



Péptidos derivados del GB virus C como potenciales inhibidores del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

Ramona Galatola

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
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA

Péptidos derivados del GB virus C como potenciales inhibidores del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1



Ramona Galatola.

Barcelona, 2014

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Reactivos y disolventes

Tabla 2: Reactivos y disolventes empleados en la síntesis y caracterización de péptidos, junto con las casas comerciales correspondientes.

Casa comercial	Reactivos y disolventes
Novabiochem	aminoácidos y resinas 5(6)-Carboxi-tetrametilrodamina (Rho)
Genscript	Hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-b]piridin-1-il-metilil]-N-metilmetanaminio (HATU)
Scharlau	N,N-Dimetilformamida Ácido acético Ácido trifluoroacético
Merck	Diclorometano Ninhidrina Éter dietílico Acetonitrilo Bromuro de litio Resina Amberlite MB-3
Fluka	Ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) N,N-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) 1-Hidroxibenzotriazol (HOBT) Piridina N,N-Diisopropiletilamina (DIEA) Cloroformo Metanol
Multisyntech	Aminoácidos y resina
BRUKER	Ácido 2,5- dihidroxibenzoico (DHB)
Carlo Erba	Etanol absoluto Acetona Cloranilo
J.J Barker	Fenol
Rapp Polymer	Tentagel RAM
Sigma	Piperidina Anhidrido acético 1,2-Etanoditiol (EDT) Ácido 6-(7-Nitrobenzofurazan-4-ylamino)esanoico (NBD) Ácido palmítico Ácido mirístico Triisopropilsilano (TIS)

Tabla 3: Productos utilizados en los ensayos biofísicos, junto con las casas comerciales correspondientes.

Casa comercial	Reactivos y disolventes
Avanti Polar Lipid	POPG (L-R-palmitoiloleoilfosfatidilglicerol) DPPG (L-R-dipalmitoilfosfoglicerol) NBD-PC [N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il)fosfatidil colina]
Molecular Probes	ANTS (ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico) DPX (bromuro de p-xilenobispiridinio)
FLUKA	Tritón X-100 Ácido ascórbico Heptamolibdato amónico [(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O]
Pharmacia	Sephadez-G75
Sigma	Fosfato sódico hidratado [NaPO ₄ ²⁻ ·H ₂ O] TRIS [tris (hidroximetil) aminometano] DMSO (dimetilsulfóxido) HEPES [4-(2-hidroxietyl-1-piperazin-etanosulfónico)]

2 Instrumentación general

Tabla 4: Instrumentos empleados y marca correspondientes.

Instrumento	Marca
Pipetas	Gilson
Balanza	Sartorius Analytic ACCULAB
Phmetro	Crison
Baño ultrasonido	Selecta
Centrífuga	Digicen 20-R
Baño	Lauda AL-12

Instrumento	Marca
Estufa	Selecta
Liofilizadora	Lioalfa, Telstar
Equipo agua MiliQ	Milipore
Lector de placas	SpectraMax
Espectrofotómetro	Magellan
Extruder	Whitey
Osmómetro	Fiske M-210
Fluorímetro	PTI QM4CW
Columnas HPLC analítico	Agilent, Teknokroma
Columnas HPLC semipreparativo	Waters
Columna UPLC-MS	Waters
Espectrómetro de masas MALDI TOF	Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics)
Detector líquido-masas tiempo de vuelo	LCT Premier XE (Micromass Waters)
Detector ultravioleta acoplado a LC-TOF	UPLC ACQUITY (Waters)
HPLC	Agilent 1260 Infinity
Placas de ensayos biofísicos	Nunclon Surface
Espectropolarímetro	Jasco J810
biosensor Biacore	BIAcore™ T-100
Manómetro Langmuir (compresión)	NIMA
Manómetro Langmuir.(adsorción)	NIMA
Cuveta blodgett	NIMA
Sintetizador semiautomático	MultiSintech

3 Síntesis de péptidos en fase sólida

La síntesis química de péptidos se realizó mediante síntesis manual en fase sólida, descrita inicialmente por Merrifield [144]. La técnica está basada en el crecimiento de una cadena

peptídica mediante la adición consecutiva de aminoácidos sobre un soporte polimérico o resina al cual permanecen anclados durante toda la síntesis.

Los L- α -aminoácidos adicionados se unen por su extremo carboxilo al último aminoácido de la cadena. Tanto el grupo amino como las cadenas laterales de los L-aminoácidos se encuentran protegidos temporalmente para evitar polimerizaciones y reacciones no deseadas.

Existen dos estrategias distintas para la síntesis de péptidos en fase sólida en función de los grupos protectores que se utilizan.

La estrategia Boc/Bzl utiliza el grupo tert-butoxicarbonil (Boc) como protector de los grupos α -aminos y grupos de tipo benzil para proteger las cadenas laterales.

La estrategia Fmoc/tBu, que se utilizó en la presente tesis, donde la desprotección del grupo α -amino se realiza mediante un grupo 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) y las cadenas laterales de los aminoácidos trifuncionales mediante grupos tert-butil (tBu).

La síntesis de péptidos se realizó de manera manual en jeringas de 20 ml que contienen un filtro de polietileno, el cual retiene la resina y permite la eliminación de los restos de reactivos y los solventes empleados hacia un reservorio o balón de residuos con la ayuda del vacío. Para lograr una alta eficiencia en los acoplamientos todos los pasos de la síntesis se realizan con una adecuada agitación, utilizando en este caso una varilla de teflón. El sistema utilizado para llevar a cabo la síntesis se muestra en la Figura 9.

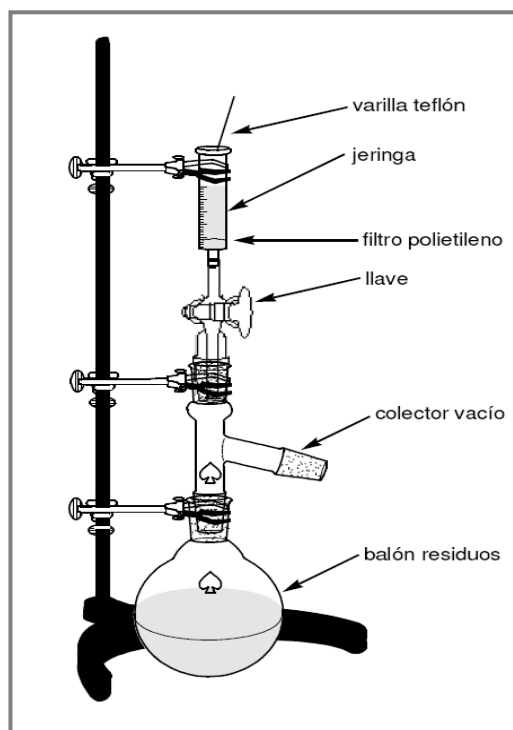


Figura 9: Diseño del equipo utilizado para la síntesis manual de péptidos en fase sólida.

3.1 Soporte sólido

Para la síntesis en fase sólida se suelen utilizar como soporte resinas de pequeño tamaño de partícula para favorecer la difusión rápida de los reactivos y acceso a los sustratos inmovilizados en la resina. Además debe ser inerte en las condiciones empleadas en toda la síntesis, estable mecánicamente y completamente insoluble en los disolventes empleados. Generalmente los polímeros utilizados son de poliestireno (PS) o de poliamida. En los últimos años se están utilizando soportes basados en polietilenglicol (PEG) insertado sobre PS, donde se combina la hidrofobicidad del PS con la hidrofiliidad del PEG.

3.1.1 Resina Tentagel® RAM

Las resinas Tentagel®, desarrolladas por primera vez por Bayer y Rapp [145, 146], consisten en una matriz de poliestireno enlazada covalentemente con una matriz de polietilenglicol, concretamente 30% de PS-DVB (copolímero de poliestireno y divinilbenceno) y 70% de PEG. Esta resina puede hincharse con una extensa variedad de disolventes polares y no polares, pero nunca con agua. La carga de los grupos funcionales de la resina Tentagel® comercial oscila entre 0, 15 y 0,30 mmol/g

En esta tesis los péptidos derivados de la región E1(22-39) del GBV-C (E1P8) se sintetizaron utilizando como soporte la resina Tentagel® RAM (Figura 10).

Tras hinchar la resina con DMF entre 1 y 2 horas, la incorporación del primer aminoácido C-terminal de la secuencia sobre la resina se realizó mediante la formación de un enlace amida.

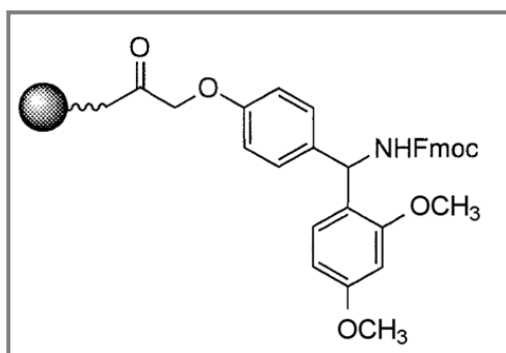


Figura 10: Resina Tentagel® RAM.

3.1.2 Resina TGA

El péptido derivado de la glicoproteína humana alfa-1-antitripsina, VIRIP, se sintetizó mediante la resina TGA (Figura 11).

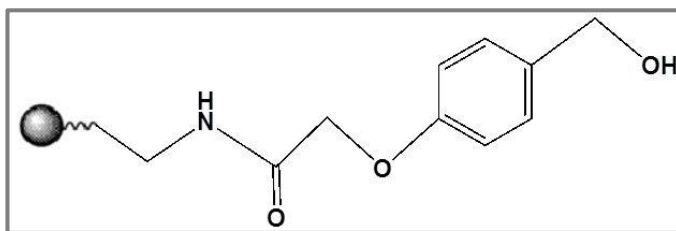


Figura 11: Resina TGA.

La TGA es una resina tentagel derivatizada con el ácido hidroximetilfenoxiacético que permite la obtención de péptidos en forma de ácidos carboxílicos debido a la formación de un enlace éster entre la resina y el grupo carboxilo del primer aminoácido. La incorporación del primer residuo C-terminal a la resina hidroxilo (TGA) implica la formación de un enlace éster, un proceso que si se lleva a cabo en condiciones no controladas puede dar lugar a racemizaciones o formación de dipéptidos.

Se efectuó la esterificación de la resina hidroxilo mediante la formación del anhídrido simétrico del aminoácido (protegido en su extremo α -amino y cadena lateral) en presencia de DMAP (4-dimetilaminopiridina).

Para la formación del anhídrido simétrico se disolvió el aminoácido (10 eq. respecto a la funcionalización de la resina) en DCM, con 1 ó 2 gotas de DMF para completar la disolución. Se adicionaron 5 eq. de DIPCDI (respecto la funcionalización de la resina) disuelto también en DCM. Se dejó reaccionar la mezcla durante 20 minutos a 0°C en un ambiente seco que se consiguió tapando el balón con un tubo relleno de CaCl₂. Después, se evaporó el DCM en un rotavapor. El residuo seco obtenido se disolvió en la mínima cantidad de DMF y se adicionó a la resina. Seguidamente, se adicionaron 0,1 eq. de DMAP también disuelto en DMF. Después 1 hora de reacción a temperatura ambiente y con agitación ocasional, se eliminaron los excesos de reactivo realizando lavados de DMF.

Se determinó el porcentaje de incorporación del primer aminoácido sobre la resina, y por lo tanto su funcionalización inicial real, mediante la detección de la N-fluorenilmetilpiperidina que se obtiene al liberar el grupo Fmoc con piperidina. Para llevar a cabo el ensayo se pesó una cantidad de Fmoc-aminoácido-resina seca equivalente a 1 μmol respecto a la funcionalización de la resina. Se le adicionaron 3 ml de una disolución de piperidina al 20% en DMF y se agitó suavemente durante 5 minutos. Paralelamente, se preparó un blanco que contenía únicamente la disolución de piperidina-DMF. Se midieron las absorbancias de la muestra y el blanco en cubetas de cuarzo a la longitud de onda de 290. Se calculó la nueva funcionalización en mmol g^{-1} aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{mmol g}^{-1} = \frac{(Abs_{muestra} - Abs_{referencia})}{(1,65 \text{ mg resina})}$$

(2)

3.1.3 Resina ChemMatrix®

La resina ChemMatrix® está compuesta por un 100% de PEG, puede hincharse prácticamente con cualquier tipo de disolvente, incluida agua. En este tipo de resina la carga de los grupos funcionales puede llegar a alcanzar hasta 1 mmol g^{-1} (Figura 12) [147]. Todo esto favorece que esta resina sea idónea para sintetizar un péptido de elevada hidrofobicidad con tendencia a formar agregados, como es el caso del péptido de fusión de la glicoproteína gp41 del HIV-1 (PF-HIV-1).

Para llevar a cabo la síntesis del PF-HIV-1 se utilizó la resina ChemMatrix-PAL. Esta resina está derivatizada con el grupo PAL (ácido 5-(aminometil-3',5'-dimetoxifenoxi)valérico) y permite la obtención de péptidos amida en el extremo C-terminal.

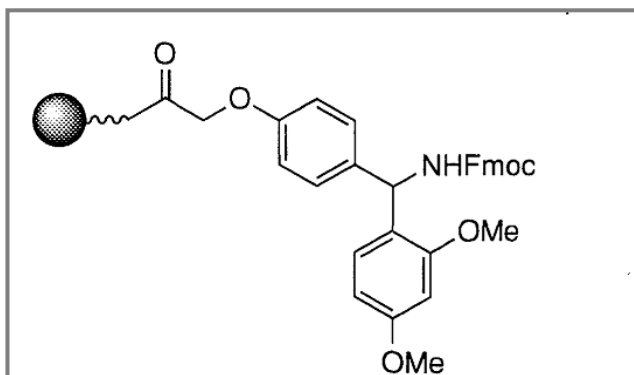


Figura 12: Resina PAL-ChemMatrix[®].

3.2 Reactivos de acoplamiento

Los reactivos de acoplamiento se utilizan para activar el grupo α -carboxilo del aminoácido protegido y permiten obtener altos rendimientos en la reacción de la formación del enlace amida. Además, éstos minimizan las reacciones secundarias, como la racemización, que se pueden producir durante la síntesis.

Los reactivos de acoplamientos más utilizados pueden dividirse en dos grupos: carbodiimidas y sales de fosfonio y uronio.

3.2.1 Carbodiimidas

Las carbodiimidas son los reactivos de acoplamiento más utilizados en la síntesis de péptidos (Figura 13). Entre las más empleadas destaca la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) [148, 149], que fue la primera descrita; es apropiada para trabajar en ambiente apolares como los originados por las resinas de poliestireno. La *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI)[150] también muy utilizada, presenta la ventaja de ser soluble en las ureas que se forman como subproductos de síntesis.

La utilización de estos reactivos de acoplamiento puede dar lugar a reacciones secundarias debido al intermedio reactivo que se genera, la *O*-acil isourea. Reacciones secundarias como

la transposición de O-acil a N-acil isourea, que es una especie inactiva, o la racemización por enolización de la O-acil isourea. Por eso cuando se emplean las carbodiimidas se recomienda la utilización de aditivos del tipo sales de fosfonio y uronio, como el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) [151], que reaccionando con la O-acil isourea forman el éster activo del aminoácido.

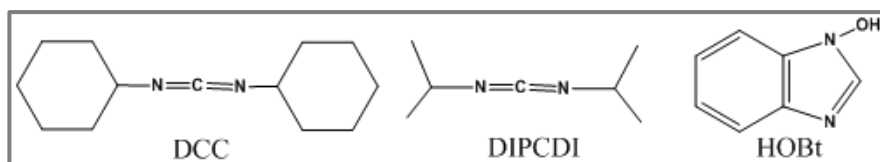


Figura 13: Estructura de las carbodiimidas y aditivos utilizados en SPPS.

3.2.2 Sales de fosfonio o uronio

En los últimos años se ha extendido mucho la utilización de nuevos reactivos que minimizan la formación de subproductos no deseados y a la vez reducen los tiempos de reacción. La mayoría son sales de fosfonio o uronio (Figura 14), las cuales, en presencia de una base, generalmente una amina terciaria como la N,N-diisopropiletiamina (DIEA), pueden convertir el carboxilato del aminoácido protegido en una especie activada. Las más empleadas son el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(dimetilamino) fosfonio (BOP)[152] y el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin) fofonio (PyBOP)[153, 154], derivadas de HOBt.

Cabe destacar que las que presentan los mejores resultados en cuanto a eficiencia y ausencia de racemización son el 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HATU) [155] y el 7-azabenzotriazol-1-il-oxi-tris-(pirrolidin) fosfonio hexafluorofosfato (PyAOP) [156, 157].

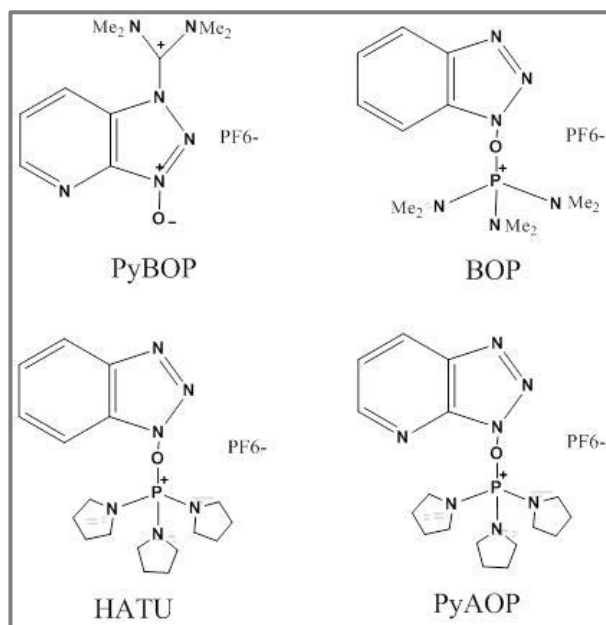


Figura 14: Estructuras de las principales sales de fosfonio y uronio utilizadas en SPPS.

3.2.3 Protocolo de acoplamiento de aminoácidos a la peptidil-resina

La síntesis de péptidos en fase sólida se llevó a cabo formando el enlace peptídico entre el grupo amino de la cadena peptídica unida al soporte y el grupo carboxilo del aminoácido entrante. El proceso de acoplamiento requirió la activación del grupo α -carboxilo del aminoácido entrante. En esta tesis se utilizaron HATU y DIEA como activadores. Se pesaron las cantidades calculadas de aminoácido y HATU, luego se disolvieron en la mínima cantidad de DMF, y se adicionó la DIEA. Todos los reactivos se emplearon en un exceso de tres veces respecto a la cantidad necesaria para completar la reacción.

Una vez terminado el tiempo de reacción para el acoplamiento del aminoácido, se realizaron 4 lavados con DMF, para eliminar los reactivos y el resto de aminoácido que no habían reaccionado.

3.3 Desprotección del grupo Fmoc

El grupo protector α -amino del último aminoácido de la cadena se elimina antes de la unión del siguiente aminoácido con bases (20% de piperidina en DMF), a través de una reacción de β -eliminación. Para eliminar el grupo Fmoc se realizaron dos lavados de 10 minutos con la solución de piperidina. Después se lavó 4 veces con DMF. Este proceso de desprotección y acoplamiento se repitió tantas veces como fue necesario hasta completar la secuencia del péptido deseado.

A continuación se muestra un esquema general de la síntesis de péptidos en fase sólida (Figura 15).

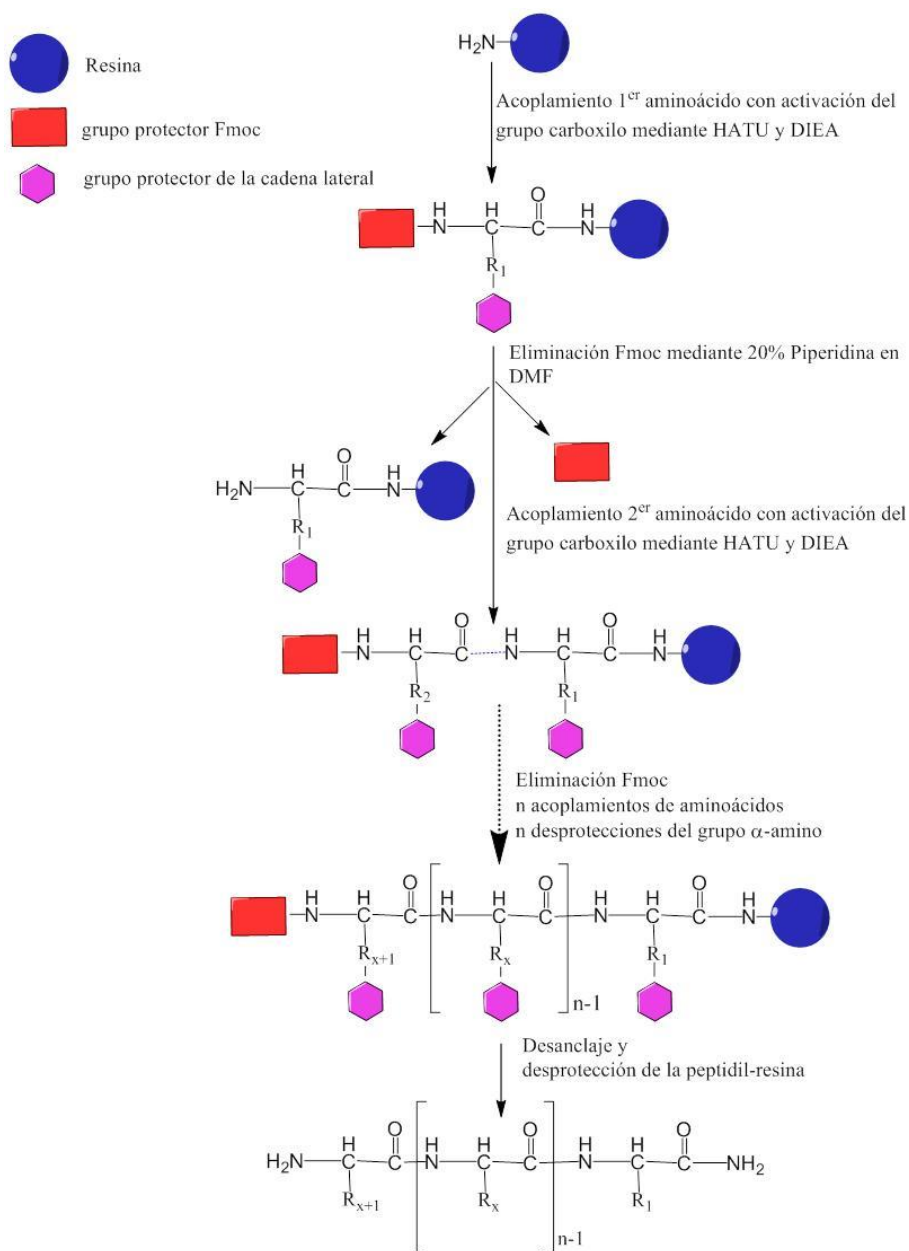


Figura 15: Esquema general de la síntesis en fase sólida.

3.4 Test de identificación de aminas libres

3.4.1 Test cualitativo de Kaiser o de ninhidrina

El ensayo de la ninhidrina, ideado por Kaiser [158], es un método para detectar de forma cualitativa la presencia de grupos aminos primarios libres. Se utiliza al finalizar un acoplamiento y tras la desprotección del grupo α -amino. Para llevar a cabo el test se utilizan dos soluciones:

- ✓ Reactivo A: se prepara una disolución de fenol (20 g) en etanol absoluto (5 ml). Por otro lado, se prepara una disolución de cianuro de potasio (KCN) (6,5 mg) en agua (10 ml). De esta solución se toma 1 ml y se enrasa a 50 ml con piridina. Ambas soluciones se agitan durante 3 horas sobre 4g de resina amberlite MB-3 y seguidamente se filtran y mezclan.
- ✓ Reactivo B: se prepara una disolución de ninhidrina (2,5 g) en etanol absoluto (50 ml).

Para realizar el test se introduce una pequeña muestra de peptidil-resina seca en un tubo de vidrio. Se añaden 3 gotas de reactivo A y 3 gotas del reactivo B, se agita y se calienta a 110°C durante 3 minutos. En paralelo, se realiza un ensayo control que contiene la misma proporción de reactivos sin peptidil-resina. La ninhidrina reacciona con los grupos aminos (Figura 16) obteniéndose una coloración azul púrpura, que indica la presencia de grupos amino primarios libres (test positivo). En cambio una coloración amarilla indica la ausencia de aminas primarias libres (test negativo), lo que asegura que la incorporación del aminoácido se ha producido en al menos un 95%.

Algunos aminoácidos como la serina, el ácido aspártico o la asparagina dan falsos positivos, es decir no dan la coloración azul esperada cuando existen grupos aminos libres.

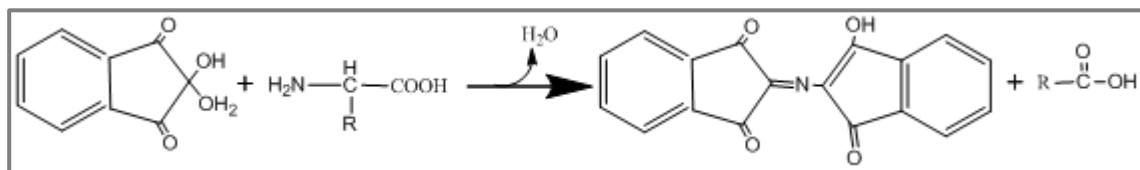


Figura 16: Esquema de la reacción que se produce durante el test de Kaiser o ninhidrina.

3.4.2 Test del cloranilo

Este método se utiliza para detectar aminas secundarias libres como la prolina [159], permitiendo evaluar los acoplamientos en que interviene este aminoácido. El reactivo empleado es una solución saturada de 0,75 g de cloranilo (2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona) en 25 ml de tolueno.

El test se realiza de forma similar al test de ninhidrina. Se adiciona una pequeña porción de peptidil-resina en un tubo de vidrio, y se añaden 4 gotas de acetona y 1 gota de solución saturada de cloranilo, a temperatura ambiente. Una coloración azul-verdosa señala la presencia de aminas secundarias libres, y por lo tanto indica un resultado positivo del test. Este método no es tan sensible como el test de Kaiser.

3.4.3 Test del TNBS

Este ensayo permite la detección de aminas primarias y secundarias [160]. EL TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfónico) reacciona con los grupos aminos, obteniéndose una coloración naranja. Para realizar el test se procede de forma similar a los anteriores. Se adiciona una alícuota de peptidil-resina a un tubo de vidrio, se añaden 3 gotas de DIEA al 10 % en DMF y 3 gotas de TNBS al 1 % en DMF. La aparición de perlas naranjas indica que hay grupos aminos libres.

Este test no es muy eficaz en el caso de aminas primarias estéricamente impedidas.

3.5 Desanclaje y desprotección de la peptidil-resina

Una vez finalizada la síntesis de la secuencia peptídica deseada, se eliminó el grupo Fmoc del extremo N-terminal del último aminoácido empleando las condiciones anteriormente descritas. Siguidamente, se realizó un tratamiento de secado de la peptidil-resina para eliminar el DMF. Además, los restos de base pueden neutralizar en parte el tratamiento acidolítico por lo que se lavó la peptidil-resina con un ácido débil como el ácido acético.

Las condiciones utilizadas para el secado de la peptidil-resina se indican en la Tabla 5.

Tabla 5: Tratamiento de secado de la peptidil-resina.

Etapa	Reactivos	Operación	Tiempo (min. x repeticiones)
1	Ácido acético	Lavado	1 x 2
2	DCM	Lavado	1 x 2
3	MeOH	Secado	1 x 2
4	Éter	Secado	1 x 4
5	Vacío	Secado	

Una vez completada la síntesis de la molécula peptídica, se llevó a cabo su separación del soporte polimérico y se eliminaron simultáneamente los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos. Este proceso se realiza en función de los residuos de aminoácidos presentes, grupos protectores de las cadenas laterales y del tipo de espaciador unido a la resina.

La desprotección final y liberación del péptido de la resina se realizó mediante un mecanismo de acidólisis, para ello se utilizó el TFA. El tratamiento de la peptidil-resina con TFA da lugar a especies catiónicas altamente reactivas en el medio de reacción que provienen de la desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos. Mediante este tratamiento se eliminaron los grupos protectores *ter*butilo de la treonina, ácido aspártico y

tirosina, el grupo protector butoxicarbonil (Boc) del triptófano y el grupo trifenilmetil (Ttrt) de glutamina. Bajo estas condiciones no es posible eliminar el grupo acetamidometil (Acm) de los residuos de cisteína, por lo tanto el péptido sintetizado queda parcialmente desprotegido. Estas especies reactivas, que se forman en la desprotección, pueden reaccionar y modificar los aminoácidos que contienen grupos funcionales ricos en electrones como tirosina, triptófano y cisteína. Por esta razón se añadió junto al TFA reactivos nucleófilos que secuestran estas especies catiónicas. Los capturadores utilizados en este trabajo fueron el 1,2 etanoditiol (EDT), el triisopropilsilano (TIS) y el agua. El agua actúa como agente quelante de los cationes tBu, mientras que el EDT y el TIS intervienen en la eliminación del grupo trifenilmetil de los residuos de His y Gln. Para desanclar el péptido de la resina y desproteger las cadenas laterales, se trató la peptidil-resina con un 95% de TFA que contenía un 5% de capturadores de TFA/EDT/H₂O/ TIS. Transcurridas 3 horas de reacción, se filtró la resina para obtener péptido en disolución. Se evaporó el TFA bajo corriente de N₂(g). Se realizaron 10 lavados con éter frío para precipitar el péptido. Tras cada lavado, se centrifugó a 4500 rpm, durante 4 min a 10°C. Posteriormente se liofilizó el péptido en una solución de ácido acético al 10 % y se almacenó en un congelador a -20°C.

3.6 Adición de sondas fluorescentes

Una vez acabada la síntesis de péptidos, y previamente al proceso de desanclaje, algunos péptidos fueron marcados con sondas fluorescentes como la Rodamina (5(6)-Carboxi-tetrametilrodamina) y NBD (ácido 6-(7-Nitrobenzofurazan-4-ylamino)esanoico). Tras la desprotección del último aminoácido añadido a la peptidil-resina, se incorporó la sonda correspondiente. Para ello, se utilizaron como activadores del grupo α -carboxilo la DIPCDI y HOBt. Tanto los reactivos de acoplamiento como las sondas fluorescentes se emplearon con un exceso de tres veces respecto a la funcionalidad de la resina. Una vez incorporada la sonda, se llevó a cabo la desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos y el desanclaje del soporte polimérico mediante tratamiento con medio ácido de 95% de TFA y 5% de H₂O, TIS y EDT.

3.7 Síntesis de lipopéptidos

Para obtener los lipopéptidos, se añadió ácido palmítico y ácido mirístico al extremo N-terminal del péptido E1P8. La derivatización lipofílica se llevó a cabo con el péptido unido a la resina y con las cadenas laterales de los aminoácidos protegidas. El procedimiento para obtener ambos derivados fue el mismo. Se utilizaron como activadores DIPCDI/HOBt. Primero se pesaron las cantidades correspondientes de ácido graso y el activador de HOBt. Luego se disolvieron en la mínima cantidad de DMF y se adicionó la DIPCDI. La mezcla de activación se dejó en reposo aproximadamente 10 minutos para garantizar la formación del éster activo del aminoácido, el cual posteriormente se adicionó a la peptidil-resina. La reacción de acoplamiento tuvo lugar durante 48 horas y se comprobó mediante el test de ninidrina.

Una vez incorporado los ácidos grasos a la peptidil-resina, se llevó a cabo la desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos y el desanclaje del soporte polimérico mediante tratamiento con medio ácido de TFA y mezcla de H₂O, TIS y EDT.

3.8 Ciclación

La ciclación del péptido E1P8 del GBV-C se llevó a cabo mediante la formación de un puente desulfuro, entre la Cys²⁵ y la Cys²⁹ de la secuencia, por oxidación al aire en tampón bicarbonato de amonio pH 8-9. A fin de favorecer las reacciones intramoleculares sobre las intermoleculares se emplearon soluciones a baja concentración de péptidos (0,1-0,3 mg/ml). En todos los casos, se controló la reacción mediante el test de Ellman [161].

3.8.1 Test de Ellman

Este método permite detectar la presencia de grupos alifáticos sulfhidrilos. El ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) reacciona cuantitativamente con los grupos sulfhidrilos, generando aniones de color amarillo.

Se prepara una disolución de DNTB (40 mg) en un tampón de fosfato de sodio (PBS) 0,1 M a pH 8 (10 ml). Se disuelve 0,1 μmol de péptido en 3 ml de PBS pH 8 y se adiciona 0,1 ml de reactivo DNTB, dejando reaccionar durante 15 min. Seguidamente, se mide la absorbancia a 410 nm en una cubeta de 1 cm. En paralelo, se prepara una solución de referencia que contiene DNTB y tampón PBS sin péptido y se mide la absorbancia.

Se calcula la concentración de los grupos sulfhidrilos mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{A_{410(\text{Péptido})} - A_{410(\text{ref.})}}{13650}$$

(3)

3.9 Síntesis semiautomática de péptidos

La síntesis de los 23 péptidos análogos del péptido E1P8 del GBV-C se llevó a cabo en un sintetizador semiautomático Multisyntech GmbH (Figura 17).

El instrumento presenta un bloque reactor con capacidad de 24 reactores, que permite la síntesis múltiple de 24 péptidos de forma simultánea. La bomba incorporada permite una dosificación exacta de los disolventes y reactivos, mientras que un distribuidor los reparte a todos los reactores. Además se dispone de un mecanismo de agitación que garantiza una mezcla completa de los reactivos, así como de una bomba de vacío que permite el vaciado de los reactores. Todo esto está controlado por el sistema operativo del aparato, que permite programar las operaciones de llenado, tiempo de reacción, intervalos de agitación, lavado y vaciado de los reactores.

Las únicas etapas que se realizan de forma manual son la adición de los aminoácidos y reactivos, la desprotección final y liberación del péptido de la resina. Esta última etapa se lleva a cabo con un accesorio que puede conectarse a una corriente de helio la cual hace

presión sobre los reactores, permitiendo la recogida de las soluciones que contienen los crudos peptídicos en tubos de 50 ml.

El protocolo utilizado durante la síntesis múltiple es muy similar a la síntesis manual que se muestra en los apartados anteriores. En la Tabla 6 se muestra el protocolo utilizado durante la síntesis múltiple.

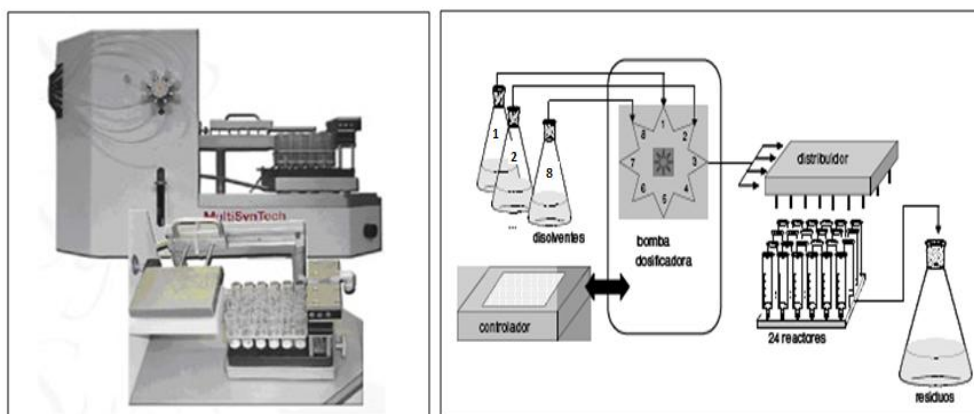


Figura 17: Esquema del sintetizador semiautomático Multisynth GmbH. Fuente: <http://www.multisynth.com>

Tabla 6: Protocolo de la síntesis semi-automática de péptidos.

Etapa	Ciclos	N. ciclos x tiempo (min.)
1	Hinchar resina	1 x 60
2	Lavados con DMF	5 x 1
3	Acoplamiento (aa/HATU/DIEA)	1 x 30
4	Lavados DMF	5 x 1
5	Desprotección con 20% peridina en DMF	2 x 10
6	Lavados con DMF	5 x 1

3.10 Caracterización de péptidos

Se caracterizaron tanto los crudos peptídicos como los péptidos puros por HPLC analítico, cromatografía de ultrapresión (UPLC) adaptado a espectrometría de masas electrospray (ES-MS) y espectrometría de masas MALDI-TOF con la finalidad de confirmar la presencia del producto.

3.10.1 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) a escala analítica

La caracterización de los productos se llevó a cabo por HPLC a escala analítica en un cromatógrafo Perkin-Elmer constituido por un sistema binario de bombas LC-250, un detector Diodo Array LC-235 e inyector manual. También se empleó un cromatógrafo Agilent 1260 Infinity. Se utilizaron las columnas de fase reversa Kromasil (Teknokroma) C₄ y C₈ 4,6 x 250 mm y un tamaño de partícula de 5 µm y la columna (*Eclipse Plus*) C₁₈ 4,6 x 100 mm, 3,5 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies). Los péptidos se eluyeron a un flujo de 1 ml/min y un gradiente lineal de los disolventes A y B (A: H₂O con 10 mM de acetato de amonio; B: Metanol con 10 mM de acetato de amonio para los derivados de la proteína E1 del GBV-C) (A: H₂O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA para los restantes péptidos). La detección se realizó a 220 y 280 nm.

3.10.2 Cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC)

Para caracterizar los productos, también, se utilizó un cromatógrafo UPLC ACQUITY (Waters) con un detector UV en serie (Waters) acoplado a un detector líquido-masas de tiempo de vuelo (LC-TOF). Se empleó una columna en fase reversa ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 2,1 x 100 mm y tamaño de partícula 1,7 µm (Waters). Los péptidos se eluyeron a un flujo 0,3 ml/min y un gradiente lineal de los disolventes A y B (A: H₂O con 10 mM de acetato de amonio; B: Metanol con 10 mM de acetato de amonio para los derivados de la proteína E1 del GBV-C) (A: H₂O con 20 mM HCOOH; B: ACN con 20 mM HCOOH para los restantes péptidos). La detección se realizó a 220 y 280 nm.

3.10.3 Espectrometría de masas

3.10.3.1 Espectrometría de masas por ionización por electrospray (ES-MS)

Los pesos moleculares de los péptidos sintetizados fueron detectados mediante un espectrómetro de masas por ionización por electrospray acoplado al cromatógrafo UPLC ACQUITY (Waters). La medida de masas por electrospray (ES-MS) consiste en la generación de un spray de iones de la muestra a una determinada energía en la cámara de ionización. Estos iones pasan al analizador mediante una serie de lentes con un voltaje determinado. Para ello, se utilizó un detector líquido-masas de tiempo de vuelo (LC-TOF) LCT Premier XE (Micromass Waters) con una interfase electrospray positiva (ES^+) o negativa (ES^-), en función de la molécula a analizar.

3.10.3.2 Espectrometría de masas MALDI-TOF

La espectrometría de masas MALDI-TOF utiliza el láser como fuente de ionización y consiste en bombardear directamente la muestra cristalizada constituida por una mezcla del péptido y una matriz.

La preparación de la muestra se realizó mezclando 1 μ l de solución del péptido (1-2 μ g/ μ l) con 1 μ l de solución de matriz. Posteriormente, 1 μ l de la muestra se coloca en la placa de MALDI-TOF y se deja secar a temperatura ambiente.

La matriz utilizada fue el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB). Se empleó un espectrómetro Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics) y una placa MTB 384 *polished steel* (Bruker). Se utilizó como método de adquisición el método lineal con un voltaje de polaridad positiva.

3.11 Desalación y purificación de los péptidos

3.11.1 Extracción en fase sólida

Los crudos peptídicos obtenidos a partir de la síntesis en fase sólida fueron desalados en columnas Oasis HLB Plus cartridge 225 mg/60 μ g de Waters, por extracción en fase sólida.

En primer lugar se limpió la columna con 5 ml de metanol y se acondicionó con H₂O (5ml). A continuación, se añadió 1 mg/ml de péptido disuelto en H₂O/ACN y se adicionó 5 ml H₂O + 0,1% TFA para eluir las sales del crudo peptídico. Posteriormente, se eluyó el péptido con 5 ml de H₂O/ACN (80:20). Por último se añadieron 5 ml de ACN para recoger los restos de péptido que podían haber quedado retenidos en la columna. Cada fracción de filtrado fue colectada en un tubo diferente de polipropileno de 10 ml. Los filtrados recogidos, se caracterizaron por HPLC analítico, UPLC y ES-MS con el fin de identificar la fracción que contenía el péptido.

3.11.2 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) a escala semipreparativa

Las moléculas peptídicas sintetizadas se purificaron por HPLC a escala semipreparativa con las columnas Bridge (Agilent) de fase reversa C₈ y C₁₈, 22 x 250 mm y un tamaño de partícula de 5 µm, en un cromatógrafo Agilent 1260 Infinity. Se utilizó un flujo de elución de 3,5 ml/min con un gradiente lineal de los disolventes A y B (A: H₂O con 0,05% de TFA; B: ACN con 0,05% de TFA). La detección se realizó a 220 nm. Las fracciones recogidas durante la purificación de los diferentes péptidos, se caracterizaron mediante HPLC analítico y espectrometría de masas (UPLC, ES-MS y/o MALDI-TOF).

4 Ensayos biofísicos

4.1 Modelos de membrana: Liposomas

4.1.1 Liberación de contenidos vesiculares

En la presente tesis doctoral se llevó a cabo el ensayo de liberación de contenidos vesiculares (*leakage*) como modelo de membrana para analizar la capacidad de los derivados del péptido EIP8 de inhibir el proceso de desestabilización de membranas inducido por el PF-HIV-1. Se utilizaron, como modelo de membrana, liposomas de POPG [1-Palmitoil-2-Oleil-sn-Glicero-3-fosfo-(1-rac-glicerol)].

✓ **Preparación de los liposomas**

Para llevar a cabo el ensayo de “*leakage*” se prepararon LUVs (Vesículas Unilamelares) de POPG. Para ello se disolvieron 15,9 mg en 1 ml de cloroformo: metanol (2:1) en un tubo pyrex de color topacio. Seguidamente, se evaporaron los disolventes orgánicos mediante un rotavapor para obtener así una película lipídica. Luego, se resuspendió en 2 ml de tampón acuoso Hepes (Hepes 5mM, NaCl 20 mM, ANTS 12,5 mM y DPX 45 mM) y se agitó a temperatura ambiente hasta obtener una dispersión de MLVs (Vesículas Multilamelares). Esta suspensión se sometió a 10 ciclos de congelación/descongelación, pasando la muestra de un baño de nieve carbónica enfriada con acetona a un baño de agua a 80°C. Este proceso provoca la disminución del número de lamelas de las vesículas, obteniéndose así los LUVs. Posteriormente, se utilizó el método de extrusión para disminuir y uniformizar el tamaño de las vesículas. Para ello las vesículas atraviesan membranas de policarbonato con poros de 100 nm de un extruder (Lipex Biomembranes) al someterlas a una corriente de nitrógeno gaseoso de 200 psi aproximadamente.

Una vez uniformado el tamaño de los liposomas, se pasaron a través de una columna de Sephadex G75 para retirar la sonda no encapsulada en los liposomas que había quedado en el medio. Para compactar y equilibrar la columna se hidrató el Sephadex G75 en tampón HEPES (HEPES 5 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4). Para evitar que los liposomas se rompieran al paso por la columna, se igualó la osmolaridad de este tampón con la osmolaridad del tampón de resuspensión en un osmómetro Fiske Micro-Osmometer (Model 210).

Una vez eliminado la sonda no encapsulada, se cuantificó la cantidad de fosfolípido como se describe a continuación.

✓ **Determinación cuantitativa de fosfolípidos**

Para la cuantificación de la concentración de fosfolípidos presente en la suspensión se utilizó el método de McClare [162]. En este método, el fósforo, presente en forma de

fosfolípido en la muestra, se hidroliza a fosfato inorgánico. Mediante la adición de heptamolibdato amónico, el fosfato se transforma en ácido fosfomolibdenico de color azul. La intensidad de este color se mide espectrofotométricamente y se compara con un patrón de calibrado.

Se preparó una disolución de 1 mM de $\text{NaPO}_4^{3-} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ de la que se tomaron alícuotas de diferentes concentraciones para confeccionar una recta patrón. En primer lugar, se llevó a cabo el proceso de digestión de las muestras. Para ello se añadieron 0,4 ml de HClO_4 70% a cada uno de los tubos y se incubaron durante 45 minutos a 180-190 °C. Posteriormente, se añadieron 4 ml del reactivo heptamolibdato amónico a cada uno de los tubos y a continuación 0,5 ml de ácido ascórbico agitando las muestras con ayuda de un vortex. Los tubos se incubaron durante 10-15 minutos a 100 °C. Por último, se midió la absorbancia de cada uno de los tubos en un espectrofotómetro a 812 nm.

✓ **Condiciones experimentales del ensayo**

Para llevar a cabo el ensayo de inhibición de la liberación del contenido vesicular se preparó una disolución 0,1 mM de liposomas y se buscó la concentración del PF-HIV-1 necesaria para provocar aproximadamente un 50% de liberación del contenido vesicular.

Todas las muestras se analizaron en placas blancas de 96 pocillos (Nunclon Surface), a temperatura ambiente y la fluorescencia fue medida mediante un espectrofotómetro de placas (SpectraMax M5, Molecular Device).

El PF-HIV-1 y los derivados del E1P8 se disolvieron en DMSO y se coincubaron a una relación molar (relación derivados E1P8: PF-HIV-1, 10:1) durante 30 minutos. Posteriormente se adicionó la cantidad necesaria de suspensión de liposomas a los péptidos y a las mezclas previamente coincubadas, dejando reaccionar durante 15 minutos. Finalmente, se registró la emisión de la sonda ANTS a 520 nm fijando la longitud de onda de excitación a 355 nm. Después de cada medida, se incorporó el detergente Tritón X-100 al

10% para disgregar las vesículas, diluyendo el ANTS y el DPX en el medio. La señal de fluorescencia obtenida en estas condiciones se consideró como el 100% de “leakage”.

El ensayo de liberación vesicular se repitió 5 veces y todas las muestras se analizaron por triplicado en cada ensayo.

La liberación se cuantificó teniendo en cuenta la siguiente ecuación (4):

$$\% \text{ Liberación} = \frac{F_f - F_0}{F_{100} - F_0} \times 100$$

(4)

Siendo F_f el valor de la intensidad de fluorescencia tras la adición de los péptidos,

F_0 la intensidad de fluorescencia inicial de la suspensión de liposomas,

F_{100} la intensidad de fluorescencia tras añadir el Tritón X-100.

Una vez calculado el porcentaje de liberación, se refirió este valor a la liberación originada por el PF-HIV-1 según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Liberación}_{\text{péptidoGBV-C}} = \frac{\% \text{ Liberación}}{\% \text{ Liberación}_{\text{PF-HIV-1}}} \times 100$$

(5)

Por último se calculó el porcentaje de inhibición de la liberación inducida por el PF-HIV-1 de cada uno de los péptidos estudiados:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \% \text{ Liberación}_{\text{péptidoGBV-C}}$$

(6)

4.1.2 Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET)

Se estudió la interacción entre el PF-HIV-1 y derivado cíclico del péptido E1P8 (E1P8 cyc) mediante la técnica del FRET [163].

✓ Condiciones experimentales del ensayo

Se preparó una solución 7 mM de vesículas unilamelares de 100 nm de diámetro, como se ha descrito en el precedente apartado, en tampón PBS 0,1 M (120 mM NaCl, 2,7 mM KCl y 10 mM Na₂HPO₄, a pH 7,4.

En la primera parte del ensayo, se adicionó 0,4 μM de PF-HIV-1 marcado con NBD a una solución 0,1 mM de vesículas unilamelares de POPG disueltas en PBS. A continuación se adicionaron concentraciones crecientes (entre 0,0125 μM y 0,4 μM) del E1P8 cyc marcado con Rodamina.

Fijando la longitud de onda de excitación a 460 nm, se registró la emisión de la sonda NBD a una longitud de onda de 530 nm antes y después la adición del E1P8 cyc con Rodamina.

Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro PTI QM4CW (Photon Technology Internacional).

Todas las muestras se analizaron por triplicado a temperatura ambiente y en constante agitación.

4.1.3 Método de centrifugación

Con este ensayo [108] se analizó la capacidad de los derivados de la región E1P8 de inhibir la unión del PF-HIV-1 a las vesículas lipídicas. El ensayo se llevó a cabo en el Departamento de Ciencia de los Materiales de la Universidad John Hopkins en Baltimore (USA) en el laboratorio de la Dra. Kalina Hristova.

✓ **Condiciones experimentales del ensayo**

El protocolo utilizado para realizar este estudio fue descrito por White y cols [164]. Para el ensayo se prepararon LUVs de POPG en tampón Hepes (Hepes 5 mM, 20 mM NaCl), a pH 7,4 que contenían el lípido bromado 1,2-di-(9,10-dibromo) estearoil-snglicero-3-fosfolina. El Br-PC se usó para facilitar la sedimentación de los liposomas. Se utilizó POPG como fosfolípidos para asegurar la máxima interacción entre el PF-HIV-1 y las vesículas lipídicas. Se utilizó una relación molar POPG:BrPC 80:20.

Se prepararon soluciones de 1 mg/ml de los péptidos. Los análogos del E1P8 fueron incubados con el PF-HIV-1 en DMSO durante 30 minutos a una relación molar 1:1 (E1 GBV-C: PF-HIV-1) a una concentración final de 0,25 mM. Después, los péptidos solos y las mezclas fueron incubados con las vesículas lipídicas (0,565 mM) en Hepes 5 mM, durante otros 30 minutos. Se analizó la concentración total del péptido, inyectando por HPLC analítico una alícuota de la solución inicial lípido-péptido, y el resto fue sedimentado mediante una centrifuga Microfuge[®] 18 de Beckman Coulter[™]. La muestra fue precipitada mediante una sedimentación gradual, por eso las mezclas lípido-péptido se sometieron a 3 ciclos de centrifugación de 30 minutos a velocidades crecientes 4500, 9000 y finalmente 16000g. Posteriormente, se analizó la concentración final del péptido del sobrenadante por HPLC.

Todas las muestras se analizaron por triplicado.

4.1.4 Isotherma de unión a liposomas

✓ **Condiciones experimentales del ensayo**

Se preparó una solución de 7 mM de vesículas unilamelares de POPG de 100 nm de diámetro como descrito en una solución TRIS, 10 mM, pH 7,4.

Se analizaron las interacciones péptido/lípido registrando los cambios en el espectro de fluorescencia del [W⁸] PF-HIV-1 (2 μM) al añadir concentraciones crecientes de liposomas LUVs. A continuación, se incubó en DMSO el PF-HIV-1 con péptidos de la proteína E2 GBV-C, E2(175-192), E2(289-306) y E2(313-330), (P59, P97 y P105, respectivamente), y se analizaron los cambios en el espectro de fluorescencia del PF-HIV-1 al añadir los liposomas.

La intensidad de fluorescencia se midió en función de concentraciones crecientes de liposomas. Una vez seleccionada las longitudes de onda ($\lambda_{\text{excitación}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 300\text{-}400\text{nm}$), se procedió a la medida inicial de la fluorescencia emitida por el PF-HIV-1 solo o en presencia de los péptidos E2. A continuación se añadieron cantidades crecientes de liposomas según la relación péptido/liposoma: 1/25, 1/50, 1/75, 1/100, 1/150, 1/200, 1/250, 1/ 300, 1/350 y 1/400 (volúmenes entre 12.5 μl y 25μl de la solución de liposomas). Tras cada adición se registró el espectro de emisión deseado a una temperatura de 25°C. En todas las medidas se restó la señal del blanco (tampón TRIS).

Paralelamente se midieron los cambios en el espectro de fluorescencia del NATA (N-acetil-triptófanoamida) al añadir concentraciones crecientes de liposomas. El NATA tiene un máximo de intensidad de 350-355 nm y su emisión de fluorescencia no se desplaza al ir incorporando liposomas, ya que no se une a membranas. Se utilizó el NATA para eliminar el efecto dilución que tuvo lugar al ir incorporando liposomas.

4.2 Modelos de membrana: Capas lipídicas monomoleculares

4.2.1 Monocapas de adsorción

Mediante estudios de actividad superficial y penetración en monocapas [165-167], se caracterizaron los péptidos sintetizados en base a sus propiedades fisicoquímicas y la capacidad de penetrar en una monocapa lipídica.

Los ensayos tanto de monocapas de adsorción cuanto los de monocapas de extensión se realizaron en la Facultad de Farmacia, en el Departamento de Fisicoquímica de la Universidad de Barcelona.

4.2.1.1 Actividad superficial

El ensayo se llevó a cabo en un manómetro superficial del tipo Langmuir (Nima Langmuir Balance, Coventry, UK) (Figura 18). El manómetro presenta una lámina, generalmente de platino o de papel de filtro, parcialmente sumergida en la subfase y unida a una electrobalanza, que convierte en impulsos eléctricos la fuerza que la superficie líquida ejerce sobre la lámina. El valor de la tensión eléctrica es proporcional a la tensión superficial del líquido y se transmite con la densidad adecuada a la entrada de electrodo de un potenciómetro digital, el cual está a su vez conectado a un registrador gráfico. De este modo, es posible registrar gráficamente, y en función del tiempo, los valores de tensión eléctrica (mV) procedentes de la electrobalanza, los cuales son convertidos en unidad de tensión superficial (mN m^{-1}).

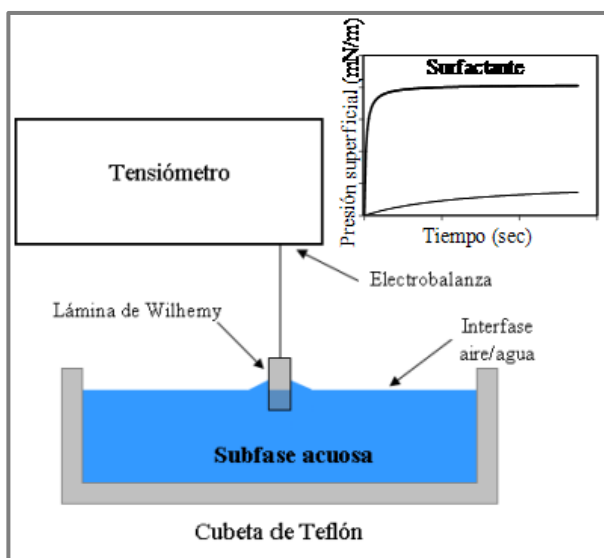


Figura 18: Esquema de un manómetro de la tensión superficial a la interfase aire/agua.

Los estudios de actividad superficial se realizaron en una cubeta cilíndrica de politetrafluoroetileno (teflón) (19,6 cm², 30 ml), que dispone de un orificio lateral, para facilitar la incorporación de las sustancias en la subfase. Concentraciones variables y crecientes de péptido, disuelto en H₂O/acetonitrilo, se inyectaron por el orificio lateral de la cubeta debajo de la subfase de Hepes (7,4 pH), determinando su presión superficial en función del tiempo.

Todas las muestras se analizaron por triplicado, a temperatura ambiente, en constante agitación.

4.2.1.2 Penetración en monocapas

Los estudios de cinética de penetración de los péptidos en monocapas de POPG se llevaron a cabo en la misma cubeta utilizada para la actividad superficial. En primer lugar se disolvió el lípido POPG, en cloroformo (1mg/ml). Luego, se extendió la monocapa con una microjeringa de forma que la presión inicial (π_0) alcanzase el valor deseado. Tras dejar pasar un reducido tiempo de estabilización, se procedió a la inyección en la subfase de una concentración concreta de péptido (0,38 μ M). Todas las muestras se analizaron por triplicado, a temperatura ambiente, con la subfase en continua agitación. Se registraron los cambios de presión superficial en función del tiempo hasta que la presión alcanzara el equilibrio.

4.2.2 Isotermas de compresión

Se estudió la capacidad de derivadas del péptido E1P8 de afectar la interacción entre el PF-HIV-1 y el lípido POPG mediante estudios de isotermas de compresión [70, 107].

Las isotermas de compresión se realizaron, a temperatura ambiente, en una cubeta NIMA Langmuir de teflón (de área superficial 690 cm², volumen 350 ml) equipada de una barrera móvil de teflón, y se utilizó como subfase Hepes 5 mM, a pH 7,4.

En primer lugar, se prepararon las soluciones de POPG puro en cloroformo a 1mg/ml, y de péptidos puros en cloroformo con 5% de DMSO (1 mg/ml). Luego, se prepararon las mezclas de POPG con cada péptido analizado, a diferentes fracciones molares de lípido: péptido (100:0; 90:10; 80:20; 60:40; 40:60; 0:100).

Se analizaron también mezclas de los péptidos derivados del E1P8 con el PF-HIV-1, a diferentes fracciones molares E1 GBV-C: PF-HIV-1 (100:0; 80:20; 60:40; 40:60; 20:80 y 0:100).

Finalmente se realizaron monocapas mixtas de POPG con los derivados E1P8 y el PF-HIV-1 (a una relación molar 2:1), a diferentes fracciones molares de POPG: (E1 GBV-C/PF-HIV-1) (100:0; 90:10; 80:20; 60:40; 40:60; 0:100).

Tras equilibrar la balanza, se extendió mediante microjeringas de precisión Hamilton un volumen exactamente medido de la solución a estudiar.

Una vez transcurrido el tiempo necesario para la estabilización de la monocapa, se empezó la compresión a una velocidad de 5 cm min⁻¹.

Se registraron los cambios de presión superficial en función del área por molécula (nm² molec⁻¹), consiguiendo así las curvas de presión-área (π -A) o isothermas de compresión.

Todas las muestras se analizaron por triplicado.

4.2.3 Extracción de una monocapa de Langmuir-Blodgett

La interacción entre péptidos y modelos de membrana, como monocapas, se profundizó mediante estudios con microscopía de fluorescencia [70, 168].

Los ensayos de microscopía de fluorescencia se llevaron a cabo en la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, con la supervisión del Dr. Antonio Cruz. Las isothermas de compresión de las

monocapas de fosfolípido y de la mezcla con péptidos se realizaron en una cubeta Langmuir-Blodgett (LB) (200 cm², Nima, Coventry, UK) equipada de una barrera móvil de teflón y un termostato. La cubeta estaba posicionada en una cámara cerrada para asegurarse el aislamiento de la luz exterior.

Se preparó una solución de fosfolípido DMPG (1,2-Dimiristoil-sn-Glicero-3-fosfoglicerol) puro disuelto en cloroformo/metanol (2:1) con 1% molar de NBD-PC [(7-nitrobenceno-2-oxa-1,3-tiazol-4-il)-1,2-dihexacanoil-snglicerol-3-fosfocolina], y soluciones de DMPG con péptidos (5% molar respecto al lípido) y 1% de NBD-PC. Las soluciones lipídicas se extendieron mediante una microjeringa de precisión Hamilton sobre una subfase de agua bidestilada. Una vez extendida la monocapa, se dejó evaporar el solvente orgánico (10 min) y se empezó la compresión a una velocidad de 25 cm min⁻¹ hasta obtener una presión superficial de 1-2 mN m⁻¹. Se dejó estabilizar durante 10 minutos, y seguidamente, se completó la compresión empezando a transferir la monocapa a un cubreobjetos Menzel-Gläser de 24 x 60 mm a una velocidad de extracción de 5 mm/min. Simultáneamente se registró la isoterma π -A. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado a 25°C.

Las monocapas extraídas fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia Leica DM4000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipado de apropiados filtros de fluorescencia para permitir la observación de la NBD-PC (λ_{ex} de 480 nm y λ_{em} de 527 nm). Se obtuvieron imágenes a diferentes presiones de la película extraída [169].

4.3 Dicroísmo circular

El dicroísmo circular (CD, *Circular Dichroism*) es un fenómeno que resulta cuando los cromóforos en un entorno asimétrico interaccionan con la luz polarizada. En las proteínas los cromóforos mayoritarios son los grupos amidas de los enlaces peptídicos y las cadenas laterales aromáticas. Tanto los polipéptidos como las proteínas, dependiendo de la orientación de los enlaces peptídicos, formarán espectros de CD característicos (Figura 19):

- ✓ **Hélice α :** Es la estructura secundaria más frecuente en las proteínas glomerulares. El espectro de una hélice α presenta tres bandas características: dos negativas, una a 220-222 nm y otra a 207-209 nm y una banda positiva a 191-193 nm. La intensidad de estas tres bandas refleja la proporción de elipticidad en los péptidos analizados.
- ✓ **Lámina β :** El espectro muestra una banda negativa intensa sobre los 216 nm, una banda positiva entre 295 y 200 nm, y otra banda alrededor de 175 nm. Estos espectros presentan mayor variabilidad que los de una hélice α , tanto en la amplitud como en la posición de las bandas.
- ✓ **Giro β :** Las transiciones características de un giro β son la que muestran una banda negativa débil a 220-230 nm, una banda positiva a 200-210 nm y una banda negativa a 180-190 nm.
- ✓ **Desordenada o *random coil*:** El espectro se caracteriza por una banda negativa intensa alrededor de 200 nm y otra banda muy débil, que puede ser positiva o negativa, sobre 220-230 nm.

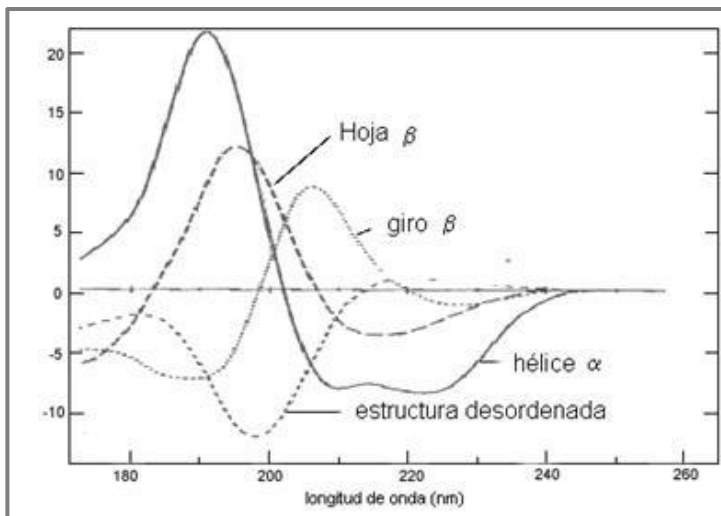


Figura 19: Espectro de dicroísmo circular en UV lejano de las principales conformaciones en péptidos y proteínas [170].

A pesar de existir bandas características para cada estructura secundaria, en la práctica es difícil interpretar con exactitud un único tipo de estructura secundaria. Por ello, en estructuras más complejas es necesario algún método para cuantificar el grado de estructuración y determinar la contribución de cada una de las conformaciones en un espectro. Una manera de cuantificar es determinar el porcentaje de helipticidad que presenta el péptido, utilizando los parámetros de Yang [171].

Los parámetros de Yang predicen la elipticidad molar por residuo (ecuación (7)), que debería tener un péptido de una determinada longitud para que presentara un 100% de elipticidad, tomando como base los espectros conocidos de diferentes proteínas.

$$[\Theta_H^n] = [\Theta_H^\alpha]x \left(1 - \frac{k}{n}\right)$$

(7)

Donde $[\Theta_H^n]$ es la elipticidad molar por residuo que presentaría un péptido de n aminoácidos con una elipticidad de 100%. $[\Theta_H^\alpha]$ es la elipticidad molar por residuo que presentaría un péptido de longitud infinita totalmente helicoidal, k es una constante que depende de la longitud de onda, n representa el número de enlaces amida que contiene el péptido.

Esta técnica nos proporcionó informaciones acerca de la estructura secundaria de las secuencias peptídicas y permitió el estudio de los cambios conformacionales de los péptidos debido a interacciones entre ellos [172].

✓ **Condiciones experimentales del ensayo**

Las medidas de dicroísmo circular se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Jasco J810, controlado por un ordenador PC equipado con el software J-700, ubicado en el Parque Científico de Barcelona. Se emplearon cubetas de cuarzo (Hellma) de 1 mm de paso óptico y 300 µl de volumen.

Condiciones de lectura:

Temperatura: temp. ambiente

Rango de λ : 190-260 nm

Ancho de banda: 1mm

Tiempo de respuesta: 1 s

Resolución: 0,2 mm

Velocidad de barrido: 10 nm/min

Numero de acumulaciones: 3.

Preparación de las muestras

Los péptidos, justo antes de ser analizados, se disolvieron en acetonitrilo (15%) y PBS (10 mM) a pH 7,4.

Para el estudio de las interacciones entre el PF-HIV-1 y los derivados del péptido E1P8, se preparó una mezcla a diferentes relaciones molares de los análogos E1P8/PF-HIV-1 (10 μ M: 50 μ M, 25 μ M: 50 μ M, 50 μ M: 50 μ M, 100 μ M: 50 μ M, 250 μ M: 50 μ M), que se coincubó durante 30 minutos en DMSO antes de ser liofilizada. A continuación las muestras liofilizadas se disolvieron, antes de realizar las medidas, en el 15% de ACN y PBS 10 mM .

Con la finalidad de eliminar el ruido de fondo, antes de cada análisis se realizó un blanco, compuesto por los disolventes (15% de ACN y PBS 10 mM) sin péptidos, que se restó al espectro obtenido de la muestra.

Procesado de los espectros

El equipo de espectroscopía Jasco J8 está controlado por el software Spectra Manager®. Este software además de controlar la adquisición de los espectros permite suavizarlos, así como sustraer la línea base de éstos.

Los resultados se expresaron en términos de elipticidad molar (Θ , $\text{mdeg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$).

4.4 Resonancia en plasmón superficial (SPR)

Se realizó la resonancia en plasmón superficial para profundizar el estudio de la interacción entre el PF-HIV-1 y los derivados del péptido E1P8 [69].

El ensayo se llevó a cabo en un biosensor BIAcore™ T100, desarrollado por BIACORE AB (Uppsala, Suecia), ubicado en el Parque Científico de Barcelona. Este consiste en una unidad de proceso con dispensador de líquidos, un sistema de detección y un ordenador que controla el sistema (Figura 20).



Figura 20: Biosensor BIAcore™ T100. Fuente: <http://www.gelifesciences.com>

El sistema de detección de un instrumento de SPR está compuesto por sistema óptico y por el chip sensor, en el cual tiene lugar el fenómeno de resonancia de plasmón de superficie,

que está formado por un sustrato de vidrio en el que se deposita una lámina de oro de 50 nm de grosor sobre la cual se encuentra una matriz hidrófoba de 100 nm con 2-3% de dextrano. Esta matriz constituye un medio compatible con las interacciones biomoleculares y permite la inmovilización de un gran número de ligandos. El chip sensor forma parte de una unidad de microfluído por la cual circulan las disoluciones que interaccionarán con el ligando unido al chip. Por otro lado el chip sensor está en contacto con el prisma del sistema óptico a través del cual se enfoca la luz cercana al infrarrojo y polarizada hacia el plano no modificado del chip sensor. La luz reflejada se analiza en un detector de diodos fijo y bidimensional.

Cuando un haz de luz ilumina la interfase entre dos medios con diferente índice de refracción (en este caso vidrio y solución acuosa), entre los cuales se ha insertado una capa fina de metal, se obtiene el fenómeno de resonancia de plasmón de superficie (Figura 21).

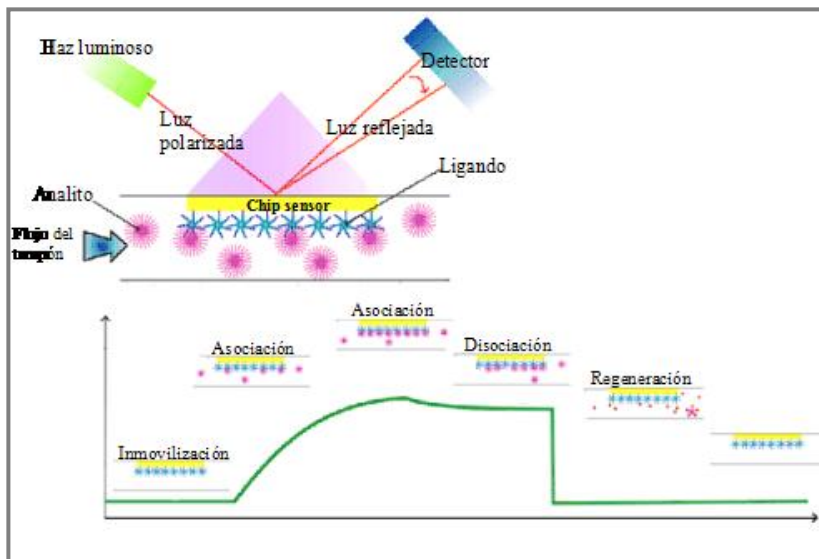


Figura 21: Fenómeno de la resonancia del plasmón de superficie.

La onda evanescente creada por la reflexión total interna interacciona con los electrones oscilantes o plasmones del metal, causando una disminución en la intensidad de la luz

reflejada. El ángulo de resonancia al que se da este fenómeno es sensible al índice de refracción de la solución próxima al metal. Como la longitud de onda de la luz incidente, el índice de refracción del vidrio y el oro se mantienen constantes, el ángulo de resonancia variará solamente con los cambios en el índice de refracción de la fase acuosa, y estos cambios son debidos a variaciones en la masa al interactuar las biomoléculas en este medio.

Cuando se representan las variaciones del ángulo de resonancia (en unidades de resonancia, RU) en función del tiempo se obtienen los sensorgramas. Mil unidades de resonancia equivalen a un incremento de 0,1 grados del ángulo de resonancia de plasmón. Para una proteína promedio, este valor corresponde a una variación en la concentración en una superficie de 1 ng mm^{-2} .

✓ **Condiciones experimentales del ensayo**

Se utilizó como superficie biosensora un chip de dextrano carboximetilado, pre-inmovilizado con estreptavidina, con la finalidad de inmovilizar ligandos biotinilados.

En primer lugar se hidrató el chip con tampón HBSN 1x, durante 7 min. y seguidamente se limpió inyectando una solución 50 mM NaOH y 1M NaCl a un flujo de $10 \mu\text{l min}^{-1}$. Antes de pasar a la inmovilización, se normalizó el chip inyectando 70% de glicerol a un flujo de $10 \mu\text{l min}^{-1}$.

El PF-HIV-1 biotinilado fue disuelto en 5% de DMSO y en tampón HBSN x1,05. La disolución se filtró y se inyectó sobre la superficie del chip sensor hasta alcanzar una inmovilización de 1774 RU. Como control negativo del ensayo se inactivó el primer canal del chip SA con biocitina, inyectando una disolución de 1,25 mM de biocitina a un flujo de $10 \mu\text{l min}^{-1}$ durante 45 s. Para quitar el producto que no había reaccionado con la estreptavidina se pasó el tampón HBSN x1,05 a un flujo de $100 \mu\text{l min}^{-1}$ durante 120 s.

Los analitos disueltos en 5% DMSO, 0,05% TWEEN20 y HBSN x1,05 se inyectaron por duplicado sobre el chip sensor en un rango de concentración entre 0,25 μM y 1 μM a un flujo de 10 $\mu\text{l min}^{-1}$ y a una temperatura de 30°C. El tiempo de asociación y disociación fue de 120 s para cada una de ellas. Para la regeneración se utilizó 25 mM de NaOH, inyectado durante 30 s. Para este ensayo se aplicó la corrección del solvente (SOLVENT CORRECTION) que extrapola una recta que corrige los errores de pipeteo de DMSO. Esta corrección se realiza inyectando sobre el chip sensor concentraciones entre 5,8% y 4,5% de DMSO en HBSN x1,05.

Los parámetros de interacción se analizaron mediante Biacore T100 GxP Evaluation software.

5 Ensayos Celulares

5.1 Hemólisis

El efecto de una sustancia hemolítica en contacto con glóbulos rojos produce un aumento en la absorbancia debido a la liberación de la hemoglobina [173, 174] .

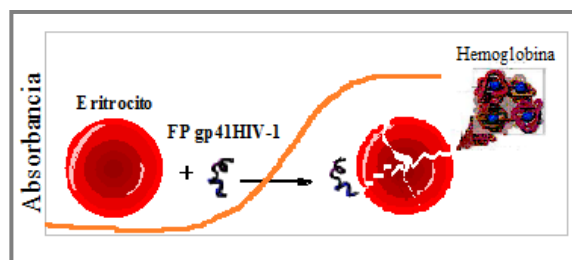


Figura 22: Ensayo de Hemólisis.

Los péptidos fusogénicos tienen capacidad de producir hemólisis [128, 175], mediante este ensayo se puede medir la capacidad hemolítica de las secuencias sintetizadas (Figura 22). Se realizó el ensayo de hemólisis para estudiar la capacidad de los derivados del péptido E1P8 de inhibir la actividad hemolítica del PF-HIV-1 [95].

✓ **Tratamiento de la sangre**

Se utilizó sangre de conejo tratada, una vez extraída, con heparina, un anticoagulante. Los eritrocitos se centrifugaron para 10 minutos a 3300 rpm a 25°C. Se descartó el plasma (sobrenadante) y se lavó el contenido celular (pellet) con PBS (1x) tres veces. Finalmente los glóbulos rojos se diluyeron 1:10 en PBS.

✓ **Condiciones experimentales del ensayo**

Se disolvieron 2 mM de PF-HIV-1 y 20 mM de los derivados del péptido E1P8 en DMSO. Se prepararon, en eppendorf con PBS 1x, alícuotas entre un rango de 0 a 1000 μ M de los péptidos. A continuación se añadió a cada alícuota 100 μ M de PF-HIV-1. Después de 60 min a 37°C, se adicionó a cada muestra el 10% de eritrocitos dejando en incubación otros 60 min a 37°C. Finalmente se centrifugaron las eppendorf 10 minutos a 3300 rpm a 25°C y se transfirió el sobrenadante en una placa *Immuno 96 MicroWell™ Solid Plates (MediSorp, Tipus F) de NUNC*. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro *Spectra Max M5* a 405nm.

Las muestras se analizaron por triplicado. Se examinaron también la actividad hemolítica del PF-HIV-1, de los péptidos solos, el efecto del DMSO y un control negativo (PBS).

La señal de absorbancia obtenida en presencia del PF-HIV-1 se consideró como el 100% de hemólisis. El porcentaje de hemólisis se calculó según la siguiente ecuación (8):

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{Abs_p - Abs_0}{Abs_{100} - Abs_0} \times 100$$

(8)

Siendo Abs_p la absorbancia en presencia de la mezcla de los péptidos con el PF-HIV-1,

Abs_0 la absorbancia en ausencia de péptidos,

Abs_{100} la absorbancia del PF-HIV-1.

5.2 Ensayo de fusión celular

En el ensayo de fusión celular se mimetiza la entrada del HIV-1 en la célula. El uso de estos modelos está bastante extendido [73, 176-180], ya que permite seleccionar de forma rápida inhibidores potenciales de la fusión del HIV-1 sin necesidad de manipular el virus.

Los ensayos de fusión celular realizados en esta tesis se llevaron a cabo, empleando la línea celular HeLa-env (donada por el Dr. Julià Blanco de la Fundación IRSICaixa), que expresa la proteína de la envoltura del HIV-1 e integra en su genoma el promotor LTR (*Long Terminal Repeats*) de éste y la línea celular TZM-bl, (AIDS Reagents Cat. No 8129), que expresa el receptor de membrana de los linfocitos CD4 y los correceptores CCR5 y CXCR4 e integra en su genoma el gen de la β -galactosidasa. Se llevaron a cabo en el Servicio de cultivos celulares del IQAC-CSIC de Barcelona.

Cuando se cocultivan las dos líneas celulares tiene lugar la fusión de éstas provocando la formación de grandes sincitios celulares (masa de protoplasma en que coexisten varios núcleos). Al fusionarse las células se activa la expresión de la β -galactosidasa.

Al marcar la β -galactosidasa con metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido, se forma un complejo que excitado emite fluorescencia.

Mediante la detección de β -galactosidasa, se analizó la capacidad de los péptidos derivados del E1P8 de inhibir la fusión celular.

✓ Condiciones experimentales del ensayo

Las líneas celulares se cultivaron en DMEM (*Dulbecco modified Eagle médium*) con 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS), 100 μ g/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin. Los cultivos celulares fueron mantenidos en un frasco de cultivo a 37°C y 5% de CO₂.

El ensayo se realizó en placas blancas de fondo transparente de 96 pocillos, con un volumen final por pocillo de 100 μ l.

En primer lugar, se cultivó HeLa-env (2500 células/pocillo) en presencia de concentraciones crecientes de péptidos (5-200 μ M), por triplicado, a 37°C y 5% CO₂ durante una hora. A continuación, se añadieron las células TZM-bl (25000 células/pocillo) y se incubó la placa durante 24 horas más. Como control positivo de la fusión celular se empleó un inhibidor conocido de la fusión del HIV-1 (C34) a una concentración de 1 μ M. Transcurrido 24 horas, se añadió a cada pocillo 5 μ l de una solución de detergente Igepal al 20% en tampón fosfato (100 mM, pH 7,2, 0,1 mM MgCl₂).

A continuación se descartaron 50 μ l de medio de cada pocillo, se añadieron 50 μ l de una solución de tampón fosfato (100 mM, pH 7,2, 0,1 mM MgCl₂) con 1 mM de metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido y se incubó para 30 min a 37 °C. Finalmente, se adicionó 150 μ l de tampón de glycine-NaOH (100 mM, pH 10,6) y se llevó a cabo la lectura de la placa en un espectrofluorímetro (SpectraMax), utilizando una longitud de onda de excitación de 355 nm y de emisión de 460 nm.

Con los resultados obtenidos se calcularon los porcentajes de fusión celular (ecuación (9)) y de inhibición de la fusión (ecuación (10)), así como la IC₅₀ (concentración que inhibe el 50% la fusión celular) de cada péptido. Se ajustaron los datos obtenidos a una curva sigmoideal dosis-respuesta mediante el software GraphPad® (V5, Prism) y se calculó a partir de la curva sigmoideal la IC₅₀ de cada péptido.

$$\% \text{ Fusión} = \left(\frac{F_f - F_0}{F_{100} - F_0} \right) \times 100$$

(9)

Siendo F_f el valor de la intensidad de la luminiscencia tras incubar las células con los péptidos, F_0 la intensidad de luminiscencia inicial de una de las líneas celulares y F_{100} la intensidad de luminiscencia del control de fusión celular.

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \% \text{ fusión}$$

(10)

5.3 Ensayos de susceptibilidad del HIV-1 a los péptidos

El ensayo mide la concentración de inhibidor necesaria para reducir al 50% la infección viral en el cultivo celular (IC50). El HIV-1 realiza de forma natural su ciclo biológico en las células TML-bl que contienen el receptor CD4 y los correceptores CXCR4 o CCR5.

En esta tesis los ensayos preliminares de susceptibilidad del HIV-1 a los péptidos se realizaron, en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínico del Barcelona, bajo la dirección de Eloisa Yuste.

✓ Condiciones experimentales del ensayo

El virus del HIV-1 se cultivó mediante la trasfección de células 293T utilizando el método del fosfato de calcio de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ProFection mammalian transfection system; Promega, Madison, WI, USA).

Para llevar a cabo el ensayo se utilizó una placa de 96 pocillos. Se incubó el virus, a un volumen de 75 μ l/pocillo y por triplicado, en presencia de concentraciones crecientes (5-500 μ M) de los péptidos a 37°C y 5% de CO₂ durante 2 horas. Por último, se añadieron 10⁴ células TZMbl/pocillo y se incubó la placa a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 horas más.

Como control positivo de máxima infección se reservaron pocillos con TZM-bl infectadas en ausencia de péptido y como control negativo se reservaron pocillos sólo con células.

Las células TZM-bl, como se ha descrito anteriormente, expresan el receptor de membrana de los linfocitos CD4 y los correceptores CXCR4 y CCR5, por lo que son susceptibles de ser infectadas por el HIV-1. Además, integran en su genoma el gen de la luciferasa, lo que permite medir la infección de los cultivos tras 72 horas de incubación (periodo de tiempo durante el cual el virus es capaz de realizar un ciclo de replicación), siendo la dosis infecciosa proporcional a la cantidad de compuesto producido.

Transcurrido el tiempo de incubación, se quitó el sobrenadante y se leyó la luminiscencia mediante un luminómetro (Turner Biosystem, Sunnyvale, CA) utilizando un kit de la luciferasa.

Con los resultados obtenidos se calculó la IC₅₀ (concentración que inhibe el 50% de la infección) de cada péptido. Se ajustaron los datos obtenidos a una curva sigmoideal dosis-respuesta mediante el software GraphPad® (V5, Prism) y se calculó a partir de la curva sigmoideal la IC₅₀ de cada péptido.

5.4 Ensayo de citotoxicidad MTT

Para descartar que la inhibición de la fusión se debiera a un efecto tóxico del péptido sobre la célula se analizó la citotoxicidad de los péptidos mediante el ensayo de MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenada que produce un compuesto de color azul (formazán) que permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas [181, 182], siendo la cantidad de células vivas proporcional a la cantidad de formazán producido.

Para llevar a cabo este ensayo se incubaron las células TZM-bl (25000 células/pocillo) con cantidades crecientes de los péptidos (5-200 μ M), por triplicado, durante 24 horas. Como control positivo de viabilidad celular se reservaron pocillos sólo con células, sin péptido.

Tras el periodo de incubación, se descartó el sobrenadante del cultivo celular de cada pocillo, se añadieron 100 µl de una dilución 1:5 en PBS de la solución de MTT (7,5 mg/ml) y se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante dos horas. Tras la incubación con el MTT, se descartó el sobrenadante celular de cada pocillo y se añadieron 100 µl de DMSO/pocillo. Seguidamente, se agitó la placa a 600 rpm hasta que se disolvieron todos los cristales de formazán formados y se procedió a la lectura de la placa en un espectrofotómetro (Tecan Sunrise) a 570 nm.

Con los datos obtenidos de densidad óptica (DO) se calculó el porcentaje de viabilidad y de citotoxicidad del cultivo celular en presencia de péptido mediante las ecuaciones (11) y (12), así como la CC50 (concentración citotóxica 50, es decir, concentración de péptido que reduce la viabilidad celular en el 50% de los cultivos). El cálculo de la CC50 se realizó mediante regresión no lineal con el programa GraphPad® (V5, Prism).

$$\% Viabilidad = \frac{DO_{células\ tratadas}}{DO_{células\ control}} \times 100$$

(11)

$$\% Citotoxicidad = 100 - \% viabilidad$$

(12)

Siendo DO la absorbancia del fomazán a 570 nm.