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **26**, 63–71 (2012).
151. Díaz-Achirica, P., Ubach, J., Guinea, A., Andreu, D. & Rivas, L. The plasma membrane of *Leishmania donovani* promastigotes is the main target for CA (1 – 8) M (1 – 18), a synthetic cecropin A – melittin hybrid peptide. *Biochem. J.* **330**, 453–460 (1998).
152. Corradin, S. *et al.* Novel Peptide inhibitors of Leishmania gp63 based on the cleavage site of MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate)-related protein. *Biochem. J.* **367**, 761–769 (2002).
153. Landfear, S. M. & Ignatushchenko, M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* **115**, 1–17 (2001).
154. Denny, P. W., Morgan, G. W., Field, M. C. & Smith, D. F. *Leishmania major*: clathrin and adaptin complexes of an intra-cellular parasite. *Exp. Parasitol.* **109**, 33–7 (2005).
155. Marotta, D. E., Gerald, N. & Dwyer, D. M. Rab5b localization to early endosomes in the protozoan human pathogen *Leishmania donovani*. *Mol. Cell. Biochem.* **292**, 107–17 (2006).
156. Mishra, J., Saxena, A. & Singh, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Front. Med. Chem.* **6**, 97–30 (2012).
157. Croft, S. L. & Olliaro, P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 1478–83 (2011).
158. Sundar, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health* **6**, 849–54 (2001).
159. Alvar, J., Croft, S. & Olliaro, P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* **61**, 223–74 (2006).
160. Moore, E. *et al.* Comparison of generic and proprietary sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Bull. World Health Organ.* **79**, 388–93 (2001).
161. Bern, C. *et al.* Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 917–24 (2006).

162. World Health Organization. *Report of a WHO informal consultation on liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis*. 1–16 (2007).
163. Brachwitz, H. & Vollgraf, C. Analogs of alkyllysophospholipids: chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells. *Pharmacol. Ther.* **66**, 39–82 (1995).
164. Sundar, S. *et al.* Oral miltefosine for Indian visceral Leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1739–1746 (2002).
165. Dorlo, T. P. C., Balasegaram, M., Beijnen, J. H. & de Vries, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 2576–97 (2012).
166. Paris, C., Loiseau, P. M., Bories, C. & Bréard, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 852–859 (2004).
167. Shukla, A. K., Patra, S. & Dubey, V. K. Evaluation of selected antitumor agents as subversive substrate and potential inhibitor of trypanothione reductase: an alternative approach for chemotherapy of Leishmaniasis. *Mol. Cell. Biochem.* **352**, 261–70 (2011).
168. Datta, G. & Bera, T. Transplasma membrane electron transport in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **49**, 24–9 (2002).
169. Sett, R., Basu, N., Ghosh, a K. & Das, P. K. Potential of doxorubicin as an antileishmanial agent. *J. Parasitol.* **78**, 350–4 (1992).
170. García-Hernández, R., Manzano, J. I., Castanys, S. & Gamarro, F. *Leishmania donovani* develops resistance to drug combinations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1974 (2012).
171. Pérez-Victoria, F. J., Castanys, S. & Gamarro, F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2397–2403 (2003).
172. Pérez-Victoria, J. M. *et al.* Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2468–2474 (2001).
173. Pérez-Victoria, J. M. *et al.* Combination of suboptimal doses of inhibitors targeting different domains of LtrMDR1 efficiently overcomes resistance of *Leishmania spp.* to Miltefosine by inhibiting drug efflux. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3102–10 (2006).
174. Seifert, K. *et al.* Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists in vivo. *Int. J. Antimicrob. Agents* **30**, 229–35 (2007).
175. Sánchez-Cañete, M. P., Carvalho, L., Pérez-Victoria, F. J., Gamarro, F. & Castanys, S. Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1305–13 (2009).
176. Rakotomanga, M., Saint-Pierre-Chazalet, M. & Loiseau, P. M. Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug-membrane interactions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2677–2686 (2005).

177. Luque-Ortega, J. R. *et al.* Defeating *Leishmania* resistance to miltefosine (hexadecylphosphocholine) by peptide-mediated drug smuggling: a proof of mechanism for trypanosomatid chemotherapy. *J. Control. Release* **161**, 835–42 (2012).
178. Sparr, C. *et al.* Improved efficacy of fosmidomycin against *Plasmodium* and *Mycobacterium* species by combination with the cell-penetrating peptide octaarginine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 4689–98 (2013).
179. Rivas, L., Luque-Ortega, J. R., Fernández-Reyes, M. & Andreu, D. Membrane-active peptides as anti-infectious agents. *J. Appl. Biomed.* **8**, 159–167 (2010).
180. Delgado, M., Anderson, P., Garcia-Salcedo, J. a, Caro, M. & Gonzalez-Rey, E. Neuropeptides kill African trypanosomes by targeting intracellular compartments and inducing autophagic-like cell death. *Cell Death Differ.* **16**, 406–16 (2009).
181. Luque-Ortega, J. R., Rivero-lezcano, O. M., Croft, S. L. & Rivas, L. *In Vivo* monitoring of intracellular ATP levels in *Leishmania donovani* promastigotes as a rapid method to screen drugs targeting bioenergetic metabolism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1121–1125 (2001).
182. Rothbard, J. B. *et al.* Arginine-rich molecular transporters for drug delivery: role of backbone spacing in cellular uptake. *J. Med. Chem.* **45**, 3612–8 (2002).
183. Temsamani, J. & Vidal, P. The use of cell-penetrating peptides for drug delivery. *Res. Focus* **9**, 1012–1019 (2004).
184. Fretz, M. M., Koning, G. A, Mastrobattista, E., Jiskoot, W. & Storm, G. OVCAR-3 cells internalize TAT-peptide modified liposomes by endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1665**, 48–56 (2004).
185. Abbott, N. J. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell. Mol. Neurobiol.* **25**, 5–23 (2005).
186. Abbott, N. J., Rönneback, L. & Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 41–53 (2006).
187. Nielsen, P. A., Andersson, O., Hansen, S. H., Simonsen, K. B. & Andersson, G. Models for predicting blood-brain barrier permeation. *Drug Discov. Today* **16**, 472–5 (2011).
188. Daneman, R. & Barres, B. A. The blood-brain barrier-lessons from moody flies. *Cell* **123**, 9–12 (2005).
189. Neuwelt, E. *et al.* Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet Neurol.* **7**, 84–96 (2008).
190. Zlokovic, B. V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **57**, 178–201 (2008).
191. Schinkel, A. H. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **36**, 179–194 (1999).
192. Löscher, W. & Potschka, H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx* **2**, 86–98 (2005).

193. Pardridge, W. M. Biopharmaceutical drug targeting to the brain. *J. Drug Target.* **18**, 157–67 (2010).
194. Pardridge, W. M. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol. Interv.* **3**, 90–105, 51 (2003).
195. Jones, P. M. & George, a M. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 682–99 (2004).
196. Gaillard, P. J., Visser, C. C., Appeldoorn, C. C. M. & Rip, J. Enhanced brain drug delivery: safely crossing the blood-brain barrier. *Drug Discov. Today. Technol.* **9**, e71–e174 (2012).
197. Pardridge, W. M. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov. Today* **12**, 54–61 (2007).
198. Kumagai, A. K., Eisenberg, J. B. & Pardridges, W. M. Absorptive-mediated endocytosis of cationized albumin and a beta-endorphin-cationized albumin chimeric peptide by isolated brain capillaries. Model system of blood-brain barrier transport. *J. Biol. Chem.* **262**, 15214–15219 (1987).
199. Tamai, I. *et al.* Structure-internalization relationship for adsorptive-mediated endocytosis of basic peptides at the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**, 410–5 (1997).
200. Kang, Y.-S. & Pardridge, W. M. Brain delivery of biotin bound to a conjugated of neutral avidin and cationized human Albumin. *Pharm. Res.* **11**, 1257–64 (1994).
201. Gabathuler, R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiol. Dis.* **37**, 48–57 (2010).
202. Pardridge, W. M. Drug transport across the blood-brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**, 1959–72 (2012).
203. Jones, A. R. & Shusta, E. V. Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharm. Res.* **24**, 1759–1771 (2007).
204. Huber, J. D., Egleton, R. D. & Davis, T. P. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* **24**, 719–25 (2001).
205. Persidsky, Y., Ramirez, S. H., Haorah, J. & Kanmogne, G. D. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **1**, 223–36 (2006).
206. Banerjee, S. & Bhat, M. A. Neuron-glia interactions in blood-brain barrier formation. *Annu. Rev. Neurosci.* **30**, 235–58 (2007).
207. Ballabh, P., Braun, A. & Nedergaard, M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* **16**, 1–13 (2004).
208. Hansen, D. K., Scott, D. O., Otis, K. W. & Lunte, S. M. Comparison of in vitro BBMEC permeability and in vivo CNS uptake by microdialysis sampling. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **27**, 945–58 (2002).
209. Hitchcock, S. A. Blood-brain barrier permeability considerations for CNS-targeted compound library design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 318–23 (2008).

210. Garberg, P. *et al.* *In vitro* models for the blood-brain barrier. *Toxicol. Vitro.* **19**, 299–334 (2005).
211. Naik, P. & Cuculllo, L. *In vitro* blood–brain barrier models: current and perspective technologies. *Journa Pharm. Sci.* **101**, 1337–1354 (2012).
212. Nitta, T. *et al.* Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* **161**, 653–60 (2003).
213. DeSalvo, M. K., Mayer, N., Mayer, F. & Bainton, R. J. Physiological and anatomic characterization of the brain surface glia barrier of *Drosophila*. *Glia* **59**, 1322–1340 (2011).
214. Sarantseva, S. V. *et al.* Protein transduction domain peptide mediates delivery to the brain via the blood-brain barrier in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* **3**, 149–155 (2009).
215. Sarantseva, S. V, Bolshakova, O. I., Timoshenko, S. I., Kolobov, a a & Schwarzman, a L. Dendrimer D5 is a vector for peptide transport to brain cells. *Bull. Exp. Biol. Med.* **150**, 429–31 (2011).
216. Geldenhuys, W. J., Allen, D. D. & Bloomquist, J. R. Novel models for assessing blood-brain barrier drug permeation. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **8**, 647–53 (2012).
217. Siddique, H. R., Chowdhuri, D. K., Saxena, D. K. & Dhawan, A. Validation of *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay. *Mutagenesis* **20**, 285–90 (2005).
218. Sharma, A., Shukla, A K., Mishra, M. & Chowdhuri, D. K. Validation and application of *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model for the detection of double strand breaks by neutral Comet assay. *Mutat. Res.* **721**, 142–6 (2011).
219. Pandey, U. B. & Nichols, C. D. Human Disease Models in *Drosophila melanogaster* and the Role of the Fly in Therapeutic Drug Discovery. *Pharmacol. Rev.* **63**, 411–436 (2011).
220. Prüßing, K., Voigt, A. & Schulz, J. B. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer’s disease. *Mol. Neurodegener.* **8**, 1–11 (2013).
221. Willoughby, L. F. *et al.* An *in vivo* large-scale chemical screening platform using *Drosophila* for anti-cancer drug discovery. *Dis. Model. Mech.* **6**, 521–9 (2013).
222. Festing, M. F. W. *et al.* Reducing the Use of Laboratory Animals in Biomedical Research: Problems and Possible Solutions. *Altern. Lab. Anim.* **26**, 283–301 (1998).
223. Chien, S., Reiter, L. T., Bier, E. & Gribskov, M. Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* **30**, 149–51 (2002).
224. Stork, T., Bernardos, R. & Freeman, M. R. Analysis of glial cell development and function in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2012**, 1–17 (2012).
225. Farquhar, M. G. & Palade, G. E. Junctional complexes in various epithelia. *J. Cells Biol.* **17**, 375–412 (1963).

226. Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R. & Fehon, R. Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 747–84 (2001).
227. Paul, S. M., Ternet, M., Salvaterra, P. M. & Beitel, G. J. The Na⁺/K⁺ ATPase is required for septate junction function and epithelial tube-size control in the *Drosophila* tracheal system. *Development* **130**, 4963–74 (2003).
228. Genova, J. L. & Fehon, R. G. Neuroglian, Gliotactin, and the Na⁺/K⁺ ATPase are essential for septate junction function in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **161**, 979–89 (2003).
229. Faivre-Sarrailh, C. *et al.* *Drosophila* contactin, a homolog of vertebrate contactin, is required for septate junction organization and paracellular barrier function. *Development* **131**, 4931–42 (2004).
230. Wu, V. M., Schulte, J., Hirschi, A., Tepass, U. & Beitel, G. J. Sinuous is a *Drosophila* claudin required for septate junction organization and epithelial tube size control. *J. Cell Biol.* **164**, 313–23 (2004).
231. Mayer, F. *et al.* Evolutionary conservation of vertebrate blood-brain barrier chemoprotective mechanisms in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **29**, 3538–50 (2009).
232. Seabrooke, S. & O'Donnell, M. J. Oatp58Dc contributes to blood-brain barrier function by excluding organic anions from the *Drosophila* brain. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **305**, C558–67 (2013).
233. Bachmann, A. *et al.* Cell type-specific recruitment of *Drosophila* Lin-7 to distinct MAGUK-based protein complexes defines novel roles for Sdt and Dlg-S97. *J. Cell Sci.* **117**, 1899–909 (2004).
234. Hatan, M., Shinder, V., Israeli, D., Schnorrer, F. & Volk, T. The *Drosophila* blood brain barrier is maintained by GPCR-dependent dynamic actin structures. *J. Cell Biol.* **192**, 307–19 (2011).
235. Stork, T. *et al.* Organization and function of the blood-brain barrier in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **28**, 587–97 (2008).
236. Edenfeld, G. *et al.* Notch and Numb are required for normal migration of peripheral glia in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **301**, 27–37 (2007).
237. Pinsonneault, R. L., Mayer, N., Mayer, F., Tegegn, N. & Bainton, R. J. Novel Models for Studying the blood-brain and Blood-eye barriers in *Drosophila*. Blood-Brain other Neural Barriers *Rev. Protoc. Methods Mol. Biol.* **686**, 357–369 (Humana Press, 2011).
238. Denora, N., Trapani, A., Laquintana, V., Lopodota, A. & Trapani, G. Recent advances in medicinal chemistry and pharmaceutical technology-strategies for drug delivery to the brain. *Curr. Top. Med. Chem.* **9**, 182–96 (2009).
239. Bickel, U., Takayoshi, Y. & Pardridge, W. M. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 247–79 (2001).
240. Tsuji, a & Tamai, I. Carrier-mediated or specialized transport of drugs across the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **36**, 277–290 (1999).

241. Broadwell, R. D., Balin, B. J. & Salcmant, M. Transcytotic pathway for blood-borne protein through the blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 632–636 (1988).
242. Stenehjem, D. D., Hartz, A. M. S., Bauer, B. & Anderson, G. W. Novel and emerging strategies in drug delivery for overcoming the blood-brain barrier. *Future Med. Chem.* **1**, 1623–41 (2009).
243. Lentz, T., Hawrot, E. & Wilson, P. Amino acid sequence similarity between rabies virus glycoprotein and snake venom curaremimetic neurotoxins. *Proteins* **2**, 298–307 (1987).
244. Kumar, P. *et al.* Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* **448**, 39–43 (2007).
245. Liu, Y. *et al.* Brain-targeting gene delivery and cellular internalization mechanisms for modified rabies virus glycoprotein RVG29 nanoparticles. *Biomaterials* **30**, 4195–202 (2009).
246. Hwang, D. W. *et al.* A brain-targeted rabies virus glycoprotein-disulfide linked PEI nanocarrier for delivery of neurogenic microRNA. *Biomaterials* **32**, 4968–75 (2011).
247. Tao, Y., Han, J. & Dou, H. Brain-targeting gene delivery using a rabies virus glycoprotein peptide modulated hollow liposome: bio-behavioral study. *J. Mater. Chem.* **22**, 11808 (2012).
248. Lee, J. H., Engler, J. a, Collawn, J. F. & Moore, B. a. Receptor mediated uptake of peptides that bind the human transferrin receptor. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2004–12 (2001).
249. Prades, R. *et al.* Delivery of gold nanoparticles to the brain by conjugation with a peptide that recognizes the transferrin receptor. *Biomaterials* **33**, 7194–205 (2012).
250. Demeule, M. *et al.* Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2. *J. Neurochem.* **106**, 1534–44 (2008).
251. Thomas, F. C. *et al.* Uptake of ANG1005, a novel paclitaxel derivative, through the blood-brain barrier into brain and experimental brain metastases of breast cancer. *Pharm. Res.* **26**, 2486–2494 (2009).
252. Bertrand, Y. *et al.* Transport characteristics of a novel peptide platform for CNS therapeutics. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 2827–39 (2010).
253. Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. & Dowdy, S. F. *In vivo* protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science (80-.)*. **285**, 1569–1572 (1999).
254. Sancini, G. *et al.* Functionalization with TAT-peptide enhances blood-brain barrier crossing *In vitro* of Nanoliposomes carrying a curcumin-derivative to bind amyloid-B peptide. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **04**, 171 (2013).
255. Rousselle, C. *et al.* New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy. *Mol. Pharmacol.* **57**, 679–86 (2000).
256. Egleton, R. D. & Davis, T. P. Development of neuropeptide drugs that cross the blood-brain barrier. *J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **2**, 44–53 (2005).

257. Chatterjee, J., Gilon, C., Hoffman, A. & Kessler, H. N-methylation of peptides: a new perspective in medicinal chemistry. *Acc. Chem. Res.* **41**, 1331–42 (2008).
258. Clandinin, T. R. & Zipursky, S. L. Making connections in the fly visual system. *Neuron* **35**, 827–41 (2002).
259. Roignant, J.Y. & Treisman, J. E. Pattern formation in the *Drosophila* eye disc. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 795–804 (2009).
260. Banerjee, S., Bainton, R. J., Mayer, N., Beckstead, R. & Bhat, M. A. Septate junctions are required for ommatidial integrity and blood-eye barrier function in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **317**, 585–99 (2008).
261. Cagan, R. L. & Ready, D. F. The emergence of order in the *Drosophila* pupal retina. *Dev. Biol.* **136**, 346–62 (1989).
262. Borst, A. *Drosophila's* view on insect vision. *Curr. Biol.* **19**, R36–47 (2009).
263. Adams, M. D. *et al.* The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science (80-.)*. **287**, 2185–2195 (2000).
264. Nichol, H., Law, J. H. & Winzerling, J. J. Iron metabolism in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **47**, 535–59 (2002).
265. Geiser, D. L. & Winzerling, J. J. Insect transferrins: multifunctional proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1820**, 437–51 (2012).
266. Mandilaras, K., Pathmanathan, T. & Missirlis, F. Iron absorption in *Drosophila melanogaster*. *Nutrients* **5**, 1622–47 (2013).
267. Mentlein, R. Proline residues in the maturation and degradation of peptide hormones and neuropeptides. *FEBS Lett.* **234**, 251–6 (1988).
268. Vanhoof, G., Goossens, F., Meester, I., Hendrinks, D. & Scharpé, S. Proline motifs in peptides and their biological processing. *FASEB* **9**, 736–744 (1995).
269. Hau, V. S. *et al.* Effect of guanidino modification and proline substitution on the in vitro stability and blood-brain barrier permeability of endomorphin II. *J. Pharm. Sci.* **91**, 2140–9 (2002).
270. He, X., Semenov, M., Tamai, K. & Zeng, X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* **131**, 1663–77 (2004).
271. Sarko, D. *et al.* The Pharmacokinetics of cell-penetrating peptides. *Mol. Pharm.* **7**, 2224–31 (2010).
272. Palm-Apergi, C., Lorents, A., Padari, K., Pooga, M. & Hällbrink, M. The membrane repair response masks membrane disturbances caused by cell-penetrating peptide uptake. *FASEB J.* **23**, 214–23 (2009).
273. Verdurmen, W. P. R. & Brock, R. Biological responses towards cationic peptides and drug carriers. *Trends Pharmacol. Sci.* **32**, 116–24 (2011).