

Los lípidos de la membrana actúan como moduladores de la actividad permeabilizante de Sticholisina II, una toxina formadora de poros con aplicaciones biomédicas

✉ Diana Martínez¹, Carlos Álvarez^{1,2}, Mayra Tejuca¹, Fabiola Pazos¹, Aisel Valle¹, Lesly Calderón¹, Uris Ros Quincoces¹, Iscel Díaz¹, David Pentón¹, María E Lanio¹

¹ Centro de Estudio de Proteínas. Facultad de Biología, Universidad de La Habana
Calle 25 número 455 e/ J e I, Vedado, CP 10400, Ciudad de La Habana, Cuba

² Instituto de Química, Universidad de São Paulo, Brasil
E-mail: dmcb@fbio.uh.cu

RESUMEN

La *Sticholisina I* y la *II* (St I y St II) son citolisinas producidas por la anémona *Stichodactyla helianthus*, que forman poros oligoméricos en las membranas. Entre sus posibles aplicaciones está la obtención de inmunotoxinas contra células indeseadas, así como utilización como herramientas para la liberación de antígenos encapsulados en liposomas, al citosol celular. Para lograr la efectividad de tales preparaciones, es imprescindible el conocimiento de los eventos moleculares involucrados en la formación del poro. La acción de estas proteínas transcurre en dos pasos, mediados por zonas diferentes de la molécula: un parche de aminoácidos aromáticos expuesto en la superficie de la molécula, involucrado en la unión inicial a la membrana y una alfa-hélice anfifílica, ubicada en el segmento amino terminal (Nt), que participa en la formación del poro. En esta investigación se caracterizó la influencia de los componentes lipídicos mayoritarios de la membrana sobre la actividad funcional de St II. Además, se demostró la factibilidad de modelar conformacional y funcionalmente secuencias relevantes de la proteína, mediante la utilización de un péptido sintético que mimetiza su Nt. Se demostró que la presencia conjunta de esfingomielina y colesterol incrementa la asociación a la membrana y su capacidad permeabilizante, lo cual parece estar relacionado con la formación de microdominios lipídicos. La función de los lípidos formadores de fases diferentes a la bicapa, al parecer está relacionada con la formación de un poro lipídico toroidal.

Introducción

Las *sticholisinas* son citolisinas formadoras de poro, producidas por la anémona marina *Stichodactyla helianthus*, ampliamente distribuida en las costas de Cuba. Estas proteínas pertenecen a la familia de las *actinoporinas*, y se caracterizan por tener elevada homología secuencial, masa molecular de 20 kDa aproximadamente, punto isoeléctrico básico, estructura secundaria compuesta por hojas- β y la capacidad de formar poros oligoméricos en membranas naturales y modelos [1]. Las *sticholisinas* exhiben una potente actividad lítica, en el orden picomolar, frente a eritrocitos de diferentes especies de mamíferos. Además, estas toxinas presentan ligera actividad fosfolipásica de tipo A_2 y ejercen un potente efecto citotóxico sobre células del parásito *Giardia duodenalis* [2, 3]. Las toxinas formadoras de poros son moléculas únicas, por su capacidad de insertarse espontáneamente en la membrana, en la cual forman canales hidrofílicos. Además de ser consideradas importantes factores de virulencia o instrumentos de defensa producidos por numerosos organismos, constituyen sistemas modelo para el estudio de la inserción de las proteínas y de su autoensamblaje en las membranas.

En los últimos años se ha estado realizando un estudio extensivo de las *sticholisinas*, que abarca su purificación y caracterización molecular [2], la determinación de sus estructuras: primaria [4] y secundaria [5, 6], la determinación de la estructura tridimensional de St II por difracción de rayos X [7], hasta el estudio del mecanismo de formación de poros en las membranas [8, 9]. Las investigaciones han comprobado también el efecto de diferentes factores del medio, como la fuerza iónica [10] y el pH [11], sobre la conformación y la actividad lítica de las proteínas.

El mecanismo de acción de las actinoporinas transcurre en dos pasos, mediados por diferentes zonas de la molécula. La unión inicial de la proteína a la membrana ocurre por un parche de residuos aminoacídicos aromáticos, expuesto en la superficie de la molécula. Posteriormente, la hélice anfifílica, ubicada en el segmento amino terminal, se transfiere a la interfaz lipídica, donde se coloca extendida sobre la membrana. Finalmente, a partir de las hélices de cuatro unidades monoméricas se forma el poro transmembranoso [12].

Las actinoporinas son toxinas muy potentes, que afectan a casi todas las células eucariontes sobre las cuales han sido ensayadas. La razón para esta aparente baja selectividad es que emplean la esfingomielina, un lípido ubicuo en las células animales, como aceptor de baja afinidad. En esta investigación se caracteriza la influencia de los componentes lipídicos principales de las membranas sobre la actividad funcional de una proteína perteneciente a la familia de las actinoporinas, con la utilización de diferentes sistemas modelo de membrana, tales como monocapas lipídicas y liposomas.

Materiales y métodos

Purificación de las toxinas

En las costas de Ciudad de La Habana, se colectaron los ejemplares de la anémona *Stichodactyla helianthus*. La purificación de las proteínas se realizó según Lanio y sus colaboradores [2].

Interacción de las sticholisinas con monocapas lipídicas

La inserción de las toxinas en monocapas lipídicas se evaluó utilizando un equipo m-Through (Kibron, Fin-

1. Anderluh G, Macek P. *Toxicon* 2002; 40:111-24.
2. Lanio ME, Morera V, Álvarez C, Bejuca M, Gómez T, Pazos F, Besada V, Martínez D, Huerta V, Padrón G, Chávez MA. *Toxicon* 2001;39:187-94.
3. Bejuca M, Anderluh G, Macek P, Marcel R, Torres D, Sarracent J, Álvarez C, Lanio ME, Dalla Serra M, Menestrina G. *Int J Parasitol* 1999;29:489-98.
4. Huerta V, Morera V, Guanche Y, Chinae G, González LJ, Betancourt L, Martínez D, Álvarez C, Lanio ME, Besada V. *Toxicon* 2001;39:1253-6.
5. Martínez D, Campos AM, Pazos F, Álvarez C, Lanio ME, Casallanovo F, Schreier S, Salinas VK, Vergara C, Lissi E. *Toxicon* 2001;39:1547-60.
6. Menestrina G, Cabiaux V, Bejuca M. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:174-80.
7. Mancheño JM, Martín-Benito J, Martínez-Ripoll M, Gavilanes JG, Hermoso JA. *Structure* 2003;11(11):1319-28.
8. Bejuca M, Dalla Serra M, Ferreras M, Lanio ME, Menestrina G. *Biochemistry* 1996;35:14947-57.
9. Bejuca M, Dalla Serra M, Potrich C, Álvarez C, Menestrina G. *J Membr Biol* 2001;183:125-35.
10. Álvarez C, Lanio ME, Bejuca M, Martínez D, Pazos F, Campos AM, Encinas MV, Pretiñes T, Schreier S, Lissi EA. *Toxicon* 1998;36:165-78.
11. Álvarez C, Pazos IF, Lanio ME, Martínez D, Schreier S, Casallanovo F, Campos AM, Lissi E. *Toxicon* 2001;39: 539-53.

✉ Autor de correspondencia

landia). Para preparar las monocapas, se depositó la mezcla lipídica correspondiente, previamente obtenida en cloroformo: metanol (2:1, v:v), sobre la superficie del tampón Hepes 10 mM, NaCl 200 mM, pH 7 (HBS), hasta alcanzar la presión inicial deseada. En la subfaz se añadió la toxina (0.93 mmol.L⁻¹) y se registraron los cambios de presión superficial en el tiempo, a 25 °C y con agitación constante.

Espectroscopia de fluorescencia

Los experimentos de titulación con vesículas se realizaron con una cantidad fija de toxina, a la cual se le añadieron cantidades crecientes de liposomas, y se registró la emisión a 334 nm, después de la excitación a 295 nm [5].

Obtención y caracterización de las vesículas liposomales

Las mezclas lipídicas se prepararon a partir de soluciones en cloroformo: metanol de los siguientes lípidos: fosfatidilcolina de yema de huevo (FC), esfingomielina de cerebro bovino (EM), 1,2-diioleil-sn-glicerol-3-fosfatidiletanolamina (FE) (Avanti Polar Lipids) y colesterol (Sigma). La mezcla de lípidos se secó en un evaporador rotatorio al vacío, y la película lipídica se hidrató en tampón Hepes 10 mmol.L⁻¹, NaCl 50 mmol.L⁻¹, ANTS 25 mmol.L⁻¹, DPX 90 mmol.L⁻¹, pH 7.5, mediante ciclos alternos de agitación exhaustiva en vortex y baño ultrasónico, hasta la resuspensión total para obtener MLV. Las suspensiones liposomales después de cinco ciclos de congelación/descongelación, se sometieron a 10 ciclos de extrusión a 45 °C, empleando filtros de policarbonato de 100 nm (Nucleopore, EE.UU.).

Las vesículas se separaron del material no encapsulado, por filtración en gel en una columna empacada con Sephadex G-75 y preequilibrada con el tampón HBS. El contenido de fosfolípidos en las preparaciones liposomales se determinó mediante el método descrito por Kates [13]. La concentración de Col se obtuvo utilizando un juego de reactivos (1.14830.001) suministrado por Merck (Alemania).

Evaluación de la actividad permeabilizante de la toxina en vesículas cargadas con fluoróforos

La intensidad de fluorescencia del fluoróforo liberado al medio extravascular por acción de la toxina, se determinó con el empleo de un espectrofluorímetro SLM AMINCO MC-200 (EE.UU.), según lo descrito por Caaveiro y sus colaboradores [14]. La liberación total de la sonda se obtuvo por adición de Tritón X-100, a una concentración final en el ensayo de 0.1% (p/v).

Resultados y discusión

Con el propósito de profundizar en la contribución de los lípidos mayoritarios de las membranas animales en la interacción de St II con la membrana, se emplearon monocapas lipídicas y vesículas liposomales. Los resultados se muestran en la tabla 1.

La inserción de la toxina en monocapas lipídicas se caracterizó mediante la presión crítica (p_c), utilizando como referentes los valores de presión superficial en una membrana biológica (35 mN.m⁻¹, 15) y la presión de equilibrio de los lípidos en las monocapas estudiadas (47 mN.m⁻¹, resultados no mostrados). Ello per-

Tabla 1. Efecto de la composición lipídica sobre la acción de St II

Composición lipídica	π_c^1 (mN.m ⁻¹)	F_L/F_0^2	C_{50}^3 (nM)	t_{50}^4 (s)
FC:EM (50:50)	44.9	1.24 ± 0.07	48	60
FC:Col (70:30)	31.8	1.07 ± 0.01	82	240
EM:FC:Col (50:15:35)	51.8	1.57 ± 0.09	25	20
FC:FE (70:30)	32.2	1.00	> 1160	∞
EM:FC:FE (50:35:15)	43.6	1.25 ± 0.03	50	50
EM:Col:FE (50:35:15)	51.9	1.53 ± 0.03	25	20

¹ Presión crítica determinada por extrapolación al eje de las abscisas de la recta de regresión del gráfico de $\Delta\pi$, en función de la presión inicial de la monocapa. En todos los casos, los valores de r^2 fueron superiores a 0.76.

² Relación entre las intensidades de fluorescencia de la toxina ligada (F_L) y la libre (F_0) para cada composición lipídica, estimada a partir del ajuste a la función de Boltzman de los datos de incremento de la fluorescencia en función de la concentración de lípido. En todos los casos, los valores de χ^2 fueron inferiores a 1.72×10^{-4} .

³ Concentración de toxina requerida para lograr la permeabilización de la mitad de las vesículas presentes en el ensayo.

⁴ Tiempo necesario para lograr la permeabilización de la mitad de las vesículas presentes en el ensayo.

mitió agrupar las composiciones estudiadas en tres grupos: por una parte, las mezclas que no contenían EM, es decir FC:Col y FC:FE presentaron valores de $p_c < 35$ mN.m⁻¹, al tiempo que las monocapas de FC:EM y EM:FC:FE, alcanzaron un valor intermedio para este parámetro. Las monocapas que contenían conjuntamente EM y Col (EM:Col:FE y EM:FC:Col) presentaron valores de $p_c > 47$ mN.m⁻¹.

La incorporación de St II a vesículas liposomales, constituidas por las mezclas lipídicas en estudio, se evaluó mediante el registro de los cambios en la fluorescencia de sus residuos Trp. Los resultados se expresaron como la relación entre la fluorescencia de la proteína en presencia de vesículas (F_L) y en ausencia de ellas (F_0) (Tabla 1). En todos los casos (excepto en las vesículas de FC:FE) se observó un incremento de la fluorescencia con el aumento de la concentración lipídica en el ensayo. Ello es indicativo del cambio a un entorno más hidrofóbico del promedio del conjunto de los residuos Trp de la toxina, cuando esta se asocia a las vesículas. En presencia de las vesículas que contenían conjuntamente EM y Col, la toxina evidenció incrementos en la intensidad de fluorescencia, superiores a los tratamientos FC:EM y EM:FC:FE. Por el contrario, la toxina evidenció muy poco cambio en el entorno de sus residuos Trp, en presencia de vesículas constituidas por FC:Col.

El tiempo asociado al proceso de formación de poros en membranas artificiales por acción de St II, se evaluó mediante experimentos de permeabilización de LUV con ANTS/DPX. Con el objetivo de evaluar cualitativamente la velocidad de formación del canal por St II en las diferentes vesículas en estudio, se compararon las cinéticas, obtenidas bajo condiciones que conducen finalmente a la permeabilización de la mitad de las vesículas presentes en el ensayo. La concentración de toxina requerida para lograr este efecto (C_{50}) fue diferente en cada caso (Tabla 1): las vesículas que contenían EM y Col simultáneamente requirieron muy poca toxina (25 nM) para lograr su permeabilización en el 50% en menos de un minuto; si se comparan con el control de FC:EM que lo logró con 48 nM de St II. Por el contrario, las vesículas constituidas por FC y Col solo alcanzaron el mismo estado a los 4 minutos de comenzado el ensayo y con una concentración de toxina de 82 nM. El tratamiento que corresponde a la mezcla binaria FC:FE no logró alcanzar la permeabilización

12. Kristan K, Podlessek Z, Hojnik V, Gutiérrez-Aguirre I, Guncar G, Turk D, González-Manas JM, Lakey JL, Macek P, Anderluh G. *J Biol Chem* 2004;279(45):46509-17.

13. Kates M. *Techniques of lipidology: Isolation, analysis and identification of lipids*. Amsterdam. American Elsevier 1972:355-6.

14. Caaveiro JM, Echabe I, Gutiérrez-Aguirre I, Nieva JL, Arrondo JLR, González-Manas JM. *Biophys J* 2001;80:1343-53.

del 50% de estas vesículas a la mayor concentración ensayada (1.16 mM).

De manera general, estos resultados demuestran que la presencia de EM no es requisito imprescindible para la formación del poro, pero su presencia en la composición lipídica favorece la velocidad de formación del poro por St II.

La presencia conjunta de EM y Col en la membrana favorece significativamente la asociación y la actividad permeabilizante de St II. En estas condiciones, la unión de la proteína a la membrana se encuentra especialmente favorecida. Ejemplo de ello lo constituyeron los elevados valores de presión crítica (p_c) alcanzados en el sistema de monocapas lipídicas, indicativos de una capacidad incrementada de estas monocapas para acomodar a la proteína. Este fenómeno parece estar relacionado con la presencia de los complejos ordenados de EM y Col [16], estabilizados por la formación de enlaces de hidrógeno entre el grupo amida de la EM y el hidroxilo del Col. Además, las características particulares de las vesículas que contienen EM y Col en su composición, le confieren a St II una mayor capacidad de asociarse a la membrana, y el poro se estructura a una gran velocidad en estas membranas a partir de cantidades relativamente pequeñas de toxina en el ensayo. Si se considera la presencia de microdominios lipídicos de EM y Col como un incremento en las zonas preferenciales de unión de la toxina a la membrana, la elevada asociación de St II que tiene lugar en estas zonas pudiera condicionar una elevada concentración local y, por consiguiente, la proximidad de las moléculas proteicas. Esto pudiera facilitar la oligomerización cooperativa de la toxina para la formación del agregado funcional.

La fosfatidiletanolamina (FE) es el típico lípido inductor de fase no laminar, que se caracteriza por promover la formación de fase hexagonal cuando es incluido en mezclas con FC. Es un lípido zwitteriónico y, por lo tanto, su utilización en esta investigación permitió generalizar el efecto de los lípidos inductores de fase no laminar sobre la actividad de St II.

Se comprobó que la inclusión de FE en vesículas que contenían conjuntamente FC y EM, no modificó sustancialmente el acomodo final de la proteína en la membrana; sin embargo, provocó un aumento de la velocidad de formación del poro. Sin embargo, la presencia de FE en sistemas lipídicos constituidos exclusivamente por FC, no garantizó la unión apreciable de la toxina a la membrana, evaluada mediante la presión crítica o la exposición de sus residuos Trp al medio acuoso en presencia de vesículas. Este último comportamiento es muy cercano a lo que ocurre con la proteína en solución. La formación del poro bajo estas condiciones puede considerarse irrelevante, posiblemente ocasionado por la escasa unión de la proteína a la bicapa.

En la mezcla que contenía la EM, el Col y la FE, se combinaron los efectos de los lípidos constituyentes, por lo que se logró la composición lipídica óptima para alcanzar una máxima unión-permeabilización de la toxina, de entre todas las ensayadas. De manera similar a las mezclas que contenían EM y Col (EM:Col y EM:FC:Col), esta composición condicionó un favorable acomodo de St II, evidenciado por su elevado valor de p_c en el sistema de monocapas y el considerable cambio de entorno de los residuos Trp de la toxina

asociada en el sistema vesicular. Estos resultados se complementaron con una gran capacidad de formación del poro de St II en las vesículas de EM:Col:FE.

A partir de las observaciones anteriores, se puede inferir que el efecto potenciador de la FE sobre la actividad de St II en sistemas lipídicos que contienen la EM, está más relacionado con la etapa de formación del poro que con la unión a la bicapa. El efecto de este lípido sobre la capacidad permeabilizante de la toxina, puede estar asociado con una reorganización lipídica de la membrana inducida por la oligomerización de la toxina.

La región estructural de estas toxinas con mayores potencialidades para atravesar la bicapa en una conformación alfa-helicoidal, se localiza en el segmento Nt, y posee una gran homología con la melitina y otros péptidos citolíticos. El diámetro del poro formado por St II, determinado experimentalmente en presencia de protectores osmóticos, es de 2 nm aproximadamente [9], por lo que su área interior sería igual a 2512 \AA^2 en una membrana de 40 \AA de grosor. Si se tiene en cuenta que el diámetro promedio de un péptido helicoidal es 1 nm aproximadamente, y que el poro de las *sticholisinas* está constituido por 3 a 4 monómeros [8], se pudiera asumir que la contribución de cuatro hélices a la superficie interior del poro es de solo 1600 \AA^2 . De esto se deduce que el poro no puede originarse exclusivamente por cuatro hélices anfífilas de St II. Por esta razón, puede asumirse que la superficie interior del poro de St II está formada conjuntamente por las caras hidrofílicas de las hélices anfífilas de la toxina y las cabezas polares de los lípidos de la membrana. La apertura de algunos canales originados por péptidos pudiera estar acompañada por la formación de un poro lipídico toroidal que rodea la estructura proteica [17]. Por ello, la monocapa lipídica se curva de manera continua desde afuera hacia adentro mediante un hoyo toroidal, de modo que las hélices anfífilas se encuentren incrustadas entre las cabezas polares de los lípidos y se orienten perpendicularmente con relación al plano de la bicapa (Figura 1).

Existen varias evidencias experimentales que apoyan la hipótesis de la formación de un poro toroidal para las *sticholisinas*. Una de ellas está relacionada con la demostración del movimiento transbicapa de los lípidos, una vez que la toxina se ha insertado en la membrana [18]. Con el empleo de marcadores de espín, ubicados a diferentes profundidades en la bicapa, se demostró que no se produce perturbación de la sonda cuando esta se encuentra en la posición 16 del ácido graso, es decir, hacia el centro de la bicapa. Ello se interpretó en el marco de la hipótesis del poro toroidal [19], como resultante de la reorganización que sufren los lípidos en presencia de la proteína, lo que alejaría la posición 16 del contacto con la cadena polipeptídica.

La hipótesis del poro toroidal, lanzada por primera vez para una toxina proteica en nuestro laboratorio, se ha confirmado de manera diferente por otros investigadores para otra proteína formadora de poro de esta familia [20] y de otras familias de proteínas [21-24].

Entre las posibles aplicaciones de las *sticholisinas* están la construcción de inmunotoxinas dirigidas contra células indeseadas, así como su utilización como herramientas para liberar al citosol celular moléculas encapsuladas en liposomas. La conjugación de estas pro-

15. Brockman H. *Curr Opin Struct Biol* 1999;9:438-43.

16. Barlic A, Gutiérrez-Aguirre I, Caaveiro JM, Cruz A, Ruiz-Argüello MB, Pérez-Gil J, González-Mañas JM. On the active role played by the membrane during the insertion of equinatoxin-II, a pore-forming toxin from *Actinia equina*. *J Biol Chem* 2004;279:34209-16.

17. Matsuzaki K. *Biochim Biophys Acta* 1998;1376:391-400.

18. Álvarez-Valcarcel CA, DallaSerra M, Potrich C, Bernhart I, Bejuca M, Martínez D, Pazos F, Lanio ME, Menestrina G. *Biophys J* 2001;80:2761-74.

19. Álvarez C, Casallanovo F, Shida CS, Nogueira LV, Martínez D, Bejuca M, Pazos IF, Lanio ME, Menestrina G, Lissi E, Schreier S. *Chem Phys Lipids* 2003;122:97-105.

20. Anderlüh G, Dalla Serra M, Viero G, Guella G, Macek P, Menestrina G. *J Biol Chem* 2003;278(46):45216-23.

21. Basañez G, Zhang J, Chau BN, MaksaeV GI, Frolov VA, Brandt TA, Burch J, Hardwick, Zimmerberg J. *J Biol Chem* 2001;276(33):31083-91.

22. Makino A, Baba T, Fujimoto K, Iwamoto K, Yano Y, Terada N, Ohno S, Sato SB, Ohta A, Umeda M, Matsuzaki K, Kobayashi D. *J Biol Chem* 2003;278(5):3204-9.

23. Sepèic K, Berne S, Potrich C, Turk T, Macek P, Menestrina G. *Eur J Biochem* 2003;270:1199-210.

24. Yamaji-Hasegawa A, Makino A, Baba T, Senoh Y, Kimura-Suda H, Sato SB, Terada N, Ohno S, Kiyokawa E, Umeda M, Kobayashi T. *J Biol Chem* 2003;278(25):22762-70.

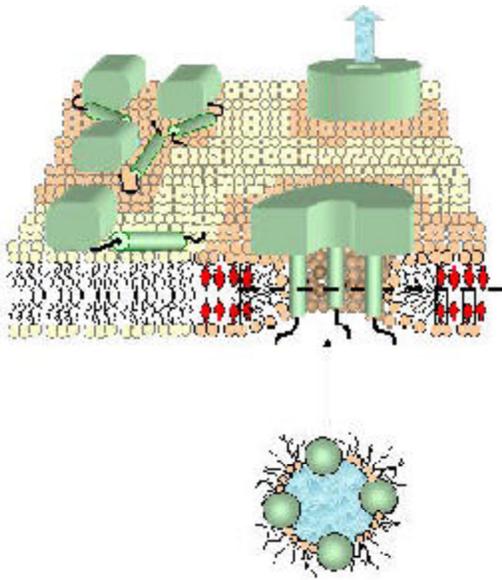


Figura 1. Esquema del modelo del poro toroidal formado por las *sticholisinas*. La toxina se representa con la hélice anfifílica en forma de cilindro. Las esferas representan las cabezas polares de los fosfolípidos y las líneas, las cadenas acílicas. Las moléculas de colesterol se representan en color negro. La toxina se asocia a la membrana preferentemente sobre los microdominios constituidos por EM y Col, donde oligomeriza y forma el poro tetramérico. Durante este proceso, la membrana lipídica se reorganiza originando un poro lipídico toroidal, en el cual los lípidos inductores de fase no laminar se disponen entre las hélices anfifílicas, formando las paredes del poro (vista inferior). Las hélices se disponen con las caras hidrofílicas hacia el lumen del poro y las hidrofóbicas, en contacto con las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos.

teínas con anticuerpos monoclonales que reconozcan antígenos expresados en células tumorales, constituye la alternativa más prometedora de la utilización de estas toxinas. Tal es el caso de los conjugados obtenidos a partir del anticuerpo monoclonal IorC5 y St I, con activi-

dad citotóxica frente a la línea celular SW948 de cáncer de colon humano [25]. Las *sticholisinas* se han clonado y expresado en *Escherichia coli*. Recientemente se purificó y caracterizó una variante recombinante de St I, así como el mutante StI W111C, con el objetivo de construir una inmunotoxina sin actividad inespecífica. Para lograr la efectividad de tales inmunocombinados, es imprescindible el conocimiento de la relación entre la estructura y la función biológica de estas proteínas, de su mecanismo de acción y, particularmente, de los eventos moleculares involucrados en la formación del poro.

Con el propósito de investigar la contribución de la región N-terminal al mecanismo lítico de formación del poro por St II, se estudiaron las características funcionales del péptido P1-30, que reproduce los primeros treinta residuos de la proteína. Este péptido exhibió una actividad hemolítica alrededor de 10^4 veces menor que la actividad de St II, lo cual parece estar relacionado con la presencia en la toxina del sitio de unión a fosfatidilcolina descrito por mancheño y sus colaboradores [7]. El radio del poro formado en los eritrocitos por P1-30 (0.95 ± 0.01 nm), fue muy similar al formado por la toxina (0.99 ± 0.01 nm) (26). De manera interesante, este péptido mostró actividad antibacteriana frente a cepas de *Bacillus subtilis* (grampositiva), *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (gramnegativas). Este es el primer reporte de un péptido modelo de 3 kDa, que puede reproducir la actividad formadora de poro de una actinoporina (20 kDa) e inaugura una nueva aproximación al estudio de estas proteínas, es decir, el uso de moléculas más pequeñas que mimetizan su función y que constituyen herramientas biotecnológicas útiles.

Agradecimientos

Esta investigación es el resultado de una beca MUTIS (Asociación Española de Cooperación Internacional), un proyecto de CITMA-CONYICIT (Cuba-Chile), un proyecto de CNPq-MES (Brasil), el CNR y el Instituto Trentino de Cultura (Italia) y el proyecto IFS No F/3773-1.

25. Bejuca M, Díaz I, Figueredo R, Roque L, Pazos F, Martínez D, Iznaga-Escobar N, Pérez R, Álvarez C, Lanio ME. *International Immunopharmacology* 2004;4:731-44.

26. Casallanovo F, De Oliveira FJF, De Souza FC, Ros U, Martínez Y, Pentón D, Bejuca M, Martínez D, Pazos F, Pretiñes TA, Spisni A, Cilli EM, Lanio ME, Álvarez C, Schreier S. *Biopolymers* (Aceptada para publicación) 2005.