

Capítulo 2

Modelos *in vitro* para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos

Juan José Acevedo Fernández¹, José Santos Angeles Chimal^{1,2*}, Heriberto Manuel Rivera¹, Vera Lucía Petricevich López¹, Ninfa Yaret Nolasco Quintana², Dianelly Yazmín Collí Magaña², Jesús Santa-Olalla Tapia^{1,2*}

¹ Cuerpo Académico: Fisiología y Fisiopatología. Facultad de Medicina Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Calle Leñeros esquina Iztaccíhuatl s/n. Col. Volcanes – Cuernavaca, Morelos, México C.P. 62350 Tel.: (777) 3297948 Ext. 3493

² Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular “Dr. Ruy Pérez Tamayo”, Facultad de Medicina/Hospital del Niño Morelense, Calle Gustavo Góme Azcarate #205, Col. Lomas de la Selva, C.P. 62270 Tel.: (777) 1020583.

jsa@uaem.mx

Doi: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.38>

Referenciar este capítulo

Acevedo Fernández, J.J., Angeles Chimal, J.S., Rivera, H.M., Petricevich López, V.L., Nolasco Quintana, N.Y., Collí Magaña, D.Y. & Santa-Olalla Tapia, J. (2013). Modelos *in vitro* para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. En M. Segura Campos, L. Chel Guerrero & D. Betancur Ancona (Eds.), Bioactividad de péptidos derivados de proteínas alimentarias (pp. 29-82). Barcelona: OmniaScience.

1. Introducción

En las últimas décadas la necesidad de desarrollar nuevos compuestos que permitan atender la alta demanda de patologías crónicas, y por otra parte disminuir los efectos adversos que se generan por los medicamentos empleados rutinariamente, han motivado la búsqueda de fuentes alternas para nuevos compuestos. La diversidad de proteínas con actividades en los diferentes procesos celulares, han propuesto la posibilidad de influir sobre las respuestas celulares al emplear péptidos que alteren las propiedades de proteínas estructurales, enzimas, receptores, canales y transportadores que participan en respuestas celulares como proliferación, citotoxicidad, regulación de estrés oxidativo y efectos antimicrobianos, entre otros. El impulso que ha tenido la industria farmacéutica para el desarrollo de compuestos biotecnológicos, permite predecir una nueva época en donde el empleo de compuestos proteicos presenta un mejor efecto con una mayor especificidad. Sin embargo, los problemas que se tienen para la producción de proteínas y las dificultades para su biodisponibilidad o para mantener concentraciones terapéuticas en el sitio de acción limitan su aplicación. De manera interesante se ha iniciado el empleo de péptidos que muestran efectos biológicos relevantes como antihipertensivos, hipoglucemiantes, antiproliferativos, citotóxicos, antioxidantes y antibióticos. De esta manera, establecer modelos biológicos que permitan aislar, caracterizar y determinar mecanismos de acción, tanto *in vivo* como *in vitro*, son útiles para la validación y establecimiento de nuevos compuestos que permitan atender patologías como: diabetes, hipertensión, obesidad, síndrome metabólico y cáncer.

La identificación de compuestos orgánicos ha permitido la incorporación en la medicina de sustancias que se derivan de plantas, ante la necesidad de proveer fuentes alternas de administración de moléculas complejas con actividades que prevengan el desarrollo de enfermedades o sus complicaciones. Por otra parte, la posibilidad de establecer alimentos funcionales adicionados con péptidos bioactivos se hace muy atractiva, sobre todo si se toma en consideración que muchos de los compuestos sintetizados actualmente se han desarrollado de actividades inicialmente descritas de compuestos orgánicos identificados y caracterizados de origen vegetal. Finalmente, los tiempos prolongados que se deben de tener para controlar enfermedades como diabetes, hipertensión arterial, dislipidemias, obesidad y algunas enfermedades cardiovasculares, permitirá el uso de los alimentos funcionales como una alternativa para nuestro país. La caracterización *in vitro* de actividades antiproliferativas, citotóxicas, antioxidantes y antimicrobianas puede realizarse con diferentes modelos experimentales que incluyen el cultivo celular, inmunodetección de marcadores, citometría de flujo, evaluación de especies reactivas, y ensayos de citotoxicidad sobre células eucariotas o procariotas.

1.1. Respuestas celulares básicas

Los diferentes tejidos que constituyen a los organismos multicelulares se encuentran en un proceso de continua adaptación a los diferentes estímulos que reciben. La señalización que perciben y su integración favorecen respuestas celulares básicas, destacan entre ellas la proliferación celular, la diferenciación y la muerte celular (Figura 1). El descontrol de dichas respuestas se relaciona a su vez con el desarrollo de enfermedades como el cáncer, enfermedades crónicas degenerativas o inflamatorias, en las cuales las Especies Reactivas de

Oxígeno (EROs) forman parte de los mecanismos que participan en su origen o desencadenan efectos adversos secundarios (Parker, 2009; Posner, 2010). El conocimiento de las moléculas participantes en estos procesos ha sido amplio, lo que permite proponer diversos blancos terapéuticos, particularmente sobre proteínas que tienen relevancia en los procesos anteriormente mencionados (Altman, 2006).

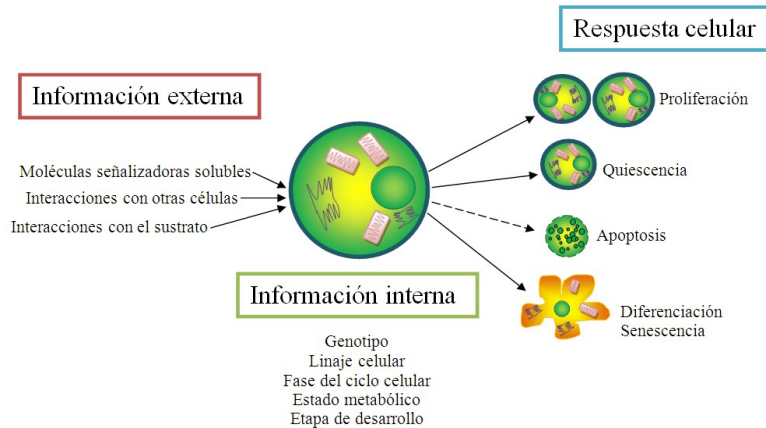


Figura 1. Respuestas celulares. Cada célula de nuestros tejidos recibe una diversidad de estímulos extra-celulares (factores solubles, interacciones celulares, información del sustrato extra-celular), esta información se traduce por moléculas receptoras que de acuerdo a la información intracelular generada se integra una respuesta adecuada a las necesidades celulares. Estas respuestas básicas pueden ser proliferación, mantenerse en estado de reposo (quiescencia), muerte celular o diferenciación. Cada una de estas respuestas es factible que pueda ser modulada por fármacos (Altman, 2006)

En lo que respecta a las moléculas que regulan la proliferación se incluyen enzimas que participan en la síntesis de los nucleótidos, las actividades relacionadas con la síntesis de Ácido Desoxirribonucleico (ADN), las moléculas reguladoras de los puntos de control en la progresión del ciclo celular y el proceso de división celular relacionado con el funcionamiento del uso mitótico. Los efectos citotóxicos se relacionan con daño a procesos vitales que desencadenan la activación de vías que llevan a la muerte celular (apoptosis, necrosis, autofagia, piroptosis) (Fink & Cookson, 2005). Durante este proceso participan proteasas, cinasas y fosfatasa que regulan los diferentes pasos de estas vías. En lo que respecta a los eventos antioxidantes se relacionan con la capacidad de evitar los daños generados por las EROs (ión superóxido, peróxido e hidroxilo), o por regulación de las actividades que controlan su concentración (Superóxido dismutasa, peroxidasa, catalasa). Las actividades farmacológicas descritas principalmente como agentes antiproliferativos están relacionadas principalmente para inhibir la síntesis de nucleótidos, del ADN, evitar la división celular, e inhibir a las topoisomerasas. Lo cual permite identificar dos procesos en donde se impacta que es la replicación del ADN y la división celular. Estos dos eventos pueden ser fácilmente identificables por citometría de flujo o por la determinación de la viabilidad celular. La evaluación *in vitro* del estrés oxidativo se lleva a cabo por la detección de las EROs a través de métodos colorimétricos o fluorimétricos. Por otra parte, la determinación del efecto citotóxico se relaciona con la capacidad de determinar la viabilidad

por conteo colorimétrico o fluorimétrico. Finalmente, para la evaluación de los procesos de diferenciación es necesario contar con condiciones que permitan el crecimiento *in vitro* de células precursoras y determinar el impacto positivo o negativo sobre la diferenciación terminal de un fenotipo particular. Cuando interesa tener conocimiento de los mecanismos que participan en los procesos es posible la detección de biomarcadores de las condiciones analizadas, empleando para ello la inmunocitoquímica o la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La relevancia de establecer la caracterización de péptidos bioactivos obtiene soporte al proponerlos como reguladores de enzimas relevantes en los diferentes procesos mencionados, destacan: proteasas, cinasas, fosfatasas (efecto citotóxico); polimerasas, topoisomerasas, ensamblaje del uso mitótico (acciones antiproliferativas); y oxidasas, reductasas (actividades antioxidantes). De esta manera existe un alto potencial para identificar nuevas actividades relevantes para revertir patologías o sus complicaciones, como: cáncer, inflamación, diabetes, hipertensión. Así, el aislamiento, identificación, caracterización de nuevas sustancias bioactivas requiere la formación de grupos multidisciplinarios que aborden de manera integral el desarrollo de nuevos fármacos, lo que permitirá establecer los mecanismos de acción de los compuestos bioactivos, fortaleciendo así su mejor aplicación para la solución de la problemática en salud de nuestros tiempos.

1.2. Ensayos biológicos para identificar y caracterizar péptidos bioactivos

Existen diferentes modelos biológicos que se pueden emplear como bioensayos. De manera general podemos identificar los modelos *in vivo* e *in vitro*.

Pruebas *in vivo*: Durante muchos años se han usado especies animales como modelos vivos, para la evaluación de riesgo tóxico, particularmente para la caracterización de los nuevos fármacos desarrollados por la industria farmacéutica que se incorporarán a la práctica clínica. El uso de animales en las pruebas preclínicas, está obligado para realizar la evaluación de riesgo toxicológico antes de ser autorizado un ensayo clínico por las autoridades pertenecientes de los Comités específicos de bioética. Existen además diferentes modelos que permiten analizar los efectos antihipertensivos e hipoglucemiantes (véase capítulo 7 de este libro sobre bioensayos *in vivo*). Por otra parte, se han desarrollado modelos animales que recrean diferentes enfermedades entre las que destaca cáncer y enfermedades crónicas. Finalmente, la manipulación genética y celular de animales de experimentación permiten generar modelos de diferentes enfermedades relacionadas con mutaciones particulares, lo que es interesante para revertir o impedir las complicaciones de enfermedades complejas. Estas opciones de modelos no serán atendidos en este capítulo.

Pruebas *in vitro*: Las diferentes metodologías que permiten la evaluación de fármacos en cultivos celulares han tenido un amplio desarrollo en las ciencias médicas, siendo un sistema efectivo para la evaluación de la toxicidad de rutina de muchos compuestos y elemento valioso para determinar el impacto en efectos sobre la proliferación celular, citotoxicidad y efectos antioxidantes. Si bien es cierto que todavía el uso de animales es aún imprescindible para algunos tipos de experimentación en el área de las ciencias de la salud, particularmente los efectos de toxicidad crónica, hay muchas situaciones en las que la metodología *in vitro* pueden sustituir eficientemente los estudios *in vivo*. Se han realizado trabajos de validación que han demostrado que existe una alta correlación entre los ensayos de toxicidad *in vitro* e *in vivo* (Organización Panamericana de la Salud, 2005). Por otra parte, el estudio de poblaciones

celulares diferenciadas terminalmente permite hacer estudios sobre fenotipos particulares y establece el primer acercamiento hacia efectos selectivos. Estas pruebas son relativamente simples, rápidas y de bajo costo, proporcionando una evaluación valiosa sobre las sustancias que deberían ser descartadas o sujetas a caracterización posterior. De esta manera el aislamiento, propagación y caracterización de poblaciones celulares se destaca como la principal metodología para iniciar la caracterización *in vitro* de compuestos bioactivos.

1.3. Historia de los cultivos celulares

En 1878, Claude Bernard demostró que el medio interno, a pesar de ser producto del metabolismo celular, regulaba la actividad de los propios tejidos. Además, que para estudiar las células era necesario aislarlas en sistemas artificiales sin la influencia del organismo. Uno de los primeros pasos en este sentido fue dado por von Recklinghausen que en 1886, logró mantener glóbulos de anfibios por más de un mes bajo diferentes condiciones en recipientes esterilizados (Freshney, 2011). En 1885, Wilhelm Roux, aisló a través de una técnica microquirúrgica la placa neural de embrión de pollo, observó la formación de tubo neural, precursor del sistema nervioso central, estos resultados fueron considerados como el primero explante *in vitro*. En 1898, Ljunggren mantuvo *in vitro*, por varias semanas, explantes de piel humana inmersos en líquido de ascitis (Freshney, 2011). En 1903, Jolly hizo las primeras observaciones detalladas sobre la supervivencia y la división celular *in vitro* logrando mantener, por 30 días, leucocitos de salamandra. Ross Harrison, describió la diferenciación de células de trozos de tubo neural de rana, en gota de linfa de rana, mostró que la función normal continuaba *in vitro*, marcando así el verdadero inicio del cultivo celular. M. Burrows usó las técnicas de cultivo de tejidos de anfibios para los tejidos de animales homeotermos, descubriendo la importancia del plasma sanguíneo como medio de cultivo. Alexis Carrel, Premio Nobel en Cirugía Experimental, fue uno de los responsables del desarrollo de los métodos de cultivo celular, gran conocedor de las técnicas de asepsia, usó técnicas quirúrgicas en su trabajo. Con una técnica innovadora, le permitió mantener una línea celular de tejido conectivo de pollo activa por 34 años (Freshney, 2011).

La perfección de los actuales métodos de cultivo celular fue desarrollada, en gran parte, por el grupo del National Cancer Institute de los EUA, liderado por Wilton Earle, quien fue el primero en mantener células en multiplicación sobre vidrio, siendo el primero en mantener células en suspensión. En 1911-1912, se inició el desarrollo de cultivo de células animales con los estudios realizados por Warren & Lewis. Otros estudios fueron realizados para la optimización de los cultivos de tejidos, tales como los componentes del medio de cultivo necesarios para el desarrollo y crecimiento de las células (Dulbecco & Vogt, 1954; Eagle, 1955; Eagle, 1959; Eagle, 1960; Fischer, Puck & Sato, 1958; Hanks, 1948; Parker, 1961). De estas investigaciones se generó la variada gama de medios de cultivo disponibles en la actualidad, en donde inclusive actualmente se tienen condiciones libres de suero, siendo estas las condiciones más valiosas para los ensayos farmacológicos. La idea del cultivo de células vegetales fue alcanzada por Haberlandt en 1902, pero los primeros intentos con éxito fueron realizados en 1921 por Molliard y por Kotte y Robbins, al lograr mantener raíces de vegetales vivas durante algunas semanas (Freshney, 2011). Varios tipos de células animales, tanto de embriones como de adultos, han sido cultivados *in vitro* por períodos variables de tiempo, posibilitando su estudio sobre varias condiciones.

Entre los años cuarentas y los setentas los cultivos celulares pasaron a tener un importante papel en el aislamiento y estudio de los virus. Esto presentó un amplio soporte cuando Enders, Weller & Robbins en 1948, mostraron que el virus de la poliomielitis, tipo 2, podría replicarse en cultivo de tejidos de origen no nervioso de embriones humanos, determinando un efecto citopatogénico fácilmente observable en cultivos infectados. Asimismo, podría ser bloqueado por el uso de un suero-inmune específico (Freshney, 2011). Actualmente, las neoplasias malignas, o cáncer, representan un conjunto de enfermedades responsables de siete millones de muertes anuales en todo el mundo. La comprensión de los mecanismos básicos involucrados en el crecimiento tumoral es fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, especialmente para las formas más avanzadas de la enfermedad para las cuales las opciones actuales han mostrado impacto limitado en su eficiencia terapéutica. A pesar de que el cáncer generalmente se deriva de una clona, el proceso de proliferación, diferenciación y transformación tumoral promueve considerable diversidad genética entre las células neoplásicas en crecimiento. Estas células son sometidas a innumerables mecanismos de presión selectiva, incluyendo la hipoxia por vascularización inadecuada y, probablemente, el ataque por el sistema inmune. La secuencia de eventos, desde la primera célula alterada hasta la metástasis, involucra una serie de interacciones entre la célula tumoral y células inmunes, estromales, endoteliales y macrófagos que están involucradas en procesos diversos cuanto la angiogénesis, invasión y evasión inmune. Recientemente, la comprensión sobre la relación entre inmunidad en neoplasias avanzó a partir de nuevas herramientas para los estudios experimentales, y abre un área de atención que es la inmunomodulación.

Las técnicas de cultivo celular se han perfeccionado, actualmente permitiendo el cultivo de tejidos, órganos e inclusive embriones en desarrollo, los sistemas de cultivo celular son ampliamente usados, ya que:

- Constituyen un sistema económico
- Son relativamente fáciles de mantener
- Necesitan de poco espacio físico
- Permiten aislar virus, preparar antígenos virales y realizar pruebas de neutralización
- Son convenientes para la producción de vacunas, pues proporcionan preparaciones con elevadas concentraciones virales, relativamente libres de materiales extraños
- Permiten aislar gran número de virus que anteriormente era imposible aislar y/o cultivarlos
- Incrementan la complejidad de los estudios o estrategias experimentales sobre la biología molecular de las respuestas celulares básicas.

Los resultados en este proceso son de grande interés biológico, citológico, fisiológico, bioquímico, farmacológico, patológico, genético, etc, y su importancia aumenta cada día. El uso de los cultivos celulares con fines experimentales ha sido posible gracias a la creación de bancos de células que es posible mantener congeladas en nitrógeno líquido (-190°C), almacenando así una gran diversidad de líneas celulares a disposición de la comunidad científica mundial. Dichas poblaciones celulares pueden verse favorecidas en su estudio por varios tipos de técnicas de cultivo celulares que se han descrito.

1.4. Técnicas de cultivo celular

Los organismos multicelulares se originan del óvulo fecundado, a partir del cual las células, por procesos de diferenciación, originan tejidos y órganos que ejecutan diferentes funciones específicas. Estos diferentes tipos de células pueden ser identificados por características morfológicas en el organismo entero, sin embargo, cuando se realiza cultivo celular de esas poblaciones estas diferencias generalmente desaparecen (Bird & Forrester, 1981), lo que se conoce como cultivos primarios de células dispersas los cuales se pueden generar de prácticamente cualquier tejido. Los diferentes tipos de cultivos celulares se encuentran descritos en la Tabla 1.

Tipos	Origen
Cultivo primario	Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado de un órgano de un animal recién sacrificado o de muestras de biopsia o procedimientos quirúrgicos.
Líneas celulares	Cuando cultivos primarios son sometidos a procesos de transformación, que les confieren capacidad ilimitada de multiplicación. Particularmente, se realiza una selección clonal para su establecimiento.
Cultivos Secundarios	Cuando de un cultivo primario se obtiene una población proliferante que es posible propagar <i>in vitro</i> por pases adicionales. Por lo regular es heterogéneo.
Cocultivos	Cuando en el cultivo coexisten dos tipos de células de linajes diferentes.

Tabla 1. Tipos de Cultivos Celulares

Entre las varias técnicas de cultivo celular existentes las más usadas son:

- Cultivo en monocapa
- Cultivo en suspensión
- Cultivo en suspensión de células adheridas a partículas (microcargadores) (Figura 2).

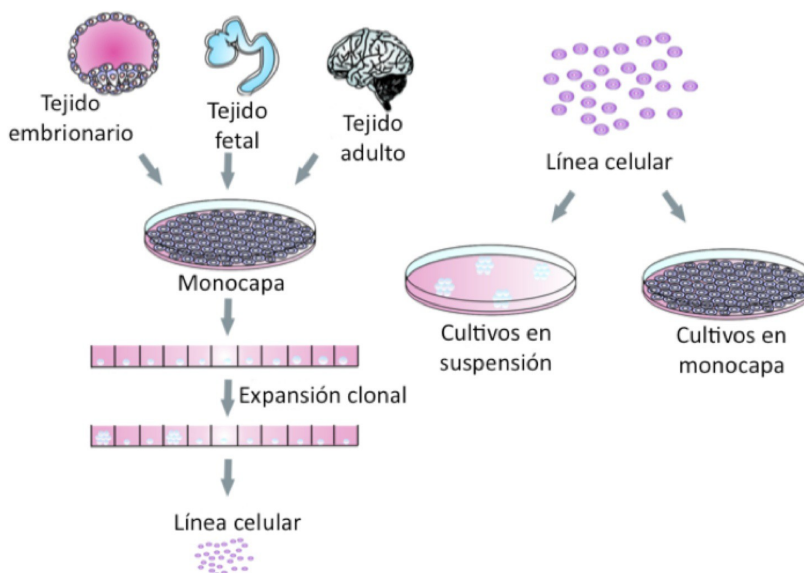


Figura 2. Tipos de cultivos celulares. Es posible a partir de tejidos embrionarios, fetales o del adulto aislar células de cualquier tejido. Bajo condiciones adecuadas de crecimiento es posible que in vitro se induzca su proliferación o diferenciación. Dichas poblaciones celulares pueden ser empleadas para analizar las diferentes respuestas celulares básicas, evaluar así factores que pueden ser empleados para identificar nuevos compuestos con acción selectiva sobre estirpes celulares específicas, estos cultivos se les denomina primarios. Bajo condiciones especiales se puede inducir la transformación de algunas células, se pueden propagar de manera clonal y establecer con ello una línea celular, la cual guarda las características del tejido de origen. Contar con poblaciones homogéneas es clave para realizar estudios Bioquímicos. Las líneas a su vez pueden ser propagadas de manera indefinida en monocapa o en suspensión

Cultivos en monocapa

La propagación *in vitro* de las células permite la formación de una monocapa que cubrirá la superficie de crecimiento hasta llegar a confluencia (es decir cubrir totalmente la caja) lo que hace que su proliferación sea inhibida cuando establecen contacto entre sí. Las células provenientes de cultivos primarios son las que mejor crecen en ésta condición, dada su estabilidad genética y su naturaleza diploide. Estos tipos de cultivos son estacionarios y pueden crecer en cajas de Petri, frascos para el cultivo de tejido tipo Roux, entre otros, que pueden ser de material de plástico o de vidrio previamente tratados. El desprendimiento para transferirlas a superficies mayores se realizan con agentes proteolíticos como la tripsina, dispasa o colagenasa.

Cultivos en suspensión

Las células provenientes de cultivos primarios se adhieren a superficies eficientemente, pero tienen la propiedad de mantenerse en una fase estacionaria cuando llegan a confluencia o cuando son fenotipos terminales. Es posible crecerlas en suspensión, después de un período de adaptación es posible que proliferen. El cultivo en suspensión es deseable cuando los productos que se pretende caracterizar o aislar son intracelulares o cuando se presentan problemas con la capacidad de adhesión de algunas células. Este tipo de cultivo permite una reducida manipulación cuando se trata de producir cultivos a una mayor escala de operación.

Cultivo en suspensión de células adheridas a microcargadores

Para este tipo de técnica se requiere de una combinación de moléculas cargadas positivamente y un factor de adherencia celular los cuales deben estar enlazados a la superficie de un soporte para su cultivo en un biorreactor, lo que permite mejorar la adhesión celular y estabilizar el crecimiento de las células. En la Tabla 2 se encuentran descritas las ventajas y desventajas de los cultivos celulares.

Ventajas	Desventajas
Control fisicoquímico: pH, temperatura, presión osmótica, tensión de oxígeno y gas carbónico para las células cultivadas y, las condiciones fisiológicas que deben ser constantes.	Las técnicas de cultivo celular necesitan una estricta condición de asepsia, pues estas células crecen con menor velocidad cuando se comparan con la mayoría de los contaminantes biológicos como las bacterias, los mohos y las levaduras.
Para el desarrollo de la mayoría de las líneas celulares se requiere la adición al medio de hormonas y otras sustancias reguladoras (Borg, Spitz, Hamel & Mark, 1985).	Las células procedentes de organismos multicelulares no pueden desarrollarse en medios de cultivo sin suplementos (Stoklosowa, Leško, Kusina & Galas, 1995).
Los cultivos de células permiten el uso de una baja y definida concentración de reactivos.	Los costos de propagar células eucariotas en cultivo son mayores que el uso de tejido animal, ya que se invierte bastante en ensayos o procedimientos preparativos que pueden ayudar en la estandarización del proceso (Brand, 1997).
Aunque los estudios <i>in vivo</i> resulten más económicos que los <i>in vitro</i> , el uso de la experimentación en animales resulta cuestionada por aspectos legales, morales y éticos (Stoklosowa et al., 1995).	En los cultivos celulares se dificulta correlacionar las características funcionales de las células ubicadas en el tejido del cual son derivadas, pues en la mayoría de los casos presentan propiedades muy diferentes; se necesita la utilización de marcadores celulares para la caracterización en cultivo y garantizar que las células aisladas y propagadas en cultivo son las mismas que se sembraron (Driscoll, Steinkampf, Paradiso, Kowal & Klohs, 1996).

Tabla 2. Ventajas y desventajas del cultivo celular

Uso de los cultivos celulares: Los cultivos celulares son utilizados en un gran número de ensayos:

- Para el estudio de células de tejidos específicos, conocer cómo crecen, qué necesitan para su crecimiento, cómo y cuando dejan de crecer.
- Para investigaciones sobre el ciclo celular, el control del crecimiento de células tumorales y la modulación de la expresión genética.
- Para los estudios de la biología del desarrollo y la diferenciación celular.
- Para la inserción de genes extraños en las células receptoras (animales transgénicos).
- Para la tecnología de la fusión celular y los ensayos de citotoxicidad son técnicas de cultivo celular.

2. Ciclo Celular

2.1. Fases del ciclo celular

La división celular generalmente comienza con la duplicación del contenido celular y posteriormente con la distribución del contenido celular en las dos células hijas. La duplicación de los cromosomas se produce durante **la fase S** del ciclo celular, mientras que la mayoría de otros componentes celulares se sintetizan continuamente durante todo el ciclo. Durante **la fase M**, los cromosomas que se replican son segregados en los núcleos individuales (**mitosis**), y después la célula se divide en dos (**citocinesis**). Las fases S y M, están separadas por periodos de tiempo llamados **G1 y G2**, cada una de las etapas se regulan por señales intracelulares y extra-celulares que son necesarias para la progresión del ciclo celular (ver figura 3). Durante la evolución se han conservado de manera importante tanto la organización del ciclo celular como su control. Como lo reflejan, los estudios de una amplia gama de sistemas celulares que han dado lugar a una visión unificada del control del ciclo celular eucarionte (Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts & Walter, 2008).

La función básica del ciclo celular es duplicar con alta precisión el ADN contenido en los cromosomas y luego separar las copias en dos células hijas genéticamente idénticas. Estos procesos definen las dos fases principales del ciclo celular, la fase S y la fase M. La duplicación de los cromosomas se realiza durante la fase S (**S por síntesis**), evento que requiere de aproximadamente entre 10-12 horas y ocupa la mitad del tiempo del ciclo celular en una célula típica de mamífero. Posterior a la fase S, tanto la segregación cromosómica como la división celular se producen en mucho menor tiempo (menos de una hora en células de mamífero) y se denomina fase M (**M de mitosis**).

La mayoría de las células requieren mucho más tiempo para crecer, duplicar su masa de proteínas y sus organelos que el que se requiere para duplicar sus cromosomas y por lo tanto dividirse. Una estrategia que la mayoría de las células presentan para regular el tiempo de crecimiento es implementar **fases intermedias**. La **fase G1**, que se observa entre la **fase M** y la **fase S**; y la **fase G2** que se encuentra entre la **fase S** y la **mitosis** se denominan **fases intermedias**. Es decir, el ciclo celular eucarionte se divide tradicionalmente en cuatro fases secuenciales: **G1, S, G2 y M** (Figura 3). Por ejemplo, en cultivos de células humanas que se encuentran en proliferación, la interfase puede ocupar hasta 23 horas durante todo el ciclo celular, dejando una

hora para la fase M. Las dos fases intermedias representan retrasos de tiempo para permitir el crecimiento celular. Estas interfases también proveen tiempo para que la célula realice el monitoreo tanto del ambiente interno como el externo, y de ese modo, se garanticen las condiciones adecuadas para los preparativos metabólicos necesarios antes de que la célula se vea comprometida a realizar las fases S y mitosis.

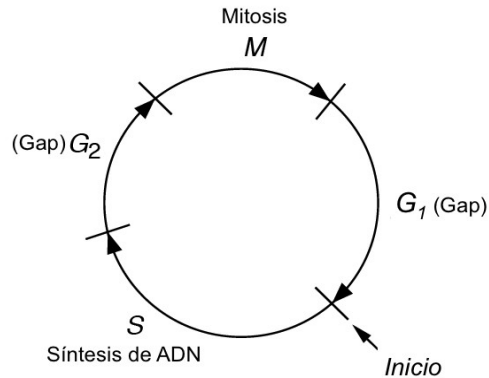


Figura 3. Representación esquemática de las etapas del ciclo celular. El ciclo celular está constituido por 4 etapas G₁ en donde la célula de acuerdo a la concentración de nutrientes y factores tróficos establece el compromiso de dividirse, lo cual le permite pasar por el punto de restricción o inicio; S, periodo de tiempo en el cual la célula replica su información genética; G₂ periodo en donde se verifica que el ADN no presente errores, se cuente con el crecimiento suficiente y se prepare para la división celular; y M, etapa final en donde se realiza la segregación de las cromátidas hermanas y se realiza la citocinesis o división celular. Pasando nuevamente a la etapa de G₁, que de mantenerse las condiciones mantiene las condiciones de proliferación

2.2. Reguladores del ciclo celular

Algunas de las características del ciclo celular, incluyendo el tiempo requerido para completar ciertos eventos, varían mucho de un tipo de célula a otro, inclusive en el mismo organismo. Sin embargo, la organización básica del ciclo es esencialmente la misma en todas las células eucariontes, de tal forma, que parecen utilizar una maquinaria con mecanismos de control similares para accionar y regular la mayoría de los eventos en el ciclo celular. Sorprendentemente, las proteínas del sistema de control del ciclo celular presentan un alto grado de conservación a lo largo de la evolución, por ejemplo, cuando se transfiere la maquinaria de una célula humana a una célula de levadura, esta última funciona a la perfección. Estos hallazgos sugieren que se puede estudiar el ciclo celular y su regulación en una variedad de organismos y utilizar los resultados de todos ellos para mostrar una imagen unificada de cómo se dividen las células eucariontes. (Ver figura 4).

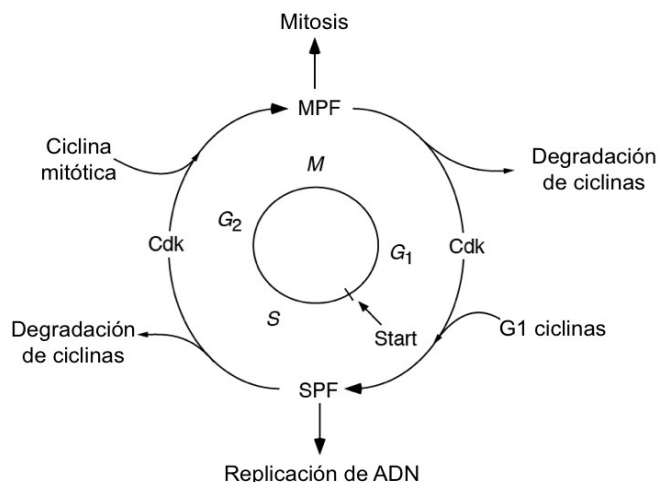


Figura 4. Diagrama representativo de los principales puntos de control del ciclo celular. El ciclo celular es controlado de manera muy precisa, existe una maquinaria que permite ir verificando en cada fase la progresión adecuada. El dispositivo de regulación es una cinasa dependiente de ciclinas. Existen dos tipos de ciclinas, las ciclinas de G1 y las ciclinas de Mitosis, reciben el nombre de la etapa en la cual son más activas. Las ciclinas son degradadas para inactivar el complejo. Cdk, Cinasa dependiente de ciclina; SPF Factor promotor de la síntesis de ADN; MPF, Factor promotor de la mitosis

Fase S

Los cromosomas lineales de células eucariontes forman grandes complejos de ADN y proteínas, por lo que el proceso de duplicación es dinámico. No sólo la extensa molécula de ADN de cada cromosoma se debe duplicar con alta precisión, sino que también las proteínas que empaquetan y rodean cada región de ADN deben ser reproducidas, asegurando que las células hijas hereden todas las características de la estructura del cromosoma de la célula parental. El evento central de la duplicación de un cromosoma es la replicación del ADN. Una célula debe resolver dos problemas al iniciar y completar la replicación del ADN. En primer lugar, la replicación debe ser con extrema precisión para minimizar el riesgo de mutaciones en la generación de la siguiente célula. En segundo lugar, cada nucleótido en el genoma debe copiarse estrictamente sólo una vez, para así evitar los efectos perjudiciales de la amplificación de genes. La replicación del ADN inicia en los orígenes de replicación dispersos en numerosos sitios en cada cromosoma (Alberts et al., 2008).

Durante la fase S, la iniciación de la replicación del ADN se produce en estos orígenes cuando proteínas especializadas (proteínas iniciadoras) separan la doble hélice en el origen para dar lugar a que enzimas de replicación se unan al ADN de cadena sencilla. Esto conduce a la fase de elongación de la replicación, cuando la maquinaria de replicación se mueve hacia fuera del origen en las horquillas de replicación.

Para asegurar que la duplicación cromosómica ocurre sólo una vez por ciclo celular, la fase de iniciación de la replicación del ADN se divide en dos pasos distintos que se producen en diferentes momentos en el ciclo celular. El primer paso se da en mitosis tardía y G1 temprana,

cuando el complejo de proteínas iniciadoras, llamado el complejo pre-replicativo o pre-RC, se ensambla en los orígenes de replicación. El segundo paso se produce al inicio de la fase S, cuando los componentes de la pre-RC se congregan para formar un complejo de proteínas más grande, llamado el complejo de pre-iniciación. Este complejo, entonces separa la hélice de ADN y permite que la ADN polimerasa y otras enzimas de replicación interactúen sobre las hebras del ADN, lo que da inicio la síntesis de ADN. Una vez que el origen de replicación se ha activado, el pre-RC se desmantela y no puede ser vuelto a ensamblar, hasta la siguiente etapa de G1. Como resultado los orígenes de replicación sólo se activan una vez por cada ciclo celular.

Mitosis

La mitosis es un proceso que resulta en la división de conjuntos duplicados de cromosomas y dos células hijas genéticamente idénticas. Desde un punto de vista de regulación la mitosis puede ser vista en dos eventos principales gobernadas por elementos diferentes de la regulación en el ciclo celular. El primer evento consiste en un incremento considerable de proteínas cinasas en la interfase G2/M. La segunda parte comienza en la transición de la metafase hacia la anafase, cuando el complejo promotor de la anafase (APC del inglés Anaphase Promoting Complex) activa la degradación de las securinas que liberan una proteasa que rompe las cohesinas e inicia la separación de las cromátidas hermanas. El APC también activa la degradación de las ciclinas lo cual permite la inactivación de Cdks y la defosforilación de los Cdks que son necesarios para todos los eventos de fase M tardía, inclusive la culminación de la anafase, el desensamble de huso mitótico y la división de la célula mediante la citocinesis (Alberts et al., 2008).

Citocinesis

El paso final del ciclo celular es la citocinesis, que se refiere a la división del citoplasma. En una célula típica la citocinesis acompaña cada proceso de mitosis, aunque en algunas células tales como las células de la placenta y las células del músculo, el proceso de mitosis se realiza sin citocinesis y por lo tanto adquieren múltiples núcleos. En muchas células animales, el proceso de citocinesis comienza en la anafase y termina poco después de que se completa la mitosis en telofase (Alberts et al., 2008).

El primer cambio visible de citocinesis en células animales es la repentina aparición de un pliegue denominado **surco de división** sobre la superficie de la célula. El surco rápidamente se profundiza y se dispersa alrededor de la célula hasta que se divide completamente en dos. La estructura que subyace a este proceso es el **anillo contráctil**. El anillo contráctil es un complejo dinámico compuesto de filamentos de actina, filamentos de miosina II y proteínas estructurales y reguladoras. Posteriormente el anillo se contrae gradualmente e inserta nuevas membranas adyacentes al anillo. Esta adición de membrana compensa el incremento del área de superficie que acompaña la división citoplasmática. Cuando la contracción del anillo se completa, la inserción y la fusión de la membrana sella la interfase entre las células hijas. En resumen, se puede considerar que la citocinesis se realiza en cuatro etapas principalmente; i) iniciación, ii) contracción, iii) inserción de membrana y iv) terminación.

2.3. Blancos potenciales de péptidos bioactivos con efectos antiproliferativos

Los péptidos bioactivos se definen como proteínas (que se sintetizan de manera natural o son producto de modificaciones enzimáticas) que presentan un impacto positivo o negativo en las funciones celulares, es decir modulan la fisiología celular a través de interacciones a receptores específicos en células blanco (Madureira, Tavares, Gomes, Pintado & Malcata, 2010). Desde el punto de vista de sus propiedades funcionales, los péptidos bioactivos se clasifican en: antiproliferativos, antimicrobianos, antitrombóticos, antihipertensivos, opioides, inmunomoduladores y antioxidantes (Ratajczak, Kim, Abdel-Latif, Schneider, Kucia, Morris et al., 2012). Estos péptidos juegan un papel importante en la salud humana y su estudio resulta relevante. Así lo revela el desarrollo y disponibilidad de bases de datos con información biológica de diversas fuentes a gran escala (PIR, <http://pir.georgetown.edu/>; GeneBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; Swiss-Prot, <http://www.ebi.ac.uk/uniprot/>; y SMS, <http://cluster.physics.iisc.ernet.in/sms/>) (Ravella, Kumar, Sherlin, Shankar, Vaishnavi, & Sekar, 2012; The UniProt Consortium, 2013) que han puesto de manifiesto la importancia de estas moléculas, las cuales en su gran mayoría aún no se ha asociado una función específica, por lo que es importante su caracterización tanto *in vivo* como *in vitro* para un mayor entendimiento de sus propiedades (Silano & De Vincenzi, 1999). Conocer los mecanismos regulatorios intrínsecos de los procesos celulares permite proponer posibles moléculas blanco para los efectos observados por péptidos bioactivos.

2.4. Puntos de Control del ciclo celular

Muchas de las proteínas y complejos relacionados con el control del ciclo celular son blanco de péptidos bioactivos. A continuación se aborda brevemente algunos puntos de control y papel de sus complejos proteicos que sobresalen como actores principales. El sistema de control del ciclo celular desencadena los eventos del ciclo celular y se asegura de que estos eventos se coordinen correctamente y se realicen en el orden correcto. El sistema de control responde a distintas señales intracelulares y extra-celulares, detiene el ciclo celular, ya sea cuando se detecta una falla en el ambiente intracelular para completar un proceso esencial del ciclo celular o la célula encuentra condiciones extra-celulares desfavorables, una vez que son cubiertos los requerimientos se prosigue su avance (Alberts et al., 2008).

Los componentes centrales del sistema de control del ciclo celular son las proteínas cinasas acopladas a ciclinas (Cdks del inglés Cyclin Dependent Kinase). Las oscilaciones en las actividades de diversos complejos de ciclina-Cdk controlan los eventos del ciclo celular. De esta manera, la fase S se inicia con la activación de los complejos denominados fase S-ciclina-Cdk (S-Cdk), mientras los complejos denominados fase-M-ciclina-Cdk (M-Cdk) activan la mitosis. Los mecanismos que controlan la actividad de los complejos de ciclina-Cdk incluyen la fosforilación de la subunidad Cdk, evento que provoca la unión de proteínas inhibidoras de Cdk (CKIs), así como la proteólisis de las ciclinas, y cambios en la transcripción de genes que codifican para los reguladores de Cdk. El sistema de control del ciclo celular también depende específicamente de dos complejos enzimáticos adicionales, el APC y la ligasa de ubiquitina-SCF, las cuales catalizan la ubiquitinación para la posterior degradación de proteínas reguladoras que controlan eventos críticos en el ciclo celular.

Todos estos procesos se encuentran finamente regulados para dar lugar al tamaño de un órgano u organismo que depende principalmente de su masa celular total. Los órganos y el tamaño del cuerpo se encuentran determinados por tres procesos fundamentales: crecimiento celular, división celular y muerte celular. Cada uno de estos procesos está finamente regulado tanto por señales intracelulares como extra-celulares. Las moléculas que funcionan como señales extra-celulares que regulan el tamaño y número celular son generalmente de naturaleza soluble y secretables, aun que también hay componentes de la matriz extra-celular que también se encuentran presentes. Los efectores extra-celulares pueden dividirse en tres grupos principalmente: i) mitógenos o de proliferación, ii) factores de crecimiento y iii) factores de supervivencia. En el primer caso, estas proteínas estimulan la división celular, principalmente activando proteínas de la fase G1/S-Cdk que libera el control intracelular negativo, que de otra manera bloquearía el progreso hacia el ciclo celular. La estimulación del crecimiento celular (incremento de la masa celular) se promueve por la síntesis de proteínas y otras macromoléculas, así como por la inhibición de su degradación, caracterizan el segundo caso; mientras que el tercer grupo se caracteriza por promover la supervivencia celular suprimiendo la muerte celular programada o apoptosis (Figura 4).

En animales multicelulares, el tamaño, la división y la muerte celular son celosamente controlados para asegurar que el organismo y sus órganos logren y mantengan un tamaño apropiado. En las células eucariontes el sistema de control del ciclo celular desencadena la progresión del ciclo celular en tres puntos de control principales. El primero de ellos es el de inicio (o el punto de restricción) en G1 tardío, en él se establece el compromiso para entrar al ciclo celular dar inicio a la duplicación de la información genética, como se mencionó anteriormente. El segundo es el punto de control de G2/M, donde el sistema activa los eventos tempranos mitóticos que conducen a la alineación de los cromosomas en la región ecuatorial del huso mitótico en la metafase. El tercero es la transición de metafase a anafase, donde el sistema de control estimula la separación de las cromátidas hermanas para su migración a los polos, lo que lleva a la realización de la mitosis y citocinesis. El sistema de control funciona en bloques, de esta manera la progresión a través de cada uno de estos puntos de control sirve para detectar problemas en el interior o fuera de la célula. Si el sistema de control detecta problemas en la terminación de la replicación del ADN, se mantiene a la célula en el punto de control G2/M hasta que esos problemas se resuelven. Del mismo modo, si las condiciones extra-celulares no son apropiadas para la proliferación celular, el sistema de control bloquea la progresión desde el inicio, lo que impide la división celular hasta que las condiciones sean favorables.

Muchos descubrimientos importantes sobre el control del ciclo celular y el efecto de moléculas bioactivas incluyendo los péptidos, se han puesto de manifiesto por la búsqueda sistemática de mutaciones (al principio en levaduras y posteriormente en células en cultivo) que inactiven los genes que codifican para los componentes esenciales del sistema de control del ciclo celular. Específicamente, los genes afectados por algunas de estas mutaciones o por la acción de compuestos bioactivos se conocen como genes relacionados al ciclo de división celular, o genes CDC del inglés "Cell Division Cycle". Muchas de las mutaciones en los genes CDC provocan que las células se detengan en un punto específico en el ciclo celular, lo que sugiere que el producto del gen normal se requiere para proseguir el ciclo celular a la siguiente etapa. Una mutante que no puede completar el ciclo celular no se puede propagar. Por lo tanto, los mutantes CDC pueden ser seleccionadas y mantenidas sólo si su fenotipo es condicional. Un ejemplo de las mutaciones

condicionales del ciclo celular son las que manifiestan sensibilidad a la temperatura, de esta manera la proteína mutante no funciona a altas temperaturas, pero funciona lo suficientemente bien como para permitir que la célula se divida a bajas temperaturas. Una mutante sensible a la temperatura CDC se puede propagar a una temperatura baja (condición permisiva), para luego ser sometida a condiciones de temperatura elevada (condición restrictiva) para desactivar la función del gen mutante. Otro ejemplo que ilustra la actividad biológica de péptidos en el control celular es la geodiamolida H que se obtiene de la esponja brasileña *Geodia*. Este péptido con actividad antiproliferativa actúa a nivel de la alteración de la actina del citoesqueleto en células de cáncer de mama (Rangel, Prado, Konno, Naoki, Freitas & Machado-Santelli, 2006). Otro ejemplo, es la mollamida, este ciclodepsipéptido se obtiene de la ascidia *Didemnum molle*, y se ha demostrado su actividad antiproliferativa en líneas celulares tales como la P388 (línea celular de leucemia murina), la A549 (carcinoma de pulmón humano) y la HT29 (carcinoma de colon humano) (Donia, Wang, Dunbar, Desai, Patny, Avery et al., 2008).

Avances en el área de la genómica combinados con la biosíntesis podrían representar una estrategia para la producción de péptidos naturales de diferentes fuentes. Una alternativa atractiva la presentan los avances en el campo de la proteómica y la metabolómica donde sin lugar a dudas, se obtendrá un alto impacto en la identificación y producción de péptidos como agentes biológicos que afecten la actividad de proteínas o genes involucrados en el ciclo celular. Como se mencionó al inicio, identificar la secuencia de ADN o ARN o proteínas relacionadas y predecir su función como péptidos bioactivos, junto con su producción y aplicación como agentes terapéuticos representa un reto sin precedentes.

2.5. Bioensayos para el análisis de proliferación celular

La evaluación rápida y precisa del número de células viables y la proliferación celular es un requisito indispensable en muchas situaciones experimentales que implican tanto estudios *in vitro* como *in vivo*. Ejemplos de utilidad para la determinación del número de células son: el análisis de la actividad del factor de crecimiento, las pruebas de lotes de suero, la detección de drogas, y la determinación del potencial citostático de compuestos contra el cáncer en pruebas toxicológicas. En este tipo de estudios toxicológicos, técnicas de ensayo *in vitro* son muy útiles para evaluar los efectos citotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos de los compuestos químicos en las células humanas. (Evans, Madhunapantula, Robertson & Drabick, 2013).

Por lo general, uno de los dos parámetros que se usa para medir la salud de las células: es la viabilidad celular o la proliferación celular. En casi todos los casos, estos parámetros se miden por el ensayo de "funciones vitales" que son características de las células sanas.

La proliferación celular es la medida del número de células que se dividen en un cultivo. Una forma de medir este parámetro es mediante la realización de ensayos por clonación (Bayraktar & Rocha-Lima, 2012). En estos ensayos, un número definido de células se siembran en una matriz apropiada y el número de colonias que se forman después de un período de crecimiento se enumeran. Uno de los inconvenientes de este tipo de técnica son: que no es práctica para un gran número de muestras. Además, si las células se dividen solo unas pocas veces, y luego se convierten en quiescentes, las colonias pueden ser demasiado pequeñas para ser contadas y el número de células que se dividen pueden ser subestimadas.

Alternativamente, se puede establecer curvas de crecimiento, que tienen el inconveniente de requerir de mucho tiempo.

La cantidad de precursor marcado que se incorpora en el ADN se cuantifica al evaluar la cantidad de ADN total marcado en una población, o mediante la detección de los núcleos marcado microscópicamente. La incorporación del precursor marcado en el ADN es directamente proporcional a la cantidad de división celular que ocurre en el cultivo. La proliferación celular también puede medirse utilizando parámetros indirectos. En estas técnicas, se mide la actividad de las moléculas que regulan el ciclo celular (por ejemplo, ensayos de la actividad de cinasa presente en el complejo CDK) o mediante la cuantificación de sus cantidades (por ejemplo: Western blot, ELISA o inmunohistoquímica).

Los métodos para evaluar el proceso de proliferación celular incluyen la detección de antígenos de proliferación asociados por inmunohistoquímica, la cuantificación de la síntesis de ADN mediante la medición de timidina tritiada (3H-timidina), bromodesoxiuridina (BrdU), la captación de tinción de yoduro de propidio, la cuantificación de la reducción del ambiente intracelular mediante la sal de tetrazolio, la reducción del Alamar Blue y cuantificación de la concentración de ATP intracelular.

Incorporación de 3H-timidina

Históricamente, los investigadores han utilizado la incorporación de 3H-timidina como una medida de la proliferación celular. Este método requiere la incubación de las células con 3H-timidina durante 16-24 horas después del tratamiento con los compuestos o factores de crecimiento o la muestra de prueba. Durante esta incubación, la 3H-timidina se incorpora en el ADN recién sintetizado. La 3H-timidina incorporada se suele cuantificar mediante un contador de centelleo de las células marcadas colectadas por aspiración sobre filtros de membrana. Dado que sólo las células que proliferan incorporan 3H-timidina, este método es un indicador preciso de la síntesis de ADN y representa un estándar adecuado para medir la proliferación celular (Zolnai, Tóth, Wilson & Frenyó, 1998).

Incorporación bromodesoxiuridina

Así como la 3H-timidina, el 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) se incorpora al ADN que se sintetiza y proporciona una medida de la proliferación celular (deFazio, Leary, Hedley, & Tattersall, 1987). La incorporación de BrdU se detecta por un método indirecto, comúnmente con un anticuerpo específico anti BrdU conjugado a un sistema reportero tal como un fluorocromo o una enzima adecuada para el uso en inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, en ELISA de células y análisis de citometría de flujo (Holm, Thomsen, Høyer & Hokland, 1998). Como con 3H-timidina, el uso de BrdU requiere un procesamiento extenso de las muestras.

Tinción con yoduro de propidio

Este método se basa en el hecho de que el yoduro de propidio se une al ADN, entonces la cuantificación del contenido de ADN en las células son una medida de la proliferación celular. Las células se lisan mediante un ciclo de congelación-descongelación en presencia de yoduro de propidio 1%. Un lector de placa mide la intensidad de fluorescencia, la señal es directamente

proporcional al contenido de ADN en las muestras. Los valores de contenido de ADN mayor que los controles indican la proliferación mientras que los cultivos con valores por debajo del contenido de ADN indican valores de citotoxicidad (Grossman, Watson & Vinograd, 1974). Este ensayo tiene varias ventajas ya que puede ser utilizados tanto para las células en suspensión como una monocapa, que no requiere tratamiento excesivo de la muestra, es más barato y más rápido en comparación con los métodos que utilizan 3H-timidina y ensayos de incorporación de BrdU (Brown, Lim, Leonard, Lim, Chia, Verma et al., 2010).

Antígeno PCNA

El antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA del inglés Proliferating Cell Nuclear Antigen) se identificó originalmente por inmunofluorescencia como una proteína nuclear cuya presencia correlaciona con el estado de proliferación de la célula. El PCNA se localiza por hibridación *in situ* en el brazo corto del cromosoma 20 de humano, con un pico de granos sobre la banda 20p13. El gen que codifica para el PCNA está presente como una copia única y tiene 6 exones y presenta una longitud de 4,961 pb. El PCNA controla la cohesión de la cromátida hermana de durante la fase S (Hall, Levison, Woods, Yu, Kellock, Watkins, et al., 1990).

Antígeno Ki-67

La medición de la tasa de expresión del antígeno Ki-67 es uno de los métodos más usados para determinar el índice de proliferación, lo que permite correlacionar la tasa proliferativa tumoral con variables clínico-patológicas (Reuschenbach, Seiz, von Knebel-Doeberitz, Vinokurova, Duwe, Ridder et al., 2012). El anticuerpo monoclonal anti-Ki-67 detecta un antígeno nuclear humano que se expresa en células que se encuentran en las fases “activas” del ciclo celular, es decir, en las fases G2, S, M y en la parte ulterior al umbral mitogénico, no siendo detectable en la fase preumbral (fase G1c) o para algunos fase G0 o de reposo del ciclo (Schlüter, Duchrow, Wohlenberg, Becker, Key, Flad. et al., 1993). La naturaleza exacta de este antígeno nuclear se desconoce aunque se ha establecido similitud con ADN polimerasa. Este antígeno es codificado por un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q25). La expresión de Ki-67 se correlaciona con otros índices de proliferación celular, tales como la medición de la fracción S + G2M mediante citometría de flujo, e incorporación de timidina tritiada y bromodeoxiuridina (Duchrow, Schlüter, Key, Kubbutat, Wohlenberg, Flad et al., 1995). Este parece ser uno de los pocos marcadores de proliferación celular que se correlaciona con pronóstico y estadio del tumor. De este modo tenemos que altos índices de marcación con Ki-67 se correlacionan con mayor posibilidad de metástasis en tumores incipientes además de peor pronóstico en pacientes con tumores avanzados.

Citometría de flujo

La citometría de flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multiparámetro cuyo fundamento se basa en el flujo de una suspensión de partículas (generalmente células). Esta técnica mide la dispersión de la luz y fluorescencia que poseen las células cuando un haz de luz incide a través de ellas. La citometría de flujo permite la medida simultánea de múltiples características físicas de una sola célula, como por ejemplo el tamaño o la granularidad (Tenorio-Borroto, Peñuelas-Rivas, Vásquez-Chagoyán, Prado-Prado, García-Mera & González-Díaz, 2012) También se usan

anticuerpos que contienen moléculas fluorescentes acopladas. La fluorescencia que se emite al ser irradiadas a cierta longitud de onda, se detecta y de esta manera se pueden analizar poblaciones celulares diferentes (Van Craenenbroeck, Van Craenenbroeck, Van Ierssel, Bruyndonckx, Hoymans, Vrints. et al., 2012). Los parámetros que típicamente se miden de forma simultánea por cada célula son:

- Dispersión frontal de la luz (*forward scatter*), valor proporcional al tamaño celular.
- Dispersión de la luz ortogonal (*side scatter*), proporcional a la cantidad de estructuras granulares o complejidad de la célula.
- Intensidades de fluorescencia a diferentes longitudes de onda.

El equipo que realiza la evaluación de la fluorescencia se conoce como citofluorímetro de flujo. Estas medidas son realizadas mientras las células (partículas) pasan en fila, a una velocidad dada por segundo, a través del aparato de medida en una corriente de fluido (Wlodkowic, Skommer & Darzynkiewicz et al., 2012).

3. Evaluación de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad son técnicas de cultivo celular. La toxicidad en tejidos y células se define como una alteración de las funciones celulares básicas por efectos tóxicos de drogas y compuestos químicos. A través de estímulos las células pierden su equilibrio homeostático, que puede causar su adaptación o sufrir un proceso regresivo o morir (Figura 5). En los últimos años se están empezando a conocer los factores determinantes de la toxicidad en tejidos y células.

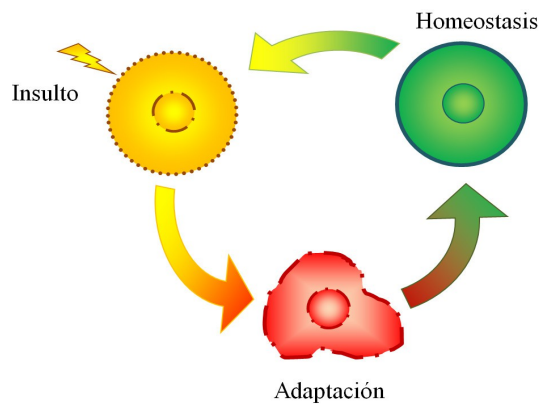


Figura 5. Esquema de la supervivencia celular. La célula recibe estímulos nocivos que de ser controlados se adapta, llevando a cabo diversos mecanismos metabólicos o tróficos que le pueden permitir regresar a su condición basal en un proceso homeostático

La supervivencia celular es dependiente de la capacidad del organismo en sustituir las células lesionadas o muertas o reparar los tejidos. A partir de un estímulo o lesión se ejercen respuestas celulares, que son adaptación, degeneración o muerte celular. La adaptación puede tener un carácter fisiológico si el estímulo agresor es moderado. Las adaptaciones patológicas pueden

tener mecanismos adaptativos propiciando que la célula module su medio ambiente y se adapte, escapando de las agresiones siendo definido como un cambio morfológico resultante de una lesión no mortal de la célula. Cuando la célula no se adapta, se observa un metabolismo reducido, consecuentemente su función también será disminuida, por lo tanto, en este caso se puede decir que la célula sufrió una alteración regresiva. Distintos agentes nocivos, al mismo tiempo que producen daños, ponen en marcha la reparación de los tejidos que comprende dos procesos: a) la regeneración o sustitución de las células lesionadas por otras de la misma clase y b) la sustitución del tejido conjuntivo llamada fibrosis, el cual lleva a una cicatriz permanente. Estos dos procesos básicamente de los mismos mecanismos que intervienen en la migración, la proliferación, la diferenciación celular y las interacciones célula-matriz. Para la supervivencia el organismo debe ser capaz de sustituir las células lesionadas o muertas y de reparar los tejidos. Diversos fenómenos sirven para reducir los daños y también para que las células lesionadas supervivientes se multipliquen lo suficiente para reemplazar las células muertas. La Figura 5 describe los procesos de insulto, adaptación y homeostasis.

Cuando las células presentan una respuesta aumentada en consecuencia de la alteración sufrida, se reconoce como una alteración progresiva, la cual puede ser de cinco tipos: hipertrofia, hiperplasia, regeneración, metaplasia y neoplasia. Las alteraciones degenerativas debidas a la disminución de la función celular son tres respuestas celulares básicas: a) alteraciones del balance hidro-electrolito o hidrópica; b) sobrecarga de productos catabólicos (glucógeno, lípidos y proteínas) y c) acúmulo de productos complejos no degradables: pigmentos, minerales y sustancias exógenas.

3.1. Ensayos específicos para citotoxicidad

Entre las pruebas de citotoxicidad *in vitro*, se puede analizar el comportamiento de las células en un ambiente controlado, siendo posible evaluar: la inhibición del crecimiento celular; la permeabilidad de membrana, la replicación y la transcripción del ácido ribonucleico, la síntesis de proteínas, hormonas y enzimas, el metabolismo energético, la transformación celular, la mutagénesis y la carcinogénesis, entre otros (Freshney, 2011).

El amplio uso de líneas celulares y su utilización para la caracterización y desarrollo de compuestos con actividades sobre sistemas biológicos es cada vez más creciente, por lo que se hace necesario tener un mayor conocimiento de estos sistemas. Particularmente relevante es contar con líneas celulares que se encuentren libres de la presencia de contaminantes biológicos como bacterias, hongos, micoplasmas o virus. Por otra parte, se debe conocer su morfología natural, mantener una viabilidad alta y determinar su tasa de multiplicación con lo cual es posible monitorizar la línea lo que permite confiar en la calidad de los procesos de almacenamiento prolongado, lo que garantiza contar con sistemas reproducibles (Freshney, 2011).

Los ensayos con células de mamíferos han desempeñado un importante papel para identificar y caracterizar los potenciales efectos biológicos de los agentes químicos y físicos que rodean al hombre, tanto farmacológicos como tóxicos. Los métodos que emplean líneas inmortalizadas son los más generalizados en la actualidad al contar con condiciones de cultivo claramente descritas, conocer sus propiedades proliferativas e inclusive en algunos casos conocer los mecanismos que permitieron su transformación. Las líneas celulares más utilizadas son: ovario hámster chino

(CHO), células de riñón de mono verde (VERO), células de riñón de recién nacido de hámster (BHK-21), riñón de conejo (RK), células de cáncer cervical (HeLa), células de cáncer epidermoide humano (Hep-2). Todas estas líneas son muy utilizadas para analizar citotoxicidad y viabilidad celular, sin embargo, cada una de ellas son usadas para ensayos específicos ya sea metodológicos (de transfección, infección, selección) o selectivos de especies o tejido (ratón, hámster, humano, epitelial, mesenquimal, etc.).

Los aspectos importantes de la lesión celular

Mediante un estímulo prolongado nocivo ocasionado por agentes físicos, químicos, farmacológicos, infecciosos, reacciones inmunes, defectos genéticos o desequilibrios nutricionales la célula puede iniciar una serie de eventos que le permiten sobrevivir a estos ya sea una adaptación conocida por: atrofia, hipertrofia, hiperplasia y metaplasia o desencadenar una lesión celular irreversible. La lesión irreversible está asociada morfológicamente a: a) vacuolización de las mitocondrias, b) alteraciones de las membranas celulares, c) incremento del diámetro de los lisosomas y d) entrada masiva de calcio a la célula. La célula se encuentra imposibilitada para revertir la difusión mitocondrial tras reperfusión y oxigenación (ocasionando pérdida de ATP), y a la instauración de alteraciones de la función de las membranas (lesión de la membrana celular). La muerte celular puede ser por necrosis o apoptosis. La necrosis es la suma de cambios morfológicos que siguen a la muerte celular de un tejido u órgano (Figura 6). Es la principal manifestación de la lesión celular irreversible, pudiendo observar inicialmente cambios nucleares, y la contracción nuclear progresiva se transforma en una pequeña masa de cromatina condensada conocida como la picnosis nuclear. Las características morfológicas de la necrosis se deben a la desnaturalización de las proteínas y la digestión enzimática de las células lesionadas.

La apoptosis es un tipo especial de muerte celular: es un proceso activo muy ordenado y limitado a la población afectada, como parte del desarrollo normal la célula responde a estímulos fisiológicos y patológicos con lo que se determinan patrones reproducibles relevantes para los eventos morfogenéticos, que se caracterizan por: a) muerte celular programada de poblaciones celulares específicas en un patrón temporal y espacial definido, b) es un proceso genéticamente controlado, c) muerte de células aisladas y d) sin repercusión funcional orgánica. En la apoptosis ocurre la eliminación selectiva de: células con daño en el ADN que no pueden ser reparadas; linfocitos T citotóxicos activados; células auto-reactivas del sistema inmune y células infectadas.

Existen diferentes metodologías para detectar las lesiones celulares características de la apoptosis. Las técnicas de microscopía óptica más utilizadas emplean: a) material fijado, incluido y cortado; b) Diversas ópticas como contraste de fases, hematoxilina-eosina y inmunocitoquímicas para la detección de caspasas, citocromo C, técnica de TUNEL y c) *in vivo*: por la incorporación de anexina-V. Las técnicas de microscopía electrónica a través de: a) fijación, inclusión, corte y contraste para ultraestructura; b) fijación, inclusión, corte y contraste para citoquímica; c) fijación, inclusión, corte y contrastes para inmunocitoquímica ultraestructural: detección de caspasas, técnica de TUNEL.

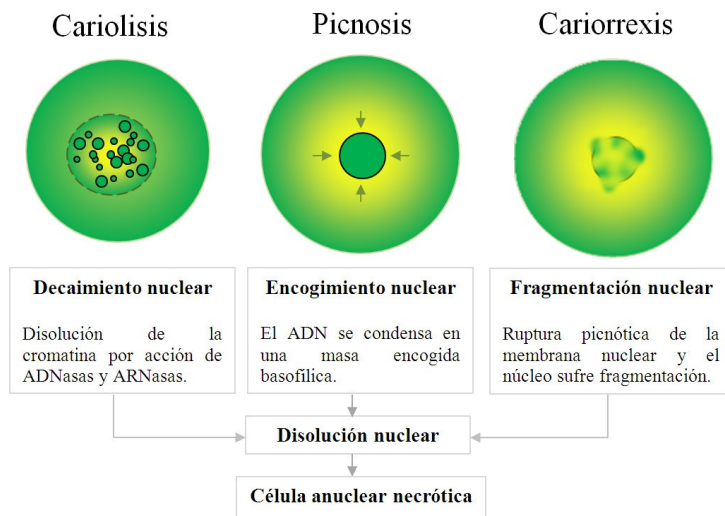


Figura 6. Cambios morfológicos de la célula que experimenta muerte por necrosis. Se indican las características microscópicas que se observan cuando a una célula se le suprime el aporte de irrigación

Citotoxicidad celular

La citotoxicidad puede ser definida como la capacidad que poseen ciertos compuestos de producir una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado (Repetto, 2002). Para la cuantificación de la citotoxicidad es necesaria la implementación de diferentes tipos de ensayos que se encuentran descritos empleando diversos métodos y estrategias para realizarlos. Entre los métodos para cuantificar la citotoxicidad de un compuesto se cuenta con los que miden actividad metabólica celular y por los que se basan en el principio de exclusión celular.

Los ensayos que miden la actividad metabólica utilizan enzimas

Estos métodos para determinar la citotoxicidad de un compuesto incluyen: a) contacto de células vivas en medio de cultivo y expuestas a cantidades conocidas de los compuestos a ser analizados; b) incubación de las células en diferentes intervalos de tiempos; c) un colorante que tenga un estado oxidado, un agente transferidor de electrones, un sustrato para la enzima citoplasmática, un cofactor para la enzima citoplasmática; d) la enzima citoplasmática liberada de las células muertas a través de la cual se determina la citotoxicidad del compuesto a analizar.

Un buen ejemplo es la enzima lactato deshidrogenasa la cual es empleada en un ensayo de citotoxicidad de amplio espectro. Esta enzima está presente normalmente en el citoplasma de las células vivas y se libera en el medio de cultivo celular al permeabilizarse la membrana de las células muertas o en vías de hacerlo, que se han visto afectadas por un agente tóxico. Otro método que se basa en la reducción metabólica es a través del uso del bromuro de 3-(4,5-dimetiltizol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Es un compuesto coloreado de color azul conocido como

formazán, permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido útil en ensayos de proliferación y citotoxicidad de células eucariotas (Mosmann, 1983; Berridge, Tan, McCoy & Wang, 1996).

Los ensayos basados en el principio de exclusión celular

Estos utilizan sustancias capaces de atravesar la membrana plasmática y teñir las células. Durante el conteo celular se pueden distinguir las células vivas de aquellas que no lo están, de manera que las células vivas presentan la capacidad de excluir el colorante activamente de sus citoplasmas. Existen descritos en la literatura varios reactivos como por ejemplo Rojo Neutro, Violeta de Genciana y Azul de Tripano. En el caso del rojo neutro es captado por las células, muy específicamente por los lisosomas y endosomas, y en la medida que la célula pierda viabilidad por la acción del compuesto que se analiza se libera al medio el colorante, solamente las células viables son capaces de retener el colorante en su interior. Se mide seguidamente la cantidad de rojo neutro que permanece dentro de la célula (Norton, 2000). Otro ensayo de enlazamiento al azul de Kenacid, en donde se mide el contenido de proteínas totales, a través de la proliferación celular (Lodish, Berk, Zipursky, Matsudaira, Baltimore & Darnell, 2007). Cuando una célula es expuesta a un compuesto capaz de dañar el crecimiento celular se reduce el número de células presentes en el cultivo tratado comparado con el control. La medición de la concentración de proteínas presentes en el cultivo constituye un índice de toxicidad. Cuando éstas células son expuestas al colorante azul de kenacid retenido por las células, se cuantifica el porcentaje de inhibición del crecimiento celular (Arencibia-Arrebola, Rosario-Fernández, Curveco-Sánchez, 2003). Otros ensayos que utilizan los indicadores de viabilidad celular, como el azul de Alamar[®] y resazurina, permiten detectar crecimiento, viabilidad y susceptibilidad de diferentes compuestos. La detección de las células muertas por el uso de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, en donde las células vivas pueden reducir fácilmente la resazurina (componente no tóxico), y el aumento de fluorescencia resultante se puede medir con un lector de microplacas o un fluorómetro. Las células muertas no tienen capacidad metabólica y no reducirán el colorante.

Ensayo del burst oxidativo usando citometría de flujo: Este ensayo ha sido desarrollado para monitorear la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), tal como peróxido de hidrógeno y aniones superóxidos, de los granulocitos. La capacidad para producir EROs, fenómeno conocido como burst oxidativo, es crítico para la degradación de material por granulocitos. El burst oxidativo esta también implicado en daño inflamatorio de los tejidos. En estos ensayos, las células son expuestas a la luz fluorescente para censar la producción de EROs intracelular. La oxidación del marcador de coloración de fluorescencia, tal como diacetato de diclorofluorencia (DCFH-DA) o dihidrorodamina 123 (DHR 123) han sido usados para detectar la formación de EROs. Después de la incorporación las células son expuestas al activador, el cual estimula la producción de EROs. La fluorescencia en determinados período de tiempo, revela las cantidades relativas de EROs intracelular producido en la población. Finalmente, el burst oxidativo es evaluado con base en la cinética de tiempo usando citometría de flujo.

3.2. Estrés oxidativo: las EROs

En los últimos años claramente se ha demostrado que el daño oxidativo es un factor causal para el desarrollo de enfermedades humanas. Así mismo, ha sido claro que agentes antioxidantes son

capaces de prevenir o disminuir estos procesos patológicos. El avance de las ciencias básicas ha permitido comprender el papel que juegan los radicales libres como la causa del daño ejercido sobre las macromoléculas biológicamente relevantes, y ha destacado el papel de los antioxidantes en la prevención de dichas alteraciones moleculares. Gran parte del daño es consecuencia de un desequilibrio entre las concentraciones de EROs y los mecanismos de defensa antioxidantes que posee cada célula. Los niveles tisulares de antioxidante se pueden alterar por la presencia de compuestos que son incorporados en la dieta. Los estudios epidemiológicos demuestran que los nutrientes antioxidantes más importantes son la vitamina E, la vitamina C y el beta-caroteno, por lo que pueden desempeñar un papel beneficioso en la prevención de varias enfermedades crónicas. Por lo tanto se necesita más investigación sobre el impacto de otros compuestos, no nutritivos, como otros carotenoides, flavonoides y péptidos bioactivos sobre la salud humana.

Desde hace más de 50 años se ha propuesto que los radicales libres juegan un papel en el daño tisular, particularmente relacionado con el envejecimiento (Harman, 1956). Estas moléculas son generadas como consecuencia de los procesos de oxidación, que se definen como la transferencia de un electrón de un átomo a otro, esto sucede de manera natural como consecuencia de la vida en un ambiente aeróbico y a nuestro metabolismo, ya que el oxígeno es el último aceptor en el sistema de flujo de electrones que permite producir energía química en la forma de ATP (Davies, 1995). Sin embargo, es posible que existan problemas que desacoplen la transferencia de electrones, es decir que se genere un electrón desapareado, generando radicales libres, cuando esto sucede sobre el átomo de oxígeno dan origen a las EROs. Las principales son el anión superóxido, el peróxido, el hidroxilo, alcoxilo y óxido nítrico, particularmente como reflejo del escape de electrones altamente reactivos que se transfieren a los compuestos de oxígeno. De los EROs los más reactivos son el hidroxilo (posee una vida media de 10⁻⁹ segundos) y el alcoxilo (vida media de segundos), los cuales rápidamente atacan las macromoléculas cercanas, el daño generado es inevitable activando procesos de reparación. Por otra parte, el anión superóxido, hidroperóxidos y óxido nítrico son menos reactivos (Ames, Shigenaga & Hagen, 1993). Las EROs generan peroxidación de los lípidos de membrana (Elmastas, Gulcin & Isildak, 2006), también se pueden dañar proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, carbohidratos y ácidos nucleicos, cuya repercusión puede condicionar mutaciones, los daños generados sobre estas moléculas conducen a condiciones patológicas que se han relacionado con enfermedades neurodegenerativas (Halliwell & Gutteridge, 1990; Lin & Beal, 2006) y al proceso de envejecimiento (Muller, Lustgarten, Jang, Richardson & Van Remmen, 2007). Las EROs también son generadas bajo algunas condiciones fisiológicas, como por ejemplo: son parte de la respuesta inmune primaria. Las células fagocíticas como neutrófilos, monocitos y macrófagos sintetizan grandes cantidades de superóxido y óxido nítrico como mecanismo para defender al organismo de agentes microbianos. Diversas enfermedades se generan por un efecto crónico de procesos inflamatorios, entre los que destacan la hipertensión, enfermedades cardiovasculares, la obesidad y la diabetes. Actualmente se han reportado que más de 100 enfermedades se han relacionado con un desbalance de las EROs, en las que se incluye malaria, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, enfermedades cardiovasculares, Enfermedad cerebral vascular, aterosclerosis, enfermedades neurodegenerativas, diabetes y cáncer (Alho & Leinonen, 1999; Duh, 1998; Hertog, Feskens, Hollman, Katan & Kromhout, 1993). También se ha implicado a las EROs en algunas comorbilidades que impactan como factores de riesgo como envejecimiento, hipercolesterolemia, y tabaquismo los cuales afectan la esperanza de vida. Así

mismo, se ha destacado que los daños generados por las EROs contribuyen a disfunción de las células progenitoras endoteliales y a las células troncales o progenitores (Ushio-Fukai, 2009).

Las EROs se pueden generar en múltiples compartimentos celulares como consecuencia de la actividad de diversas enzimas. De las que destacan son las NADPH oxidasa (Lambeth, 2004), las presentes en el metabolismo de los lípidos en el lisosoma, y en el citosol las ciclo-oxigenasas. Aun que estas enzimas contribuyen a la generación de EROs, la gran mayoría proviene de la mitocondria (90%). El proceso de fosforilación oxidativa que se realiza en la mitocondria es el origen de las EROs, en éste se lleva a cabo una oxidación controlada de NADH y FADH para generar un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna mitocondrial que conduce la síntesis ATP. El gradiente se produce como consecuencia del paso de electrones de alta energía por la cadena respiratoria, durante el cual la energía de los electrones va disminuyendo mientras se bombean protones al espacio intermembranal. A lo largo de la cadena respiratoria, existen puntos en donde un electrón puede reaccionar de manera directa con el oxígeno u otro aceptor de electrones con lo que se generan las EROs. Los dos principales puntos en donde se generan las EROs son los Complejos I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) y III (coenzima Q: citocromo C oxidoreductasa; complejo citocromo bc₁), en donde grandes cambios en el potencial de energía de los electrones favorecen la transferencia del electrón al oxígeno (Figura 7) produciendo superóxido. Se ha demostrado que el incremento del potencial redox en el Complejo I (Kushnareva, Murphy & Andreyev, 2002) o Complejo III (Chen, Vazquez, Moghaddas, Hoppel & Lesnefsky, 2003) generalmente incrementa la producción de las EROs, apoyando la idea que el potencial redox de estos complejos es importante para la formación de especies reactivas, en el complejo I tanto los grupos hierro-azufre (Genova, Ventura, Giuliano, Bovina, Formiggini, Parenti et al., 2001) y el Flavin mononucleótido (Liu, Fiskum & Schubert, 2002) han sido implicados en su generación. En el Complejo III se ha descrito que el ciclo Q contribuye a la generación de superóxido a través reducción de la ubisemiquinona ya sea en la membrana externa o interna (St-Pierre, Buckingham, Roebuck & Brand, 2002). Por otra parte es posible que se aprecie un incremento considerable cuando se satura la cadena respiratoria, por ejemplo en condiciones patológicas como puede ser un incremento del metabolismo de los carbohidratos generado por hiperglucemia (diabetes mellitus), o por un incremento del metabolismo de los ácidos grasos (hiperlipidemias, obesidad). Particularmente éste último evento condiciona una situación relevante para la sobreproducción de EROs. Cuando se realiza la oxidación de los ácidos grasos se generan electrones de alta energía que son incorporados por FADH en el Complejo II, de esta manera al haber un exceso de electrones y saturar los sistemas de transporte de la cadena respiratoria los electrones son transferidos al Complejo I, generando lo que recibe el nombre de flujo electrónico reverso (Liu et al., 2002). La liberación de superóxido del complejo I es hacia la matriz mitocondrial, mientras que del complejo III la liberación es hacia el espacio intermembranal pasando rápidamente al citoplasma por los poros mitocondriales (St Pierre et al., 2002). La presencia de EROs en la mitocondria condiciona el daño del ADN que al afectar a los componentes de la cadena respiratoria favorece un mayor desacoplamiento del flujo de electrones lo que induce una mayor producción de EROs (Trachootham, Alexandre & Huang, 2009). El anión superóxido lleva a cabo sus efectos en distancias cortas, de tal manera que sus efectos se limitan al sitio de su producción, sin embargo, éste puede ser convertido por la superóxido dismutasa en peróxido de hidrógeno, el cual es una especie más estable, por lo que puede difundir libremente en toda la célula. Se sabe que el peróxido es un regulador de la señalización intracelular, a través de activar moléculas de transducción que son sensibles a condiciones de oxido reducción, ejemplos de estas son las que desfosforilan proteínas en

residuos de tirosina (Fosfatasa de tirosina, Meng, Fukada & Tonks, 2002), de tal manera que los electrones generados en exceso por el metabolismo mitocondrial puede ser empleado para regular la señalización intracelular a través de la producción de EROs (Murphy, Holmgren, Larsson, Halliwell, Chang, Kalyanaraman et al., 2011; Hamanaka & Chandel, 2010). El peróxido puede ser convertido a su vez en el radical hidroxilo (OH⁻), el cual es la EROs más reactiva. La generación de OH⁻ se favorece por la presencia de metales de transición reducidos a través de la reacción de Fenton; de esta manera la producción de EROs por la mitocondria conduce al daño de macromoléculas en toda la célula, incluyendo el ADN nuclear, lípidos de membrana y proteínas.

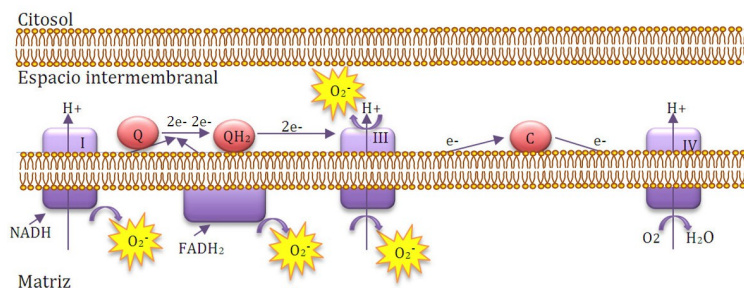


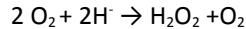
Figura 7. Topología del sitio de origen del superóxido. En la mitocondria se acumulan electrones de alta energía empleados para el bombeo de protones, lo cual es imprescindible para generar una fuerza motriz que participará en la síntesis de ATP, si se genera un exceso de producción de electrones de alta energía o se desacopla la transferencia de electrones es posible q estos sean transferidos al oxígeno. La transferencia ocurre de manera preferente por los complejos I y III, el complejo II es posible que genere especies reactivas de oxígeno cuando hay un exceso de la beta oxidación, modificado de Hamanaka y Chandel (2010)

3.3. Mecanismos reguladores del estrés oxidativo

En la célula existen diversos mecanismos que contrarrestan los efectos dañinos de las EROs, se pueden agrupar en los enzimáticos y los no enzimáticos. Los enzimáticos están representados por las superóxido dismutasas, las catalasas y las peroxidasas, mientras los segundos se relacionan con moléculas aromáticas o los efectos reductores del glutatión. Además es posible que a nivel de la membrana interna mitocondrial se regule la producción de superóxido, lo anterior por la presencia de proteínas desacopladoras, estas proteínas funcionan como poros que permiten disminuir el gradiente de protones, lo cual reduce el potencial oxidativo de la cadena respiratoria y en consecuencia la capacidad de generar superóxido. Este evento se encuentra acompañado de la liberación de calor.

La superóxido dismutasa (SODs) forma parte de una familia de metaloenzimas que utilizan cofactores como Zinc(Zn), Cobre (Cu), Hierro (Fe), Manganese (Mn); son el sistema de defensa de mayor significancia contra O₂^{•-} convirtiendo a este en peróxido de hidrógeno. Las SODs existen en tres isoformas: la citoplásmica SOD Cu/Zn (SOD 1), la mitocondrial (SOD Mn) y la extra-celular (SOD Cu/Zn). Evidencias recientes sugieren que en cada una de las ubicaciones subcelulares, las SODs catalizan la conversión de O₂^{•-} a H₂O₂, el cual podría participa en señalización intracelular. Además, las SODs juegan un papel crítico en inhibir la inactivación oxidativa de óxido nítrico, por lo tanto previniendo la formación de peroxinitrilo y en consecuencia la disfunción mitocondrial y

el daño al endotelio vascular. La reacción catalizada por la SOD se muestra a continuación (Weisiger & Fridovich, 1973; Marklund, 1982):

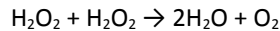


Estas enzimas están presentes en cualquier célula que utilice oxígeno, pues éstas tienen el potencial de producir el anión superóxido, y por ende debe de contar con alguna forma de SOD (Fridovich, 1974); Por lo que una amplia gama de organismos la contienen, esto se describe en la siguiente tabla (Tabla 3) (Omar, Flores & McCord, 1992):

Tipo	Estructura	Localización	Distribución
Cu/Zn SOD	Dímero	Citosol	Eucariontes y algunos procariontes
EC/SOD (Cu/Zn)	Tetrámero	Extra-celular unida a membrana	Mamíferos, pájaros y peces
Mn-SOD	Dímero o tetrámero	Citosol o matriz extra-celular	Todos los aerobios
Fe-SOD	Dímero o tetrámero	Citosol, cloroplastos o mitocondrias	Procariontes y algunas eucariontes

Tabla 3. Tipos y ubiación de las Super Óxido Dismutasas

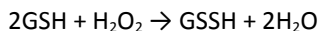
La Catalasa es una peroxidasa, es decir que cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Chelikani, Fita & Loewen, 2004), por lo que ayuda a contrarrestar el estrés oxidativo, que se genera durante el metabolismo celular. A continuación se observa la reacción que esta enzima realiza:



La catalasa es una metaloproteína, se encuentra conformada por 4 subunidades su peso molecular oscila entre los 210-280 KDa (Hadju, Wyss & Aebi, 1977), en donde la enzima perteneciente a la especie humana se encuentra asociada a 4 NADPH reducido uno por cada subunidad que la conforma (Fita & Rossman, 1985). Podemos encontrar a la catalasa localizada en la mitocondria y en los peroxisomas (Chelikani et al. 2004), con la excepción de los eritrocitos donde esta enzima se localiza en citosol (Chance & Maehly, 1955). Se han identificado 3 grupos de catalasas:

- Catalasas monofuncionales están presentes en organismos eucariontes y procariontes y contienen un grupo hemo. Estas catalasas a su vez se clasifican en 2 tipos las de subunidades pequeñas y las de subunidades grandes siendo las primeras localizadas e mamíferos, hongos y en la gran mayoría de las bacterias y unen NADPH, las de subunidades grandes generalmente están en hongos y bacterias, y no unen NADPH (Lardinois, Mestdagh & Rouxhet, 1996; Melik-Adamyan, Bravo, Carpena, Switala, Maté, Fita et al., 2001).
- Mn-catalasa esta enzima está presente en organismo procariontes aerobios contiene un Mn en su sitio activo, y son hexaméricas.
- Catalasa-Peroxidasa: como su nombre lo dicen tienen actividad catalasa y peroxidasa, están presentes en hongos y bacterias, además también contienen un grupo hemos (Hadju et al., 1977).

La Glutación peroxidasa (Gpx): como su nombre lo indica también es una enzima encargada de reducir el daño causado por las EROs y es dependiente de Selenio (Se), catalizando el paso de peróxido de hidrógeno y lipoperóxido a agua o sus respectivos alcoholes, esto utilizando glutación reducido (GSH) (Margis, Dunand, Teixeira & Margis-Pinheiro, 2008), es este GSH el cual reacciona con peróxidos y los transforma en agua y en alcohol, es durante este proceso donde el glutation es oxidado (GSSH), y después es regresado a su estado reducido por la glutation reductasa (GR) (Neve, Vertongen & Molle, 1985). La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



La GPx fue reportada por Millis en 1975 en el eritrocito bovino, después se reportó en pulmones hígado de rata, músculo, piel de peces y eritrocitos humanos, esto indica que esta enzima está presente en gran cantidad en los organismos (Zachara, 1991; Vertecky, Cooper, Ghirardi & Ramacci, 1993).

Esta enzima cuenta con varias isoformas, siendo la Gpx1 la mejor caracterizada, esta localiza en el citosol y la mitocondria (Wagner, Kautz, Fricke, Zerr-Fouineau, Demicheva, Guldenzoph et al., 2009). Se conocen al menos 3 isoformas de la GPx:

- GPx-c es la forma intracelular.
- GPx-p es la forma extra-celular o plasmática.
- GPx-PH es específica para los fosfolipoperóxidos (Asociada a membrana) (Zachara, 1991).

Cabe mencionar que tanto la calatasa como la glutación peroxidasa se encargan de disminuir los niveles de H_2O_2 , pero su regulación es diferentes, ya que la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido y GPx a concentraciones bajas, esto nos demuestras una relación inversa en la actividad de las enzimas, además es importante mencionar que tanto la CAT/SOD y la GPx/GRd forman parte de sistemas enzimáticos antioxidantes diferentes (Zachara, 1991; Lam, Wang, Hong & Treble, 1993).

Varios compuestos de bajo peso molecular están involucrados en la defensa antioxidante. Glutación reducido es el principal tiol citosólico, éste sirve como cofactor para diversas enzimas detoxificadoras (glutación peroxidasa, glutation-S-transferasa). Este compuesto está involucrado en la reducción de puentes disulfuro presentes en proteínas, adicionalmente secuestra EROs, siendo oxidado a GSSG. Otros compuestos tales como el ubiquinol uratos o billirrubinas también poseen actividades antioxidante (Jacob & Bum, 1996)

3.4. Los complementos alimenticios antioxidantes

La dieta humana contienen una diversidad de compuestos que poseen actividades antioxidantes o que se han propuesto como sustancias que secuestran EROs en base a sus propiedades estructurales. Las moléculas representativas más eficientes en secuestrar EROS presentes en la dieta son: Ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), carotenoides y flavonoides. Excluyendo a la vitamina C existen varios cientos de moléculas variantes con efectos antioxidantes, particularmente diversos son los carotenoides para los que se han descrito más de 600 diferentes moléculas, cerca de la décima parte de ellas es posible que se encuentren

presentes en la dieta humana (Rice-Evans, Miller, Bolwell, Bramley & Pridham, 1995; Rock, Jacob & Bowen, 1996). La misma diversidad de compuestos presentes en los alimentos hacen proponer que es posible obtener efectos sinérgicos entre los diferentes compuestos presentes en los alimentos, lo cual es difícil demostrar *in vivo*. La vitamina C se considera como el agente antioxidante natural más potente (Weber, 1996). Es un compuesto hidrosoluble, en presencia de EROs se oxida a deshidro-ascorbato, el cual se recicla a ácido ascórbico por medio de la deshidro-ascorbato reductasa, de esta manera el deshidroascorbato se encuentra en muy bajos niveles. La ingesta de altas dosis de vitamina C por personas sanas demuestra que no presenta efectos adversos, particularmente debido a un control homeostático que mantiene concentraciones estables, al limitar su absorción e incrementar su eliminación de manera compensatoria. Su mecanismo antioxidante está relacionado con secuestrar el superóxido, peróxido de oxígeno, el radical hidroxilo y el singulete de oxígeno. La vitamina E o alfa-tocoferol es una sustancia altamente lipofílica se ubica preferentemente en membranas y presenta alta unión con lipoproteínas, de tal manera que su principal efecto antioxidante es evitar la lipoperoxidación, lo que se realiza al secuestrar radicales lipo-peróxidos (Traber & Sies, 1996). Los carotenoides son colorantes naturales con una pronunciada actividad antioxidante (Olson & Krinsky, 1995). Sus propiedades químicas están relacionadas con la presencia de dobles enlaces los cuales siendo más eficientes cuando se encuentran grupos hidroxilo y carbonilo (Siaja, Scalese, Lanza, Marzullo & Bonina, 1995). Estos compuestos ejercen su efecto antioxidante al secuestrar eficientemente el singulete de oxígeno y los radicales peróxido (Palozza & Krinsky, 1992). De manera similar a la vitamina E los carotenoides presentan alta afinidad por lipoproteínas encontrándose en altas concentraciones en las lipoproteínas de baja densidad y las de alta densidad séricas. Los flavonoides son un grupo grande de compuestos antioxidantes polifenólicos, se encuentran principalmente como compuestos O-glucósidos. Estos poseen varias familias de compuestos relacionados estructuralmente. Son eficientes secuestradores de radicales peróxido, e hidroxilo y del singulete de oxígeno, su mecanismo antioxidante esta relacionado con la formación de radicales fenoxi (Rice-Evans & Miller, 1996).

La participación de los EROs en diversos mecanismos promotores de enfermedades crónicas, o como mediadores de daño celular por enfermedades crónicas, han despertado el interés de encontrar nuevos compuestos antioxidantes que puedan incorporarse a los alimentos. En los últimos años particular interés ha sido enfocado a la identificación de péptidos antioxidantes, estos se han identificado en la leche (Suetsuna, Ukeda & Ochi, 2000) y papa (Pihlanto, Akkanen & Korhonen, 2008). También se han aislado de hidrolizados de carne de pescado (Wu, Chen & Shiau, 2003), particularmente, se han descrito actividad antioxidante de hidrolizados de proteínas que *in vitro* presentan efecto antioxidante sobre radicales hidroxilo hasta en un 35%, en donde hay un efecto mayor con hidrolizados de menor tamaño (Je, Park & Kim, 2005). Hidrolizados de bajo peso molecular obtenidos con Flavoursina y alcalasa han sido los más efectivos contra las EROs y los iones férricos (Dong, Zeng, Wang, Liu, Zhao & Yang, 2008). Los péptidos generados con Flavorzina y Alcalasa han mostrado *in vitro* que pueden evitar el daño sobre el ADN empleando la reacción de Fenton, se propone que el efecto protector se debe a que los hidrolizados quelan el Fe²⁺ previniendo así que reaccionen con el peróxido lo que evita la formación de hidroxilos (Klompong, Benjakul, Yachai, Visessanguan, Shahidi & Hayes, 2009). Se ha reportado la secuencia de pequeños péptidos con actividad antioxidante obtenidos de la hidrólisis de la carne del atún, la secuencia con mayor efecto ha sido LPTSEAAKY la que es capaz de reducir en un 79.6% la capacidad oxidativa *in vitro* (Hsu, 2010), otra secuencia es LHY que ha

logrado la reducción en un 63% (Bougatéf, Nedjar-Arroume, Manni, Ravallec, Barkia, Guillochon et al., 2010).

3.5. Procedimientos de detección de EROs

Se ha comprobado que las EROs generan daños en diferentes biomoléculas como son las proteínas, lípidos y DNA estos daños se asocian a la aparición de enfermedades como lo son la de Alzheimer, Parkinson, Diabetes, enfermedades cardiovasculares entre otras, por lo que resulta muy relevante su detección en células de mamíferos en especial de humanos, para poder identificar mecanismos de acción de potenciales drogas o aditivos en complementos alimenticios. Así mismo, identificar los mecanismos que están involucrados en los daños que participan en el desarrollo del padecimiento. Existen dos métodos empleados los químicos y los fluorescentes, los dos procedimientos más frecuentes son los que se describen a continuación.

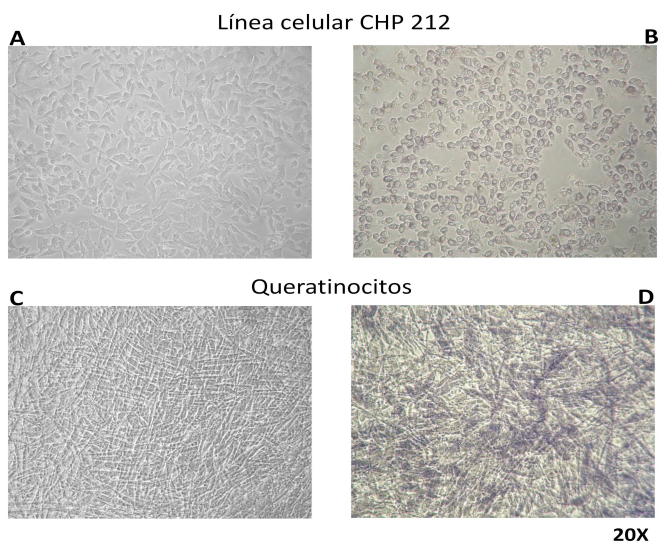


Figura 8. Detección de EROs por NBT. Se observa que la línea tumoral presenta una menor capacidad de generar EROS, posiblemente presenta mecanismo que eviten su generación. Mientras que los queratinocitos muestran claramente positividad al formazán, reactivo que denota la presencia de especies reactivas

Detección de EROs mediante NBT

La detección de EROs intracelular específicamente del superóxido (O_2^-) se basa en una prueba colorimétrica, debido que se evalúa la presencia de formazán en los diferentes pozos de la placa que contiene las células a evaluar, este análisis se llevaba a cabo mediante un lector multiplaca realizando lecturas a una absorbancia de 550 nm, cuya longitud de onda es a la cual se detecta el formazán. Las células a ser estudiadas son cultivadas en cajas de 96 pozos, una vez que alcanzan la confluencia del 80-90% están lista para ser sometidas a la detección de EROs o de ser necesario a la inducción de estas. El procedimiento consiste en la incubación con NBT y por

último un lisado con SDS 10%. Esta técnica se basa como ya se mencionó en la detección de los cristales de formazan (Figura 8), son justo estos cristales los que dan una coloración morada, los cuales son generados cuando el NBT es reducido debido a que compete con el O_2 y esta reducción es llevada a cabo por la NADPH-oxidasa y también por efecto directo del O_2^- .

Detección de EROs mediante el kit de detección de EROs/Superóxido

Este procedimiento es uno de los más sofisticados pues permite la detección de diferentes tipos de EROs y de especies reactivas de nitrógeno. Existen modificaciones del procedimiento de detección que permiten evaluar de manera independiente la presencia de superóxido (O_2^-). Esta técnica puede ser analizada por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo; las EROs son detectados mediante reactivos de detección (fluoróforo) que emite una fluorescencia verde. En el caso del superóxido el reactivo genera una fluorescencia de color naranja; en cuanto a la detección por microscopio de fluorescencia se requieren un set de filtros con longitudes de onda de 490/525 nm para observar la fluorescencia emitida por los EROs, mientras que para observar la detección del superóxido se requiere de un set de filtros de 550/620 nm). En el caso de ser analizados mediante citometría de flujo, el equipo debe contar con un láser azul y un filtro de 488 nm.

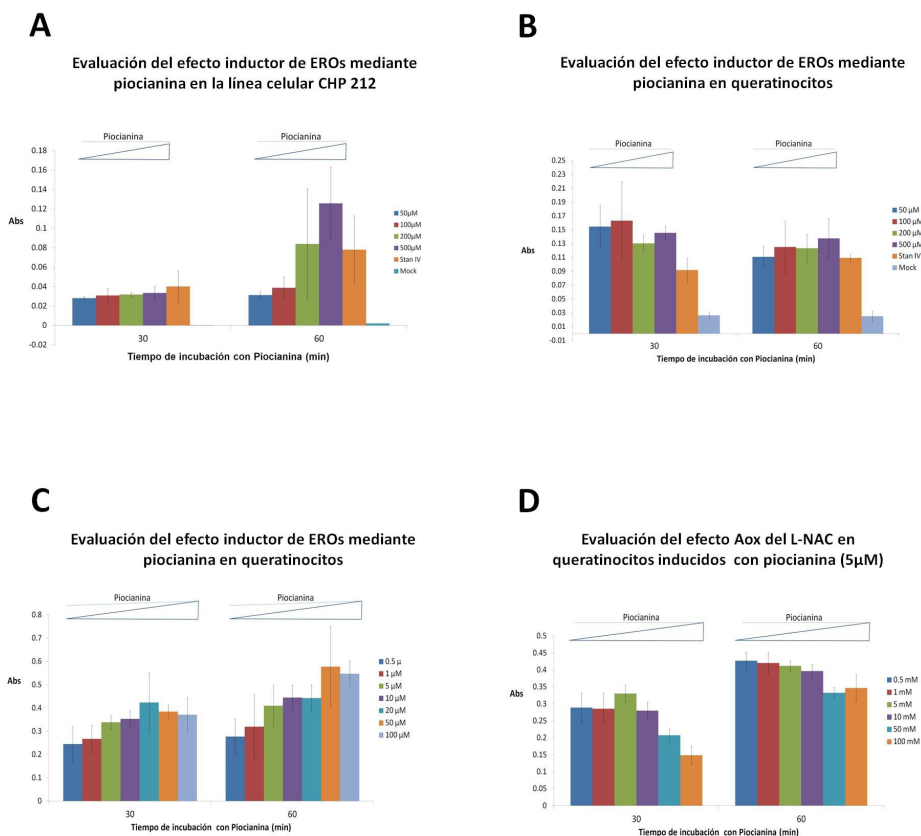


Figura 9. Se realizó la evaluación del efecto inductor de EROs mediante piocianina (5-500 µM) en una línea celular transformada como lo es CHP 212 (Fig. A) y células no transformadas como los queratinocitos (Fig. B), ambos tipos celulares fueron incubados a 2 tiempos diferentes (30 y 60 min) tanto con el inductor y con el detector de estas especies reactivas de oxígeno que es el NBT, después de esto las células fueron lisadas con SDS 10% y fueron leídas mediante un lector mutiplaca Sinergy II a una absorbancia de 550, también se evaluó el efecto de otro inductor (Stan IV 1.5 µg/ml), se observa que los queratinocitos presentan los valores de absorbancia más altos lo que nos indica que son más susceptibles de generar EROs al ser inducidas con piociana que la línea celular CHP 212. Por lo que los queratinocitos son una población sobre la que se puede evaluar los efectos antioxidantes, lo inmediato fue disminuir las concentraciones del inductor de 0.5-100 µM (Fig. C), empleando la concentración de 5 µM, se evaluó el efecto antioxidante (aox) del L-NAC (Fig. D) con concentraciones de 0.5-100 mM. Se observa que los efectos antioxidantes son más evidentes a altas concentraciones y tiempos cortos (30 min)

3.6. Efectos antibióticos

Los microorganismos, desde su aparición como formas de vida independiente, han estado sujetos a presiones de selección por radiaciones ultravioleta, pH, disponibilidad de oxígeno, presión atmosférica y, para aquellos de ambientes acuáticos, a los niveles de presión barométrica. Por lo tanto, los microorganismos identificados en la actualidad, son los que han logrado desarrollar un proceso evolutivo que les ha permitido adaptarse a las exigencias del medio.

Desde el punto de visto antropocéntrico, los microorganismos, han provocado desde brotes, endemias, epidemias, hasta pandemias, con altas tasas de morbi-mortalidad, diezmando en la Europa medieval poblaciones completas de sus habitantes y reemergiendo en la actualidad algunas infecciones que se consideraban controladas.

Esto ha permitido que, desde los orígenes de las primeras civilizaciones, se tengan registros gráficos y/o escritos de la búsqueda y empleo de sustancias para revertir el efecto de la invasión de un microorganismo a los tejidos, órganos o sistemas del cuerpo humano (Amabile-Cuevas, 2012).

Búsqueda de sustancias con actividad antimicrobiana

El vocablo “alcaloide”, es derivado de la palabra árabe *al-qali*. Hace mención al nombre de la planta de donde se obtuvo el primer compuesto nitrogenado que constituye el principio farmacológicamente activo encontrado en la mayoría de las flores. La morfina, fue el primer alcaloide aislado en extractos crudos de *Papaver somniferum*, y desde entonces se han identificado y determinado la estructura química de más de 10,000 sustancias alcaloide (Kutchan, 1994).

Este tipo de sustancias han sido utilizadas desde el inicio de las civilizaciones, como veneno, medicinas o pociones. Uno de los ejemplos más ilustrativos es la muerte por envenenamiento del filósofo griego Sócrates (muerto en 399 A.C.) al ingerir sicuta (infusión obtenida de *Conium maculatum*). En la historia se registra también la utilización de extractos de atropina (*Hyoscyamus muticus*) por la emperatriz de Egipto Cleopatra para dilatar sus pupilas y proyectar una imagen de euforia y alucinante. Con este mismo propósito, en la Europa medieval, la mujeres ingerían extractos de *Atropella belladonna* (de ahí el nombre *belladonna*). Estos compuesto son tóxico, sin embargo en la medicina alópata, para examinar la dilatación de las pupilas se usan derivados sintéticos anticolinérgicos de atropina (tropicamina). Al menos durante los dos últimos siglos, la quinina (antimalárico), obtenida de *Cinchona officinalis*, permitió la expansión de las exploraciones europeas hacia los trópicos al permitir a los exploradores contar con un fármaco eficiente contra la malaria (Kutchan, 1994).

El descubrimiento circunstancial de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 observada en cultivos de *Penicillium notatum*, es un parte aguas en la historia de la medicina ya que permitió la purificación y producción industrial del la primera sustancia con actividad antibacterial. Este hito científico a su vez propició un gran impacto en la salud pública ya que ha permitido abatir de manera importante los índices de morbi-mortalidad asociados a infecciones bacterianas, destinándose considerables recursos humanos y económicos en la investigación de nuevos

fármacos con propiedades bactericidas-bacteriostáticas, así como en la dilucidación de los mecanismos de acción de estos compuestos

A nivel global, de las especies vegetales clasificadas taxonómicamente, se sabe que más de 13,000 han sido utilizadas indirecta o directamente como drogas (Tyler, 1994). El tratamiento que ofrece la medicina alopata, está basado 25% en el empleo de extractos vegetales, derivados, tes o compuestos puros (como la morfina, codeína, vincristina o vinplastina). La química desarrollada por los vegetales, ha servido también para la síntesis química *in vitro* de otras drogas como la tropicamina, cloroquina (derivada de la quinina), procaína y tetracaína (sintetizadas a partir de la cocaína) (Kutchan, 1994).

Debido a este potencial de los vegetales superiores, diversas instituciones, centros de investigación y firmas comerciales, iniciaron amplios programas de búsqueda de precursores de los compuestos más utilizados en su momento. De acuerdo a Wall (1998), una investigación realizada durante el periodo de 1950 a 1959, en el Laboratorio Regional de Investigación del Este del estado de Filadelfia (ERRL, Eastern Regional Research Laboratory) de los Estados Unidos (USA). Se colectaron varios miles de ejemplares al azar en todo el mundo, los que fueron clasificados por taxónomos del ERRL. Entre otros se buscó la presencia de extractos precursores de esteroides como la cortisona, alcaloides, taninos, flavonoides (Wall, Krider, Krewson, Eddy, Willaman, Correl, et al., 1954). A la par de la investigación química, se realizaron ensayos para evaluar la actividad antiviral, antitumoral y bactericida de los principios activos purificados.

Posteriormente con la creación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), los gobiernos de los distintos estados miembros de estas organizaciones internacionales, han desarrollado y unido esfuerzos institucionales y privados para encontrar y desarrollar fármacos para el control de las enfermedades infecciosas.

La resistencia a los agentes antimicrobianos: Un nuevo paradigma en el control de las enfermedades infecciosas

El fenómeno de resistencia bacteriana (Figura 10) se identificó como un problema de salud pública poco tiempo después de la introducción de los antibióticos para el tratamiento terapéutico de las enfermedades infecciosas. Se conoce en la actualidad que la resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos puede estar mediada entre otros mecanismos, por la adquisición de mutaciones en el genoma que le confiere una resistencia intrínseca a algunos antibióticos. En 1950, el descubrimiento de plásmidos y su participación en la transferencia de genes por conjugación, transducción o transformación, demostró la participación de elementos extracromosomales involucrados en la resistencia a fármacos. Por otra parte en estudios retrospectivos al empleo masivo de antibióticos, se han purificado plásmidos, encontrándose que la mayoría de éstos no tienen determinantes de resistencia (Hall, Recchia, Collis, Brown & Stokes, 1996).

La rápida aparición de cepas resistentes puede considerarse como una consecuencia natural en respuesta a la utilización masiva de fármacos en el tratamiento de enfermedades infecciosas, provocando involuntariamente una liberación de importantes concentraciones de fármacos al medio ambiente (Calva, Niebla-Perez, Rodriguez-Lemoine, Santos & Amabile-Cuevas, 1996).

El reciente descubrimiento y demostración experimental de que algunos derivados peptídicos poseen actividad antimicrobiana, ofrece un campo interesante en primera instancia para dilucidar su mecanismo de acción y en segunda, analizar la posible emergencia de cepas de microorganismos recientes a esta nueva presión de selección. Desde un punto de vista Darwiniano, es posible que esto ocurra.

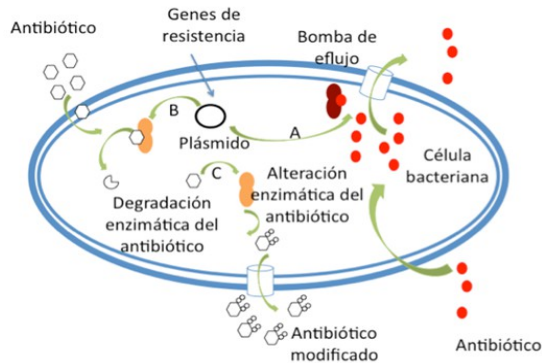


Figura 10. Posibles mecanismos de resistencia bacteriana a una amplia variedad de antibióticos. (a) Varios genes pueden codificar para proteínas integrales de membrana asociadas a sistemas activos de eflujo, (b) degradación enzimática del fármaco, (c) alteración química, la cual puede provocar su inactivación. De manera general se acepta que los genes de resistencia a antibióticos son principalmente codificados por plásmidos. No obstante, el cromosoma bacteriano participa en el fenotipo de resistencia a FQs. La transmisión de este fenotipo puede ser adquirido por un proceso de segregación Mendeliana, por mutaciones al azar, por la movilización genética y por conjugación con otras bacterias. Adaptación de Levy (1998)

Nuevo enfoque de la actividad antibacterial: Los compuestos peptídicos

Como se sabe y es reconocido por los bioquímicos, las proteínas son esenciales para el desarrollo y sustentabilidad de la vida en cualquiera de sus manifestaciones. Estas constituyen la maquinaria molecular a nivel de monómeros y polímeros que en el cuerpo humano, dirigen y controlan la mayoría de las funciones biológicas, a nivel de la unidad fundamental de los organismos vivos, la célula. En su conjunto, es evidente su participación en la fisiología en los tejidos, órganos o sistemas. En el caso del ser humano, como organismo heterótrofo por excelencia, para su metabolismo es necesaria la incorporación de amino ácidos esenciales como parte de su dieta diaria, complementada con lípidos y carbohidratos, como fuente de energía (Silano & De Vincenzi, 1999).

Actualmente se reconoce que los péptidos con actividad antibacterial, son los principales componentes de la respuesta inmune innata y que más de 400 péptidos con actividad antibacterial se han descubierta a partir de extractos de tejidos de varias especies, desde plantas hasta mamíferos (Hoffmann, Katatos, Janeway & Ezekowitz, 1999).

En 1981, fue dada a conocer la secuencia de aminoácidos de Cecropina A y B, la cual fueron deducidas a partir de extractos de mariposas nocturnas, comúnmente conocidas como polillas. Este fue el primer reporte de péptidos que mostraron una importante actividad citotóxica contra

células procariotas (Steiner, Hultmark, Engström, Bennich & Boman, 1981). La magainina, aislada de *Xenopus sp*, constituyó el primer péptido con actividad antibacterial aislado de un vertebrado. Este descubrimiento fue posible dado a que se observó que algunos especímenes de *Xenopus sp*, sometidos a la extracción quirúrgica de oocitos, no presentaban signos evidentes de infección o inflamación, a pesar que el procedimiento quirúrgico se efectuara en un ambiente no estéril (Zasloff, 1987).

Derivado de lo anterior, recientemente se ha acuñado el acrónimo AMP (Antimicrobial peptide, por su siglas en inglés). Estos son antibióticos naturales generados por organismos vivos ante la presión selectiva ante la presencia de microorganismos patógenos que colonizan o invaden su sistema. Constituyen en su conjunto un importante grupo de moléculas efectoras del sistema inmune, tanto de vegetales como de animales, con una amplia diversidad de estructura como de modo de acción.

Con base a estudios de identidad y conservación de sus secuencias de aminoácidos, complementadas con la estructura tridimensional de los AMPs, se han agrupado para su estudio en las siguientes familias:

- Defensinas
- Tioninas
- Proteínas transferidoras de lípidos
- Ciclotidos
- Péptidos similares a knotinas

Actualmente se ha encontrado que los AMPs tienen un espectro de actividad antibacterial amplio, lo que constituye un potencial hasta ahora inédito para el desarrollo y producción por procedimientos biotecnológicos de nuevas generaciones de fármacos.

Modelo sugerido del mecanismo general de acción de los AMPs

La mayoría de los péptidos antimicrobianos, poseen dos características químicas importantes, una carga positiva obtenida de los residuos de aminoácidos básicos y al mismo tiempo ser anfipáticos, dada la posibilidad de contar con residuos hidrofóbicos o hidrofílicos.

Se considera que la carga positiva, es una de sus principales características que contribuyen selectivamente contra la célula procariota. Un ejemplo de ello, es la melitina, componente principal del veneno de las abejas (*Apis mellifera*), la cual es eléctricamente neutra, sin embargo: muestra una importante actividad citotóxica contra las células de mamíferos, además de su demostrada actividad antibacterial.

Como se sabe, la membrana de la célula procariota, es eléctricamente negativa, por lo cual los péptidos catiónicos antimicrobianos se unen selectivamente a la membrana bacteriana, formando un complejo bacteria-defensina (CBD), esto no sucede con la célula eucariota debido a su carga eléctrica neutra (Matsuzaki, 2001).

La formación del CBD, tiene como consecuencia la formación de poros en la membrana bacteriana, incrementándose la permeabilidad celular y posteriormente la muerte, como se muestra en la figura 11.

Estudios recientes, han permitido la síntesis de AMPs sintéticos, como el péptido mDB-6, con una potente actividad bactericida contra *E. coli* a una concentración de 20 ug/mL Ensayos de inhibición de crecimiento han sugerido que la actividad antimicrobiana particularmente de las defensinas es un fenómeno sal-dependiente. Alta concentración de NaCl disminuye la actividad antimicrobiana de la mayoría de las isoformas de las defensinas como hBD-2, hBD-1 y mBD-2 (Valore, Park, Quayle, Wiles, McCray & Ganz, 1998; Harder, Bartels, Christophers & Schröder, 1997; Bals, Wang, Wu, Freeman, Bafna, Zasloff et al., 1998a; Bals, Goldman & Wilson, 1998b).

No obstante, los estudios más recientes, han aportado las primeras evidencias de que las defensinas hBD-3 y HNP tienen actividad antimicrobiana debido a la inhibición de la síntesis de la pared celular (Sass, Schneider, Wilmes, Körner, Tossi, Novikova, et al., 2010; de Leeuw, Li, Zeng & Li, 2010), lo cual es evidente corresponde a un mecanismo completamente diferente al señalado en la figura 11.

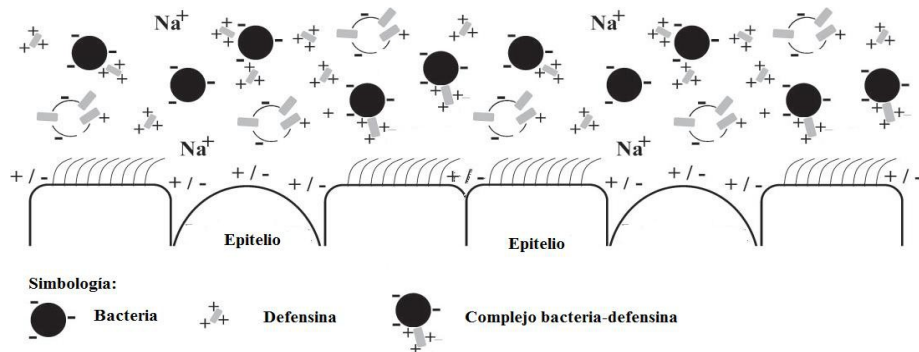


Figura 11. Modelo sugerido para el mecanismo de acción de las defensinas. Los péptidos catiónicos antimicrobianos se unen selectivamente a la membrana eléctricamente negativa de la bacteria, mientras que la célula del epitelio, como se muestra en la imagen posee una carga neutra. La formación del complejo bacteria defensina, origina poros en la membrana bacteriana. Adaptación de Yasuhiro & Yasuyoshi (2012)

Actividad antibacteriana: Opciones para la investigación en alimentos funcionales

Recientemente, se ha reportado que los alimentos funcionales (AF), además del valor nutritivo, aportan beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano, entre sus componentes se encuentran los denominados péptidos bioactivos (PBAs), purificados o como componentes de hidrolizados proteínicos.

La propiedad antibacteriana o estimulante de la proliferación celular de los PBAs por un mecanismo aún desconocido, permiten sugerir la investigación en modelos *in vitro* del papel de los hidrolizados peptídicos sobre los microorganismos (Salazar-Aranda, Pérez-López,

López-Arroyo, Alanís-Garza & Waksman, 2009; Des-Raj, Minhui, Li-Hui, Geert-Jan, Dipika & Roman, 2011).

Cultivos bacterianos: un modelo *in vitro* para el estudio de la propiedad antibacterial de derivados de los alimentos funcionales

Curva típica de crecimiento bacteriano

El comportamiento típico del crecimiento celular de la célula procariota puede ser analizado *in vitro* de prácticamente cualquier especie de bacteria, mediante su seguimiento en un trazo gráfico impreso o digital que comúnmente se conoce como “Curva típica de crecimiento bacteriano” (CTCB). Ésta se puede obtener en cultivos líquidos o sólidos, de acuerdo a los intereses del grupo de investigación.

Bajo condiciones controladas de temperatura, aireación, pH, luz, tiempo y nutrimentos es posible evaluar la respuesta del espécimen a condiciones de estrés a elección del investigador, lo cual hace a este sistema sumamente bondadoso, económico y con resultados en relativamente poco tiempo.

Esencialmente se conoce que la célula procariota se divide por fisión binaria dando origen a dos células hijas, las cuales a su vez se vuelven a dividir resultando dos células más, lo cual define este tipo de crecimiento celular como geométrico o exponencial. Sin embargo, antes de que la célula entre en esta condición de crecimiento, es necesario que se cumplan algunas condiciones, las cuales definen las fases de la CTCB, como de latencia o retardo (*lag*), exponencial, estacionaria y decaimiento o muerte celular. Estas fases están limitadas por el consumo y el agotamiento de nutrimentos o por la acumulación de metabolitos tóxicos de la misma población en proliferación. La consecuencia es que el crecimiento al cabo de un cierto tiempo llega a disminuir hasta detenerse (Figura. 12).

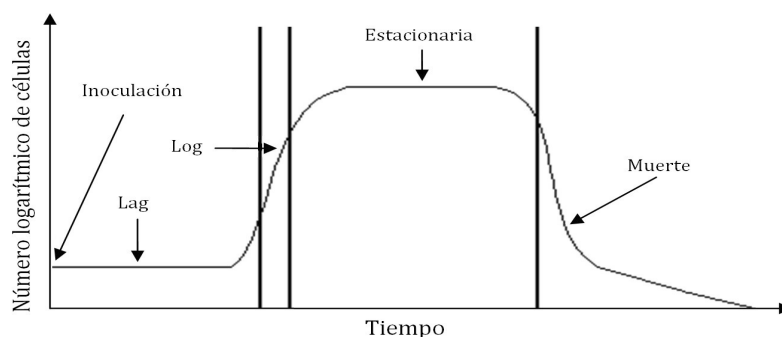


Figura 12. Fases del crecimiento bacteriano

Fase de latencia (lag): Como un mecanismo de adecuación al ambiente *in vitro* las células requieren de la síntesis de nuevas enzimas y metabolitos necesarias para reiniciar el crecimiento y para la utilización de los nutrimentos que en abundancia se encuentran en el medio de cultivo sólido o líquido. Este periodo se puede prolongar en el caso de que el medio de cultivo previo y

las condiciones actuales resulten tan diferentes que las células sean genéticamente incapaces de sobrevivir, por lo que sólo unas cuantas mutantes podrán subsistir, y obviamente se requerirá más tiempo para que éstas se multipliquen lo suficiente y sea notorio el incremento en biomasa.

Fase exponencial: En esta fase las células se encuentran en un estado de crecimiento sostenido. Se sintetiza nuevo material celular a una tasa constante y la biomasa masa aumenta de manera exponencial. Lo anterior continúa hasta que uno o más nutrientes comienzan a agotarse y/o la concentración de metabolitos bacterianos se van adicionando al medio de cultivo, lo cual se hace evidente con el descenso paulatino de la biomasa. En este momento las células en proliferación se están preparando para entrar a la siguiente fase.

Fase estacionaria: El crecimiento celular comenzará a disminuir hasta hacerse prácticamente nula. Esto es como consecuencia del agotamiento de nutrientes en el medio y/o el acumulo de metabolitos tóxicos. La cifra de células viables se mantiene constante, aunque en realidad en el conteo aumente poco a poco el número de células, si se cuentan también las muertas. La duración de esta fase depende de la naturaleza del microorganismo y de las condiciones del medio.

Fase de muerte celular: Esta fase, también es conocida como fase de declinación, la cual representa la disminución del número de células debido al aumento progresivo de la tasa de mortalidad, misma que tarde o temprano alcanza un valor sostenido. Por lo general, una vez que la mayoría de las células ha muerto, la tasa de mortalidad disminuye bruscamente, por lo que un número pequeño de sobrevivientes pueden persistir en cultivo por meses o años. Dicha persistencia puede deberse a que las células consiguen crecer gracias a los nutrientes liberados por las células que mueren.

Con este sistema *in vitro* de crecimiento celular, es posible obtener dos variables que son fundamentales para la evaluación de crecimiento bacterial ante distintos retos experimentales: el tiempo de duplicación celular y la velocidad específica de crecimiento (Mahon, Lehman & Manuselis, 2010).

Ambas variables, dependen del tipo de microorganismo que se trate y diversos factores ambientales como son la temperatura, el pH, oxigenación, etc.

Cinética de crecimiento microbiológico para la evaluación de los biopéptidos como fuente de carbono o energía

El efecto de los biopéptidos en la estimulación del crecimiento celular, tanto en células procariontas como eucariotas, puede ser monitoreado y evaluado mediante el registro de las fluctuaciones en el incremento o no de biomasa en un tiempo dado, lo que se conoce como cinética de crecimiento, así como simultáneamente registrar el agotamiento o la desaparición del biopéptido en el medio de cultivo.

Los microorganismos debido a su diversidad metabólica, son capaces de desarrollarse en una amplia gama de sustratos, sin embargo este crecimiento y otras actividades fisiológicas está determinada por su entorno físico-químico. De esta forma la velocidad específica de crecimiento (μ) está en función de la concentración de los compuestos químicos, siguiendo el

comportamiento descrito por el modelo de Monod, lo cual de entrada abre la posibilidad del análisis de los biopéptidos y su efecto estimulante o inhibitorio de la proliferación celular.

$$\mu = \mu_{\max} (S/[K_s + S])$$

En donde:

μ = velocidad específica de crecimiento

μ_{\max} = velocidad máxima de crecimiento

S = Concentración del sustrato

K_s = Constante cinética cuando la concentración del sustrato es igual a $\mu=0.5 \mu_{\max}$

Para emplear la ecuación de Monod, es necesario conocer la velocidad específica de crecimiento (μ), esta variable, se puede calcular mediante una sencilla ecuación, en la cual se tiene:

$$td = \ln 2/\mu$$

En esta ecuación td , es conocido como tiempo de duplicación y está definido como el tiempo necesario para duplicar la masa celular. Esta variable como fue mencionado en su oportunidad, puede ser obtenida a partir de la evaluación de la curva típica de crecimiento bacteriano.

Desde el punto de vista de la interacción de los biopéptidos, en el modelo de Monod, existen dos variables que tienen un importante papel, tanto desde el punto de vista físico como químico. μ_{\max} es referida como la máxima velocidad de crecimiento en un medio químicamente definido, a temperatura y pH conocido. El valor de K_s , es inversamente proporcional a la afinidad del microorganismo por el sustrato de su nicho ecológico. De esta forma, se ha observado que, cuando existe un exceso en la concentración de un sustrato orgánico, superior al valor de K_s , se presenta el fenómeno de crecimiento bien sea exponencial o logarítmico. Por otra parte, si la densidad celular es mucho mayor que la concentración del sustrato, éste último es incapaz de soportar un incremento significativo en la biomasa. Cuando esto ocurre, la cinética de desaparición de un compuesto químico existente en altas concentraciones es de orden cero, o se vuelve lineal con el tiempo.

Se han observado dos patrones cinéticos, cuando una sola especie bacteriana es crecida en un medio con un sustrato mineralizable en concentraciones debajo del valor de K_s .

- No se observa incremento en el número de células por la baja concentración de sustrato. El número inicial de células (inóculo) fue demasiado grande con relación a la cantidad del sustrato como para permitir apreciar un incremento significativo en la biomasa. A una biomasa constante con ciertos niveles del sustrato limitante, la velocidad de crecimiento es proporcional a la concentración del sustrato, en lo que se conoce como una cinética de primer orden.
- En un segundo caso se observa, que cuando el tamaño del inóculo es pequeño, bajo estas condiciones la población bacteriana puede desarrollarse, pero a una velocidad específica de crecimiento fluctuante, con una disminución en la concentración del sustrato.

Factores que posiblemente afectan la cinética de biodegradación de los biopéptidos

Si el biopéptido tiene actividad que favorece la proliferación celular, entonces es conveniente disponer de un modelo que permita analizar su degradación.

Como se sabe, la persistencia de un compuesto en el ambiente, bien sea en medio líquido o sólido y su velocidad de degradación por la actividad microbiológica, están determinadas por algunos factores importantes inherentes tanto al microorganismo como a sus enzimas, para el caso particular de los biopéptidos, aún es necesario implementar este tipo de modelo *in vitro*, para obtener resultados concluyentes:

- La disponibilidad del sustrato.
- La cantidad.
- El nivel de actividad.

En el primer caso, la disponibilidad del compuesto para el microorganismo, está determinado por sus propiedades químicas observables en el medio de cultivo, como son su solubilidad en agua, velocidad de disolución, adsorción/desorción (Cork & Krueger, 1991). Por otra parte, en el segundo caso, se ha observado que la velocidad de biodegradación de compuestos orgánicos disponibles, está directamente relacionado con la cantidad de biomasa microbiana y el nivel de actividad que ésta presente sobre el sustrato (Anderson, 1984). Adicionalmente se ha demostrado que algunos factores físico-químicos como el pH, temperatura, humedad y composición del suelo, son importantes reguladores tanto de la actividad microbiológica, como de la velocidad de degradación del compuesto químico (Cork & Krueger, 1991). Para los fines particulares de este tipo de modelo, aun es necesario realizar experimentos concluyentes sobre la inhibición o estimulación de la proliferación celular de los biopéptidos.

Características del sustrato

Estructura

Se ha observado que la alteración por mínima que sea, de la estructura química de un sustrato orgánico, afecta su degradación de manera importante. Por ejemplo, la introducción de grupos polares OH, COOH y NH₂ pueden proporcionar al sistema microbiológico de un sitio de ataque del tipo nucleofílico. Sin embargo, la adición de grupos alquílicos o alogénicos, pueden favorecer molecularmente al sustrato al convertirlo en más resistente a la biodegradación (Bollag, 1974). En el caso de los compuestos aromáticos, la velocidad de degradación, esta relacionada con la posición del sustituyente y el grado de sustitución (Cork & Krueger, 1991).

Solubilidad

De manera general, se considera que los compuestos con una menor solubilidad son más resistentes a la degradación que aquellos compuestos con solubilidad alta. Esto se puede interpretar como que aquellos compuestos con baja solubilidad no ofrecen una adecuada fuente de carbono para favorecer el crecimiento de los microorganismos. Por otra parte, una baja concentración del sustrato en el ambiente, puede originar un decremento en la velocidad de penetración por unidad de tiempo a la célula, lo cual impediría la acción de la maquinaria, sobre

todo de aquellas enzimas intracelulares que participan en el intercambio energético. Bajo estas condiciones, los microorganismos que se localizan en sustratos con baja solubilidad, deben evidenciar ciertas modificaciones para hacer frente a esta presión selectiva. Mientras que algunas bacterias producen emulsificantes, otras originan modificaciones a su superficie celular para incrementar su afinidad por moléculas hidrofílicas y facilitar su absorción. Cuando los organismos crecen únicamente a expensas de sustratos solubles, la velocidad de disolución puede limitar su velocidad de degradación (Cork & Krueger, 1991).

Velocidad de adaptación

Entender bajo qué mecanismos, los microorganismos responden a las presiones selectivas, en este caso representadas por la adición de biopéptidos al medio de cultivo, es fundamental para poder predecir los promedios de degradación o no del hidrolizado peptídico. Se espera que la degradación de estos compuestos sea precedida por un periodo de aclimatación, representada por la fase *lag* en la curva típica de crecimiento. Este periodo para una población microbiológica, puede ser afectado por el promedio y la frecuencia de exposición al hidrolizado peptídico.

Humedad, temperatura y nutrimentos

La actividad puede ser influenciada por los cambios en ciertos factores físicos como la temperatura o el pH. Esta situación puede determinar que un compuesto potencialmente metabolizable como son los biopéptidos pueda o no ser utilizado como fuente de carbono o energía por una o varias poblaciones de microorganismos. Así mismo otros elementos como el porcentaje de materia orgánica, nivel de nutrimentos y humedad, tienen una actividad reguladora importante sobre la actividad degradativa de los microorganismos.

Generalmente se ha encontrado también, que la velocidad de degradación de un compuesto está relacionado en medios líquidos en los cuales, existe una apropiada cantidad de nutrimentos y de microorganismos degradadores (Cork & Krueger, 1991).

*Efecto proliferativo de hidrolizados peptídicos de *Mucuna pruriens* en *E.coli**

Resultados preliminares, obtenidos por el grupo de trabajo de la Red de Biopéptidos, conformada por el cuerpo académico de Fisiología y Fisiopatología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Morelos y el Cuerpo Académico de Desarrollo Alimentario de la Universidad de Yucatán, permiten sugerir la participación de hidrolizados peptídicos de *Mucuna pruriens*, mejor conocido como frijol terciopelo, al favorecer la proliferación celular.

Las cepas utilizadas fueron *Escherichia coli* ATCC 8739 NCIMB 50125 y *Salmonella abony* NCTC 6017 NCIMB 50134, donadas por el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital del Niño Morelense, previamente caracterizadas por su sensibilidad a fluoroquinolonas (FQs). (Wetzstein, 2005). Se utilizaron las enzimas comerciales, Alcalase® y Flavourzyme® de Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, USA) y Merck (Darmstadt, Germany), respectivamente, para la hidrólisis de extractos de *M. pruriens* con tres tratamientos enzimáticos (Alcalase®, Flavourzyme® y Alcalase® + Flavourzyme®) y dos tiempos de hidrólisis (90 y 120 minutos). Estos hidrolizados fueron obtenidos por los miembros de la Red de Biopéptidos de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad de Yucatán.

Cada cepa (*E.coli* ATCC 8739 NCIMB 50125 y *S.abony* NCTC 6017 NCIMB 50134), fue inoculada por estría en caja petri con agar Luria Bertani (LB) previamente preparada con una concentración final de 3 µg/mL para cada uno de los seis hidrolizados de PBA. La concentración del fármaco fue calculada tomando como base la susceptibilidad reportada a FQs (Wetzstein, 2005). En ambos casos, se inocularon cajas con agar LB sin PBA, como control positivo. Las cajas con el inóculo se incubaron a 37°C efectuándose la lectura 24 horas después. No existen reportes previos de la actividad antibacterial de los PBAs de *M.pruriens*, por lo cual los resultados reportados en este trabajo, son inéditos. En cada uno de los tratamientos y su control positivo, se observó proliferación de incontables UFC (Unidades Formadoras de Colonias) tanto para las cajas petri inoculadas con *E.coli* ATCC 8739 NCIMB 50125 como con *S.abony* NCTC 6017 NCIMB 50134. Lo anterior, a pesar de que las concentración final de cada PBA (3 µg/mL) para cada tratamiento, fue superior en dos órdenes de magnitud a la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) reportada para ambas cepas (FQs: Sarafloxacina, Pradofloxacaina, Danofloxacina, Difloxacina, Enrofloxacina, Ciprofloxacina y Moxifloxacina). Estos datos permiten sugerir que contrario a lo reportado en la literatura, los PBAs obtenidos por hidrólisis enzimática de extractos proteínicos de *M.pruriens*, más que actividad antimicrobiana, podrían estar relacionados con la estimulación de la proliferación celular (Figuras 13 y 14), sin embargo es necesario desarrollar más experimentos en los modelos biológicos que se han descrito previamente.

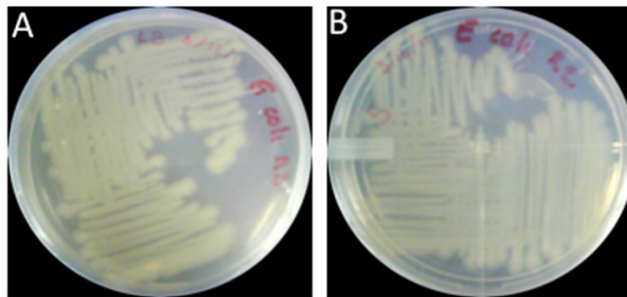


Figura 13. *Escherichia coli* ATCC 8739 en medio de cultivo agar LB como control positivo (A) y suplementado (B) con el hidrolizado 5 de *Mucuna pruriens*

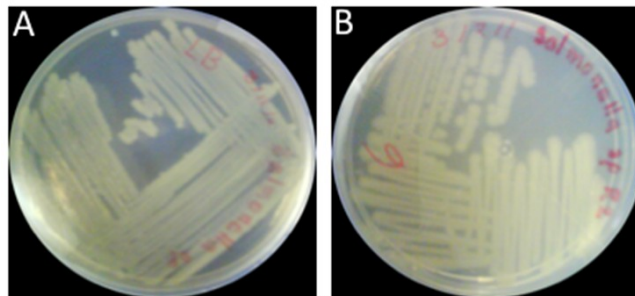


Figura 14. *Salmonella abony* NCTC 6017 NCIMB 50134 inoculada en medio de cultivo agar LB como control positivo (A) y suplementado (B) con el hidrolizado 6 de *Mucuna pruriens*

4. Conclusión

Los avances metodológicos en los procedimientos de cultivos celular, han establecido las condiciones adecuadas para el cultivo de diferentes poblaciones celulares, entre las que destacan queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos, neuronas, miocitos, hepatocitos, etc. Contar con las condiciones de propagación permite establecer poblaciones homogéneas con lo cual es posible realizar estudios bioquímicos. Los diferentes procedimientos establecidos actualmente brindan la oportunidad de caracterizar efectos antiproliferativos, antiapoptóticos, citotóxicos, antioxidantes y efectos antibióticos que combinados con estrategias experimentales de alta capacidad y eficiencia (High Throughput Screening, por sus siglas en inglés) adecuadamente estandarizados tanto de aislamiento, cultivo, caracterización y detección de respuestas celulares o de marcadores selectivos de respuestas celulares abren la posibilidad de identificar nuevos compuestos con posibles aplicaciones en el campo de la salud, particularmente relevante el desarrollo de alimentos funcionales con el objetivo de controlar enfermedades crónico degenerativas o disminuir sus complicaciones.

Agradecimientos

Agradecimiento especial a las siguientes personalidades: Dr. Luis Chel Guerrero, Dr. David Betancur Ancona, Dr. Juan Torruco Uco, M en C. Saulo Galicia Martínez, Biol. Elizabeth Negrete León, quienes participaron activamente en la producción de los hidrolizados así como Francisco Iñigo García Esquivel por su participación en los ensayos *in vitro* y el diseño de figuras. Así mismo, a las entidades que brindaron el apoyo económico para la realización del proyecto: RUBIO-PHARMA, PROMEP, FARMED-CONACYT.

Referencias

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed., New York, Garland Science.

Alho, H., & Leinonen, J. (1999). Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods. *Method. Enzymol.*, 299, 3-15. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99004-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99004-3)

Altman J. (2006). Endocrine receptors as targets for new drugs. *Neuroendocrinology*, 83, 282-8. <http://dx.doi.org/10.1159/000095337>

Amabile-Cuevas, CF. (2012). Antibiotic Resistance: From Darwin to Lederberg to Keynes. *Microb Drug Resist.* Fundación Lusara , Mexico City, México. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2012.0115>

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., & Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7915-7922. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.17.7915>

- Anderson, J. (1984). Herbicide degradation in soil: influence of microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 16, 483–489. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(84\)90056-7](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(84)90056-7)
- Arencibia-Arrebola, D.F., Rosario-Fernández, L.A., & Curveco-Sánchez, D.L. (2003). Principales principios para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Retel.*, 40-53.
- Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., & Wilson, J.M. (1998a). Human Odefensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J. Clin. Invest.*, 102, 874-880. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI2410>
- Bals, R., Goldman, M.J., & Wilson, J.M. (1998b). Mouse O-defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. *Infect. Immun.*, 66, 1225-1232.
- Bayraktar, S., & Rocha-Lima, C.M. (2012). Emerging cell-cycle inhibitors for pancreatic cancer therapy. *Expert Opin. Emerg. Drugs, Nov.*, 5.
- Berridge, M.B., Tan, A.S., McCoy, K.D., & Wang, R. (1996). The biochemical and cellular basis of cell proliferation assay that the tetrazolium salts. *Biochemica*, 4, 14-19.
- Bird, B.R., & Forrester, F.T. (1981). *Basic Laboratory Techniques in Cell Culture*. Department of health and human services, CDC, Atlanta.
- Bollag, J.M. (1974). Microbial Transformation of Pesticides. *Adv. Appl. Microbiol.* 18, 75-130. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70570-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70570-7)
- Borg, J., Spitz, B., Hamel, G., & Mark, J. (1985). Selective culture of neurons from rat cerebral cortex: morphological characterization, glutamate uptake and related enzymes during maturation in various culture media. *Brain Res.*, 350(1-2), 37-49.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chem.*, 118, 559-565. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.021>
- Brand, N.J. (1997). Myocyte enhancer factor 2 (MEF2). *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Dec., 29(12), 1467-1470.
- Brown, C.J., Lim, J.J., Leonard, T., Lim, H.C., Chia, C.S., Verma, C.S., & Lane, D.P. (2011). Stabilizing the eIF4G1 α -helix increases its binding affinity with eIF4E: implications for peptidomimetic design strategies. *J. Mol. Biol. Jan.* 21, 405(3), 736-753.
- Calva, J.J., Niebla-Perez, A., Rodriguez-Lemoine, V., Santos, J.I., & Amabile-Cuevas, C.F. (1996). Antibiotic usage and antibiotic resistance in Latin America. En: Amabile-Cuevas, C.F. (Ed.). *Antibiotic resistance: from molecular basics to therapeutic option*. Chapman and Hall, 1st edition, R.G. Landes Company, USA, 73-97.

Chance, B., & Maehly, A.C. (1955). Assay of catalases and peroxidases. En: Colowick S.P., Kaplan N.O., (Eds.). *Methods in enzymology*. New York: Academic, 764-765.

Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life. Sci.* 61, 192-208. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>

Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., & Lesnefsky, E.J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.*, 278, 36027-36031. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M304854200>

Connie R.M., Lehman D.C., & Manusseli, G. (2010). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. (4th Ed.). Saunders Elsevier.

Cork, D.J., & Krueger, J.P. (1991). *Microbial transformations of herbicides and pesticides. Advances in applied microbiology*. Academic, Press, Inc.

Davies, K.J. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.*, 61, 1-31.

deFazio, A., Leary, J.A., Hedley, D.W., & Tattersall, M.H. (1987). Immunohistochemical detection of proliferating cells in vivo. *J. Histochem. Cytochem.*, May., 35(5), 571-577.

de Leeuw, E., Li, C., Zeng, P., & Li, C. (2010). Diepeveen-de Buin, M., Lu, W.Y., Breukink, E. & Lu, W. Functional interaction of human neutrophil peptide-1 with the cell wall precursor lipid II. *FEBS Lett.*, 584, 1543-1548. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.004>

Des-Raj, K., Minhui, W., Li-Hui, L., Geert-Jan, B., Dipika, G., & Roman, D. (2011). Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating protein-sensing two-component systems. *Nature Medicine*, 17(6).

Dong, S.Y., Zeng, M.Y., Wang, D.F., Liu, Z.Y., Zhao, Y.H., & Yang, H.C. (2008). Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chem.*, 107, 1485-1493. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.011>

Donia, M.S., Wang, B., Dunbar, D.C., Desai, P.V., Patny, A., Avery, M., & Hamann, M.T. (2008). Mollamides B and C, Cyclic hexapeptides from the Indonesian tunicate *Didemnum molle*. *J. Nat. Prod.*, Jun., 71(6), 941-945.

Driscoll, D.L., Steinkampf, R.W., Paradiso, L.J., Kowal, C.D., & Klohs, W.D. (1996). Lack of effect of corticosteroids and tamoxifen on suramin protein binding and in vitro activity. *Eur. J. Cancer*, Feb., 32A(2), 311-315.

Duchrow, M., Schlüter, C., Key, G., Kubbutat, M.H., Wohlenberg, C., Flad, H.D., & Gerdes, J. (1995). Cell proliferation-associated nuclear antigen defined by antibody Ki-67: a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 43(2), 117-121.

- Duh, P.D. (1998). Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linne): its scavenging effect on free radical and active oxygen. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 75, 455-465. <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-998-0248-8>
- Dulbecco, R., & Vogt, M. (1954). Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.*, 99(2), 167-182. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.99.2.167>
- Eagle, H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122, 501-514. <http://dx.doi.org/10.1126/science.122.3168.501>
- Eagle, H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 130, 432-437. <http://dx.doi.org/10.1126/science.130.3373.432>
- Eagle, H. (1960). The sustained growth of human and animal cells in a protein-free environment. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 46(4), 427-432. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.46.4.427>
- Elmastas, M., Gulcin, I., & Isildak, O. Radical scavenging activity and antioxidante capacity of Bay leaf extracts. *J. Iran Chem Soc.*, 3(3), 1258-266.
- Evans, M.S., Madhunapantula, S.V., Robertson, G.P., & Drabick, J.J. (2013). Current and future trials of targeted therapies in cutaneous melanoma. *Adv Exp Med Biol.*, 779, 223-255. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-6176-0_10
- Fink, S.L., & Cookson, B.T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 7, 1907-1916. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>
- Fisher, H.W., Puck, T.T., & Sato, G. (1958). Molecular growth requirements of single mammalian cells: The action of fetuin in promoting cell attachment to glass. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 44(1), 4-10. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.44.1.4>
- Fita, I., & Rossman MG. (1985). The NADPH binding site on liver catalase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 82, 1604-1608. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.82.6.1604>
- Freshney, R.I. (2011). *Culture of Animal Cells: A Manual of basic technique and specialized applications* (6th Ed.). John Wiley and Sons Ltd.
- Fridovich, I. (1974). *Superoxide dismutases*. In: *Advances in Enzymology* in Meister, A. (Ed.). 35-97. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA.
- Genova, M.L., Ventura, B., Giuliano, G., Bovina, C., Formiggini, G., Parenti, C.G., & Lenaz, G. (2001). The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Lett.*, 505, 364-368. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02850-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02850-2)

Grossman, L.I., Watson, R., & Vinograd, J. (1974). Restricted uptake of ethidium bromide and propidium iodide by denatured closed circular DNA in buoyant cesium chloride. *J. Mol. Biol., Jun., 25, 86(2)*, 271-283.

Hadju, J., Wyss, S.R., & Aebi, H. (1977). Properties of human erythrocyte catalases after crosslinking with bifunctional reagents: symmetry of the quaternary structure. *Eur. J. Biochem., 80*, 199-207. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11872.x>

Hall, P.A., Levison, D.A., Woods, A.L., Yu, C.C., Kellock, D.B., Watkins, J.A., Barnes, D.M., Gillett, C.E., Camplejohn, R., Dover, R. et al. (1990). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathol., Dec., 162(4)*, 285-294.

Hall, R.M., Recchia, G.D., Collis, C.M., Brown, H.J., & Stokes, H.W. (1996). Gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. En Amabile-Cuevas, C.F. (Ed.). *Antibiotic resistance: from molecular basics to therapeutic option*. Chapman and Hall, 1st edition, R.G. Landes Company, USA, 19-34.

Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth. Enzymol., 186*, 1-85. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86093-B](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(90)86093-B)

Hamanaka, R.B., & Chandel N.S. (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signalling and dictate biological outcomes. *Trends. Biochem. Sci., 35*, 505-513. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.002>

Hanks, J.H. (1948). The longevity of chick tissue cultures without renewal of medium. *J. Cell Comp. Physiol., 31(2)*, 235-260. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.1030310209>

Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., & Schröder, J.M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature, 387*, 861. <http://dx.doi.org/10.1038/43088>

Harman, D. (1956). Aging theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol., 11(3)*, 298-300. <http://dx.doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>

Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., & Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet, 342*, 1007-1014. [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)92876-U](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(93)92876-U)

Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., & Ezekowitz, R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science, 284*, 1313-1318. <http://dx.doi.org/10.1126/science.284.5418.1313>

Holm, M., Thomsen, M., Høyer, M., & Hokland, P. (1998). Optimization of a flow cytometric method for the simultaneous measurement of cell surface antigen, DNA content, and *in vitro* BrdUrd incorporation into normal and malignant hematopoietic cells. *Cytometry, May, 1, 32(1)*, 28-36.

- Hsu, K.C. (2010) Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chem.*, 122, 42-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.013>
- Jacob, R.A., & Bum, B.J. (1996). Oxidative damage and defense. *American Journal of Clinical Nutrition*, 63, 985s-990s.
- Je, J.Y., Park, P.J., & Kim, S.K. (2005) Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Res. Int.*, 38, 45-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2004.07.005>
- Klompong, V., Benjakul, S., Yachai, M., Visessanguan, W., Shahidi, F., & Hayes, K. (2009). Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). *J. Food Sci.*, 74, C126-C133. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01047.x>
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N., & Andreyev, A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem. J.*, 368, 545-553. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20021121>
- Kutchan, T.M. (1994). Alkaloid biosynthesis-the bases for metabolic engineering of medicinal plants. *The plant cell.*, 7, 1059-1070.
- Lam, K.W., Wang, L., Hong, B.S., & Treble, D. (1993). Purification of phospholipid hydroxiperoxide glutathione peroxidase from bovine retina. *Curr. Eye. Res.*, 12(1), 9-15. <http://dx.doi.org/10.3109/02713689308999490>
- Lambeth, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181-189. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1312>
- Lardinois, O.M., Mestdagh, M., & Rouxhet, P.G. (1996). Reversible inhibition and irreversible inactivation of catalase in presence of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta*, 1295, 222-238. [http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838\(96\)00043-X](http://dx.doi.org/10.1016/0167-4838(96)00043-X)
- Levy, S.B. (1998). The challenge of the antibiotic resistance. *Scientific American*, 278, 32-39. <http://dx.doi.org/10.1038/scientificamerican0398-46>
- Lin, M.T., & Beal, M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443, 787-795. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05292>
- Liu, Y., Fiskum, G., & Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.*, 80, 780-787. <http://dx.doi.org/10.1046/j.0022-3042.2002.00744.x>
- Lockshin, R.A., & Zakeri, Z. (2007). Cell death in health and disease. *Journal of cellular and molecular medicine*, 11, 1214-1224. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00150.x>

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell J. (2002). *Biología Celular y Molecular*. 4 th Ed., New York, Freeman and Company eds., 595-597.

Madureira, A.R., Tavares, T., Gomes, A.M., Pintado, M.E., & Malcata, F.X. (2010). Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *J. Dairy Sci., Feb.*, 93(2), 437-455. Review.

Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F.K., & Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *FEBS J.* 275, 3959-3970. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x>

Marklund, S.L. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7634-7638. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.79.24.7634>

Matsuzaki, K. (2001). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self defense? *Biochem. Soc. Trans.*, 29, 598-601. <http://dx.doi.org/10.1042/BST0290598>

Melik-Adamyan, W., Bravo, J., Carpena, X., Switala, J., Maté, M.J., Fita, I., & Loewen, P.C. (2001). Substrate flow in catalases deduced from the crystal structures of active site variants of HPII from *Escherichia coli*. *Proteins*, 44, 270-281. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.1092>

Meng, T.C., Fukada, T., & Tonks, N.K. (2002). Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol. Cell*, 9, 387-399. [http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00445-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00445-8)

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A., & Van Remmen, H. (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 477-503. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.034>

Murphy, M.P., Holmgren, A., Larsson, N.G., Halliwell, B., Chang, C.J., Kalyanaraman, B. et al. (2011). Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab.*, 13, 361-366. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.010>

Neve, J., Vertongen, F., & Molle, I. (1985). Selenium deficiency. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 14, 629-656. [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-595X\(85\)80010-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-595X(85)80010-4)

Norton, F. (2000). Dye exclusion viability assays using a hemacytometer. *Tech. Note. Nalge. Nunc. International Corp.*, 3(25), 67-68.

Olson, J.A., & Krinsky, N.I. (1995). Introduction: the colorful fascinating world of carotenoids: important biological modulators. *FEBS Letters*, 9, 1547-1550.

- Omar, B.A., Flores, S.C., & McCord, J.M. (1992), Superoxide dismutase: Pharmacological developments and applications. *Adv. Pharmacol.*, 23, 109-161. [http://dx.doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60964-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60964-3)
- Organización Panamericana de la Salud (2005). Criterios científicos para los ensayos de bioequivalencia (*in vivo* e *in vitro*), las bioexenciones y las estrategias para su implementación.
- Palozza, P., & Krinsky, N.I. (1992). Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: an overview. *Methods in Enzymology*, 268, 127-136.
- Parker, C.T., & Sperandio, V. (2009). Cell-to-cell signalling during pathogenesis. *Cell Microbiol. Mar.*, 11, 363-9.
- Parker, R.C. (1961). *Methods of Tissue Culture*. Paul Haeber.
- Perry, A.F., & Hegeman, A.D. (2007). *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Oxford University Press.
- Pihlanto, A., Akkanen, S., & Korhonen, H.J. (2008). ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*). *Food Chem.*, 109, 104-112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.023>
- Rangel, M., Prado, M.P., Konno, K., Naoki, H., Freitas, J.C., & Machado-Santelli, G.M. (2006). Cytoskeleton alterations induced by *Geodia corticostylifera* depsipeptides in breast cancer cells. *Peptides, Sep.*, 27(9), 2047-2057.
- Ratajczak, M.Z., Kim, C.H., Abdel-Latif, A., Schneider, G., Kucia, M., Morris, A.J. et al. (2012). A novel perspective on stem cell homing and mobilization: review on bioactive lipids as potent chemoattractants and cationic peptides as underappreciated modulators of responsiveness to SDF-1 gradients. *Leukemia, Jan.*, 26(1), 63-72.
- Ravella, D., Kumar, M.U., Sherlin, D., Shankar, M., Vaishnavi, M.K., & Sekar, K. (2012). SMS 2.0: an updated database to study the structural plasticity of short peptide fragments in non-redundant proteins. *Genomics Proteomics Bioinformatics, Feb.*, 10(1), 44-50.
- Repetto, M. (2002). *Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro*. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group. Tercera edición, 303-305.
- Reuschenbach, M., Seiz, M., von Knebel-Doerberitz, C., Vinokurova, S., Duwe, A., Ridder, R. et al. (2012). Evaluation of cervical cone biopsies for coexpression of p16INK4a and Ki-67 in epithelial cells. *Int. J. Cancer, Jan.*, 15, 130(2), 388-394.
- Rice-Evans, C., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., & Pridham, J.B. (1995) The relative antioxidant activity of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research* 22, 375-383. <http://dx.doi.org/10.3109/10715769509145649>
- Rice-Evans, C., & Miller, N.J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24, 790-795.

Rock, C.L., Jacob, R.A., & Bowen, P.E. (1996). Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *Journal of the American Dietetics Association*, 96, 693-702. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-8223\(96\)00190-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-8223(96)00190-3)

Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., & Bonina, F. (1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic Biol Med.*, 19, 481-486. [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00240-K](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(94)00240-K)

Salazar-Aranda, R., Pérez-López, L.A., López-Arroyo, J., Alanís-Garza, B.A., & Waksman, T. (2009). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Plants from Northeast of Mexico. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2011, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep127>

Sass, V., Schneider, T., Wilmes, M., Körner, C., Tossi, A., Novikova, N. et al. (2010). Human O-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in Staphylococci. *Infect. Immun.*, 78, 2793-2800. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00688-09>

Schlüter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Becker, M.H., Key, G., Flad, H.D., & Gerdes, J. (1993). The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J. Cell Biol.*, Nov., 123(3), 513-522.

Silano, M., & De Vincenzi, M. (1999). Bioactive antinutritional peptides derived from cereal prolamins: a review. *Nahrung, Jun.*, 43(3), 175-184.

Stoklosowa, S., Leško, J., Kusina, E., & Galas, J. (1995). Microcarrier culture: A different approach to granulosa cell cultivation. *Cytotechnology, Jun.*, 19(2), 167-172.

St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., & Brand, M.D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.*, 277, 44784-44790. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M207217200>

Steiner, H., Hultmark, D., Engström, Å., Bennich, H., & Boman, H.G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292, 246-248. <http://dx.doi.org/10.1038/292246a0>

Suetsuna, K., Ukeda, H., & Ochi, H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J. Nutr. Biochem.*, 11, 128-131. [http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2863\(99\)00083-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2863(99)00083-2)

Tenorio-Borroto, E., Peñuelas-Rivas, C.G., Vásquez-Chagoyán, J.C., Prado-Prado, F.J., García-Mera, X., & González-Díaz, H. (2012). Immunotoxicity, Flow Cytometry and Chemoinformatics: A Review, Bibliometric Analysis and a new model of drug cytotoxicity on macrophages. *Curr. Top. Med. Chem.*, Sep., 20.

The UniProt Consortium (2012). Update on activities at the Universal Protein Resource(UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Res.*, Nov., 17. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23161681.

- Traber, M.G., & Sies, H. (1996). Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annual Reviews of Nutrition*, 16, 321-347. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nu.16.070196.001541>
- Trachootham, D., Alexandre, J., & Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 579-591. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2803>
- Tizón, J.L., Clèries, X. & Neri, D. (2012). *¿Bioingeniería o medicina?: El futuro de la medicina y la formación de los médicos*. Fundació Congrés Català de Salut Mental. Red Ediciones S.L.
- Valore, E.V., Park, C.H., Quayle, A.J., Wiles, K.R., McCray, P.B. Jr., & Ganz, T. (1998). Human Odefensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J. Clin. Invest.*, 101, 1633-1642. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI1861>
- Van Craenenbroeck, E.M., Van Craenenbroeck, A.H., Van Ierssel, S., Bruyndonckx, L., Hoymans, V.Y., Vrints, C.J., & Conraads, V.M. (2012). Quantification of circulating CD34(+)/KDR(+)/CD45(dim) endothelial progenitor cells: Analytical considerations. *Int. J. Cardiol.*, Nov., 18. doi:p11: S0167-5273(12)01422-2. 10.1016/j.ijcard.2012.10.047.
- Ushio-Fukai, M. (2009). Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function. *Antioxid Redox Signal*, 11, 2517-2533. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2009.2582>
- Vertechy, M., Cooper, M.B., Ghirardi, O., & Ramacci, M.T. (1993). The effect of age on the activity of enzymes of peroxide metabolism in rat brain. *Exp. Gerontol.*, 28(1), 77-85. [http://dx.doi.org/10.1016/0531-5565\(93\)90022-6](http://dx.doi.org/10.1016/0531-5565(93)90022-6)
- Wagner, A.H., Kautz, O., Fricke, K., Zerr-Fouineau, M., Demicheva, E., Guldenzoph, B. et al. (2009). Upregulation of glutathione peroxidase offsets stretch-induced proatherogenic gene expression in human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 29, 1894-1901. <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.194738>
- Wall, M.E. (1998). Camptothecin and taxol: Discovery to clinic. Research Triangle Institute. *Med. Res. Rev.*, 18(5), 299-314. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1128\(199809\)18:5<299::AID-MED2>3.0.CO;2-O](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-1128(199809)18:5<299::AID-MED2>3.0.CO;2-O)
- Wall, M.E., Krider, M.M., Krewson, C.F., Eddy, C.R., Willaman, J.J., Correl, D.S., & Gentry, H. (1954). *J. Amer. Pharm. Assoc.* 43, 1.
- Wang, G., Reed, E., & Li, Q.Q. (2004) Molecular basis of cellular response to cisplatin chemotherapy in non-small cell lung cancer (Review). *Oncol Rep.*, 12, 955-65.
- Weber, P., Bendich, A., & Schalch, W. (1996). Vitamin C and human health—a review of recent data relevant to human requirements. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 66(1), 19–30.
- Weisiger, R.A., & Fridovich, I. (1973). Mitochondrial superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 248, 4793-4796.

Wetzstein, H.G. (2005). Comparative Mutant Prevention Concentrations of Pradofloxacin and Other Veterinary Fluoroquinolones Indicate Differing Potentials in Preventing Selection of Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(10). <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.10.4166-4173.2005>

Wlodkovic, D., Skommer, J., & Darzynkiewicz, Z. (2012). Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. *Exp. Oncol., Oct.*, 34(3), 255-262.

Wu, H.C., Chen, H.M., & Shiau, C.Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res. Int.*, 36, 949-957. [http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00104-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00104-2)

Yasuhiro, Y., & Yasuyoshi, O. (2012). Antimicrobial peptide defensin: Identification of novel isoforms and the characterization of their physiological roles and their significance in the pathogenesis of diseases. *Proc. Jpn. Acad. Ser. Biol. Sci.*, 88.

Zachara, B.A. (1991). Mamalian selenoproteins. *J. Trace. Elem. Electrolytes Health Dis.*, 6(3), 137-145.

Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 5449-5453. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.84.15.5449>

Zolnai, A., Tóth, E.B., Wilson, R.A., & Frenyó, V.L. (1998). Comparison of 3H-thymidine incorporation and CellTiter 96 aqueous colorimetric assays in cell proliferation of bovine mononuclear cells. *Acta. Vet. Hung.*, 46(2), 191-197.