



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Tesis Doctoral

Doctorado en Ciencias Farmacéuticas

**Evaluación De La Actividad Anticancerígena *In Vitro* De
Péptidos Sintéticos Derivados De Lactoferricina Bovina
En Líneas Celulares De Cáncer De Mama**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento Farmacia

Bogotá, Colombia

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Tesis Doctoral

Doctorado en Ciencias Farmacéuticas

**Evaluación De La Actividad Anticancerígena *In Vitro* De
Péptidos Sintéticos Derivados De Lactoferricina Bovina
En Líneas Celulares De Cáncer De Mama**

Estudiante

Jorge Antonio Rodríguez Guerra

Director

Javier Eduardo García Castañeda

Profesor Departamento de Farmacia-Universidad Nacional de Colombia

Codirector

Giovanni Almanzar

University Hospital Wuerzburg, Wuerzburg, Department of Pediatrics

Laboratory of Rheumatology and Immunology

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento Farmacia

Bogotá, Colombia

2019

Dedicatoria

Ante todo dedico este logro a Dios, dando gracias por permitirme aprender y forjarme en todos los aspectos de la vida, a Juan David y Gina Paola los amores y motores de mi vida, a mi madre Geomar por su apoyo incondicional y su preocupación, a mi padre José está en el cielo y siempre llevare en mi corazón, para todos ellos con todo mi amor.

“Aunque nadie ha podido regresar atrás y hacer un nuevo comienzo, cualquiera puede recomenzar ahora y hacer un nuevo final”

(Jonathan García-Allen)

Agradecimientos

Mis completos agradecimientos a mi Alma Mater la Universidad Nacional de Colombia de donde aprendí y recogí las más valiosas experiencias académicas, siendo el lugar donde siempre quise estar.

A Colciencias por su apoyo mediante la convocatoria 617 sin la cual no hubiera sido posible iniciar este fabuloso camino.

Al grupo de investigación de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP) el cual he tenido el gusto de ver crecer y proyectarse con excelentes estudiantes en cabeza de la profesora Zuly Rivera y Javier García.

A mi director Javier García por sus consejos, apoyo, paciencia y dedicación conmigo y con este proyecto.

Al Doctor Giovanni Almanzar por sus valiosos aportes a esta investigación.

A la profesora Adriana Umaña cabeza del Grupo de Investigación en Hormonas (GIH) quien con su paciencia, disciplina y amistad me enseñó y abrió las puertas de su laboratorio para llevar a cabo este proyecto.

Compañeros del GIH Juan José, Wilder, Sandra, Oscar, Diana por su colaboración y sus valiosos aportes.

A mis compañeros de laboratorio SAMP: Nataly, Diego, Héctor, Verónica, Tatiana, Yerly Kevin, Karen y Daniel por su amistad, aliento y consejos durante el transcurso de este trabajo.

A la Doctora Alejandra Ochoa y el Doctor Joel López quienes me acogieron y guiaron en su grupo de investigación del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB).

A los compañeros y amigos que dejó en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo: Marisol, Miying, Mónica S, Mónica L, Minerva, Maritére, Rafa, Luis, Marina, Israel, David, Michael, Frida, Lupe y Nayeli. Gracias por sus enseñanzas y los buenos momentos que me hicieron pasar lejos de mi hogar.

Finalmente a todas las personas que apoyaron este proyecto, familiares y amigos que con su acompañamiento y apoyo me dieron ánimo y sienten este logro como propio.

Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto citotóxico de péptidos sintéticos derivados de Lactoferricina Bovina (LfcinB) contra líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama. Para esto se sintetizaron péptidos monoméricos, diméricos, tetraméricos y cíclicos que contienen las secuencias, LfcinB (20-25): ²⁰RRWQWR²⁵; LfcinB (20-30): ²⁰RRWQWRMKKLG³⁰; [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31): ¹⁷FKARRWQWRMKKLGA³¹ y LfcinB (21-25)_{Pal}: RWQWRWQWR. Todos los péptidos fueron purificados mediante cromatografía RP-SPE, caracterizados por cromatografía RP-HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF.

El efecto citotóxico fue evaluado en las líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™) y MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™). Se encontró que los péptidos diméricos y tetraméricos derivados de LfcinB (20-25), LfcinB (20-30) y [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31) presentaron el mayor efecto citotóxico de manera selectiva y dependiente de concentración, estos resultados indican que la polivalencia de los péptidos incrementó el efecto citotóxico contra las líneas celulares evaluadas, sin embargo para la secuencia palindrómica LfcinB (21-25)_{Pal}, los péptidos en forma monomérica y dimérica fueron quienes presentaron el mayor efecto citotóxico contra las líneas HTB-132™ y HTB-26™.

Adicionalmente en este trabajo se estableció de manera preliminar que el mecanismo de acción citotóxico del péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄, contra la línea celular MCF-7 (HTB-22™) está mediado por procesos apoptóticos. Este trabajo permitió identificar péptidos citotóxicos y selectivos los cuales pueden ser considerados promisorios para el desarrollo de agentes terapéuticos contra el cáncer de mama.

Palabras Clave:

Lactoferricina bovina, polivalencia, péptidos tetraméricos, péptidos diméricos, cáncer de mama, síntesis en fase sólida de péptidos.

Abstract

In this study the cytotoxic effect of synthetic peptides derived from bovine lactoferricin (LfcinB) against human breast cancer cells lines were evaluated. For this purpose monomeric, dimeric, tetrameric and cyclic peptides were synthesized with the following sequence, LfcinB (20-25): $^{20}\text{RRWQWR}^{25}$; LfcinB (20-30): $^{20}\text{RRWQWRMKKLG}^{30}$; [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31): $^{17}\text{FKARRWQWRMKKLGA}^{31}$ y LfcinB (21-25)_{Pal}: RWQWRWQWR . The RP-SPE, RP-HPLC chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry techniques were used to purify and characterize all of peptides.

The cytotoxic effect against MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™ y MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) breast cancer cells lines was evaluated. Dimeric and tetrameric peptides derivate from LfcinB (20-25), LfcinB (20-30) and [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31) had showed the greatest selective cytotoxic effect in concentration-dependent manner, these results showed that the polyvalence enhance the cytotoxic effect of peptides against the evaluated cells lines. On the other hand, the linear palindromic sequence LfcinB (21-25)_{Pal} and its dimer showed the higher cytotoxic effect against HTB-132™ y HTB-26™ cell lines.

In addition, the apoptotic effect of tetrameric peptide LfcinB (20-25)₄ against MCF7 (HTB-22™) cell line was previously established. This work allowed to identify cytotoxic and selective peptides against breast cancer cells which be promissory in develop new therapeutic agents against breast cancer.

Key words:

Bovine lactoferricin, polyvalence, tetrameric peptides, dimeric peptides, breast cancer, Solid phase peptide synthesis.

Contenido

1	Marco conceptual	14
1.1	Cáncer de mama	14
1.2	Péptidos como agentes terapéuticos	16
1.3	Péptidos y cáncer de mama	17
1.4	Actividad antimicrobiana y anticancerígena de la Lactoferrina y Lactoferricina Bovina. 19	
1.5	Modificaciones a péptidos de LfcinB para incrementar la actividad	20
2	Justificación.....	22
3	Metodología	25
3.1	Etapa 1. Síntesis química, purificación y caracterización de los péptidos	26
3.1.1	Síntesis de péptidos en Fase Sólida estrategia Fmoc/tBu.....	28
3.1.2	Caracterización de péptidos por cromatografía RP-HPLC analítica.....	30
3.1.3	Purificación de péptidos por extracción en fase sólida (RP-SPE).....	30
3.1.4	Formación de puentes disulfuro por oxidación	31
3.1.5	Análisis de péptidos por espectrometría de masas	31
3.1.6	Disolución de los péptidos	31
3.2	Etapa 2. Ensayos de citotoxicidad selectividad y hemólisis.....	32
3.2.1	Descongelamiento de líneas celulares, subcultivo y criopreservación.....	33
3.2.2	Viabilidad celular por conteo celular con Azul de tripán.....	33
3.2.3	Determinación de la cantidad óptima de células para los ensayos de toxicidad	34
3.2.4	Sincronización del cultivo celular	34
3.2.5	Ensayo de Viabilidad celular por (MTT)	35
3.2.6	Actividad hemolítica de los péptidos	35
3.3	Etapa 3. Estudio preliminar del mecanismo de acción.....	36
3.3.1	Evaluación de la membrana citoplasmática utilizando SYTO 9/ IP	36
3.3.2	Ensayo para determinar tipo de muerte celular Apoptosis / Necrosis.....	36
3.3.3	Determinación de la despolarización de la membrana mitocondrial.....	37
3.3.4	Determinación de la liberación de Calcio intracelular	37
4	Resultados y Discusión	38
4.1	Etapa 1. Síntesis química, purificación y caracterización de los péptidos (objetivos específicos 1 y 3).....	38
4.1.1	Síntesis química.....	38

4.1.2	Purificación y Caracterización	40
4.1.3	Oxidación de los péptidos precursores	42
4.2	Etapa 2. Evaluación del efecto citotóxico y actividad hemolítica de los péptidos derivados de la LfcinB (Objetivos específicos 2,4 y 5).....	45
4.2.1	Determinación del número óptimo de células para los ensayos MTT	45
4.2.2	Sincronización del cultivo celular	46
4.2.3	Viabilidad celular (MTT) en células HTB-132 TM y HTB-26 TM	47
4.2.4	Viabilidad celular (MTT) en fibroblastos y ensayo de hemólisis	56
4.3	Etapa 3. Estudio preliminar del mecanismo de acción del péptido LfcinB (20-25) ₄ Vs la línea celular HTB-22 TM (MCF-7). (no contemplado en objetivos).....	61
4.3.1	Viabilidad celular de péptidos LfcinB (20-25) ₄ y LfcinB (21-25) _{Pal}	62
4.3.2	Afectación de la membrana citoplasmática.....	64
4.3.3	Determinación de Apoptosis/Necrosis	67
4.3.4	Despolarización membrana mitocondrial.....	69
4.3.5	Cambios del nivel de calcio intracelular	71
5	Conclusiones generales	75
	Anexo I. Purificación, Caracterización de péptidos derivados de la LfcinB.....	90
	Anexo II. Purificación, Caracterización de péptidos derivados de la Aureina 1.2.....	106
	Anexo III. Curvas de calibración de las diferentes líneas celulares, ensayo por MTT	111
	Anexo IV. Efecto citotóxico de los péptidos derivados de la Aureina 1.2.....	112
	Anexo V. Curvas de hemólisis de los péptidos con mayor actividad	114
	Anexo VI. Afectación de la membrana citoplasmática por el péptido LfcinB (20-25) ₄	115
6	Bibliografía	76

Lista de figuras

Figura 1. Estructura de los péptidos derivados de la LfcinB utilizados en este estudio.	26
Figura 2. Esquema de la síntesis de péptidos en fase sólida por la estrategia Fmoc/tBu.	28
Figura 3. Número de ciclos de reacción de acople necesarios para la incorporación de cada uno de los aminoácidos en la SPPS-Fmoc/tBu de cada familia.....	39
Figura 4. Perfiles cromatográficos de los productos crudos obtenidos para la familia LfcinB (20-25)..	40
Figura 5. Caracterización del péptido LfcinB (20-25) purificado.	41
Figura 6. Sincronización de las células HTB-132 TM	46
Figura 7. Efecto citotóxico de los péptidos monoméricos, diméricos, tetraméricos y cíclicos	51
Figura 8. Efecto citotóxico del péptido de LfcinB (20–25) ₄ contra la línea celular HTB-132 TM a diferentes tiempos de tratamiento.	53
Figura 9. Efecto citotóxico de los péptidos derivados de LfcinB (21-25) _{Pal} contra las líneas celulares HTB-132 TM y HTB-26 TM	54
Figura 10. Viabilidad celular de las líneas celulares HTB-132 TM y PCS 201-102 TM tratadas con los péptidos lineales, diméricos y tetraméricos derivados de la LfcinB.	58
Figura 11. Citotoxicidad de los péptidos LfcinB (20-25) ₄ y LfcinB (21-25) _{Pal} contra la línea celular HTB-22 TM	62
Figura 12. Efecto citotóxico del péptido LfcinB (20-25) ₄ contra la línea celular HTB-22 TM a diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento.	63
Figura 13. Plots representativos de los controles usados para evaluar el efecto citotóxico del péptido LfcinB (20-25) ₄ por citometría de flujo con SYTO9/IP.	64
Figura 14. Afectación de la membrana citoplasmática evaluada por citometría de flujo con los fluorocromos SYTO9/IP.....	65
Figura 15. Micrografías de las células HTB-22 TM tratadas con diferentes concentraciones del péptido LfcinB (20-25) ₄	66
Figura 16. Ensayo de apoptosis / necrosis.....	68
Figura 17. Micrografía de células HTB-22 TM normales y con tratamiento con el péptido LfcinB (20-25) ₄ . ..	68
Figura 18. Controles tratamientos utilizados en el ensayo de despolarización de membrana mitocondrial....	70
Figura 19. Cambios en la concentración de calcio citoplasmático en células HTB-22 TM tratadas con el péptido LfcinB (20-25) ₄	72

Lista de Tablas

Tabla 1. Secuencias de péptidos diseñados para el presente estudio.	27
Tabla 2. Caracterización de los péptidos por cromatografía RP-HPLC y EM MALDI-TOF.....	42
Tabla 3. Resultados de las curvas de calibración obtenidas con cada línea celular.	46
Tabla 4. Valores del IC ₅₀ de los péptidos sintetizados.....	52
Tabla 5. Diferencias entre los dímeros lineales y dímeros tipo MAP.....	55
Tabla 6. Índice de selectividad (IS) y actividad hemolítica.....	58

Lista de abreviaturas por orden alfabético

Abreviatura	Significado
6-Cl-HOBt	1-Hidroxi-6-clorobenzotriazol
Ala (A)	Alanina
(<i>t_R</i>)	Tiempo de retención
Abs	Absorbancia
ACN	Acetonitrilo
Afgf	Factor ácido de crecimiento de fibroblastos
Ahx	Amino hexanoico
Akt	Protein quinasa B
Arg (R)	Arginina
Asn (N)	Asparagina
Asp (D)	Aspártico
ATCC	American Type Culture Collection (Colección de cultivos tipo Americana)
<i>BRCA1</i>	Gen supresor de tumores de cancer de mama 1
CDI	Carcinoma Ductal Infiltrante
CK17	Citoqueratina 17
CK5	Citoqueratina 5
c-kit	Receptor celular KIT (CD117)
CLI	Carcinoma Lobular Infiltrante
CSC	Célula madre del cáncer
Cys (C)	Cisteína
DC	Dicroísmo Circular
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMF	N,N-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDT	Etanoditiol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGFR	Receptor de crecimiento epidérmico
ER	Receptores de estrógeno
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Drogas y Alimentos)
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxycarbonilo
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Ácido glutámico
Gly (G)	Glicina

HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
His (H)	Histidina
IARC	International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer)
Ile (I)	Isoleucina
INC	Instituto Nacional de Cancerología
IP	Ioduro de propidio
IPA	Isopropanol
K	Lisina
Ki67	Proteína Ki67
Leu (L)	Leucina
LF	Lactoferrina
LFB	Lactoferrina bovina
Lfcin	Lactoferricina
LfcinB	Lactoferricina bovina
LFh	Lactoferrina humana
LPS	Lipopolisacáridos
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Fly (Desorción por Ionización de Matriz asistida por Laser)
MAPs	Multiple Antigen Peptides (Péptidos Múltiple Antigénicos)
MBC	Concentración mínima bactericida
MCC	Medio de cultivo completo
MeOH	Metanol
meq	Miliequivalentes
Met (M)	Metionina
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MS	Espectrometría de masas
MTT	Bromuro de 3-4,5dimetiltiazol-2-ilo-2,5-difeniltetrazol
NIH	Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
OSCC	Cáncer oral de células escamosas
p53	Proteína p53
PACs	Péptidos con actividad anticancerígena
PAMs	Péptidos Antimicrobianos
Phe (F)	Fenilalanina
POES	Procedimientos Operativos Estándar
PR	Receptores para progesterona
Pro (P)	Prolina
rpm	Revoluciones por minuto
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa
RP-SPE	Extracción en fase sólida y fase reversa
SAMP	Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas
SAR	Structure activity relationships (relación estructura actividad)
Ser (S)	Serina
SFB	Suero fetal bovino
SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis (Síntesis de Péptidos en Fase Sólida)
TA	Temperatura ambiente
TBTU	O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-Tetrafluoroborato de tetrametiluronio
<i>t</i> Bu	Terbutil
TFA	Ácido Trifluoroacético
TGF α	Receptor de crecimiento transformante alfa
TIPS	Triisopropilsilano
Tre (T)	Treonina
Trip (W)	Triptófano
Tyr (Y)	Tirosina
Val (V)	Valina
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VEGFR 2/3	Receptores 2 y 3 del factor de crecimiento vascular endotelial
VLPs	Partículas similares a virus
β A	Beta-Alanina

Introducción

El cáncer, neoplasia y/o tumor maligno son un grupo de enfermedades que se encuentran relacionadas y pueden afectar cualquier parte del cuerpo. El cáncer se caracteriza por la pérdida del control de la capacidad proliferativa de las células, generando crecimiento descontrolado y causando la formación de tumores. Una de las características principales de estas enfermedades es la migración de las células tumorales a diferentes parte del cuerpo para formar nuevos tumores, fenómeno llamado metástasis [1].

De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH por sus siglas en ingles), se han identificado más de 100 tipos de cáncer que afectan al ser humano [2]. En el informe “Globocan 2018” reporta que para ese año se habían diagnosticado a nivel mundial alrededor de 14 millones nuevos casos y se habían generado alrededor 9,5 millones de defunciones relacionadas con estas enfermedades. El cáncer se considera un problema de salud pública con un costo anual de 1.16 trillones de dólares, lo que ha llevado a generar políticas mundiales para hacer frente a esta problemática [3].

El cáncer de mama es el más prevalente y representa el 25% de todos los tipos de cáncer femeninos, esto lo convierte en la mayor causa de muerte entre mujeres que padecen estas enfermedades. Las tasas de supervivencia son baja en los países menos desarrollados, debido a la falta de tratamientos adecuados, políticas e implementación de programas de diagnóstico temprano, haciendo que la mayoría de los casos se diagnostiquen en fases avanzadas donde el tratamiento es menos eficaz [4].

Actualmente Colombia cuenta con políticas que promueven la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento para el cáncer, esto debido a que los medicamentos disponibles son muy agresivos, poco selectivos y los procedimientos son invasivos, afectando la calidad de vida de los pacientes [5].

El desarrollo de opciones terapéuticas contra el cáncer basadas en péptidos es un campo de investigación que se encuentra en crecimiento [6,7]. En las últimas dos décadas se ha observado un aumento del 400% en el número de publicaciones científicas en las que se relacionan los términos péptidos y cáncer [8]. En el 2018 el NIH tenía registrados 918

estudios clínicos donde se utilizan péptidos contra algún tipo de cáncer y específicamente 124 estudios están dirigidos a cáncer de mama [9].

Los péptidos como fármacos presentan ventajas debido a su baja toxicidad, alta especificidad, versatilidad en su obtención y bajo costo de producción [10], siendo un grupo de moléculas interesantes que han demostrado efectividad contra el cáncer.

En este trabajo se presenta (i) la síntesis química, purificación, caracterización de péptidos monoméricos, diméricos, tetraméricos y cíclicos derivados de la LfcinB, (ii) la evaluación del efecto citotóxico contra líneas celulares derivadas de cáncer de mama y (iii) estudio preliminar del mecanismo de acción del péptido LfcinB(20-25)₄ en la línea celular MCF-7. Los resultados obtenidos son promisorios y creemos que algunas moléculas aquí reportadas podrían continuar en proceso de investigación para el desarrollo de fármacos en el tratamiento del cáncer de mama [11].

1 Marco conceptual

1.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama representa el 25% de los cánceres que padecen las mujeres, la cifra se estima en 1.67 millones de nuevos casos cada año, por lo tanto podríamos decir que cada seis minutos muere una mujer por cáncer de mama [4]. Los principales factores de riesgo para el cáncer de mama son: recurrencia, edad avanzada, antecedentes de enfermedad benigna de la mama, predisposición genética, mamas densas, exposición del tejido mamario a estrógeno, haber recibido terapia hormonal y/o radioterapia dirigida a la mama o el pecho, ser de raza blanca, tener obesidad, consumir alcohol y/o fumar [12].

El cáncer de mama se define como el crecimiento de tumores en los tejidos mamarios. El cáncer de mama es considerado como una enfermedad heterogénea que se clasifica en base a criterios clínicos, genéticos y moleculares [13-15].

Desde el punto de vista clínico existen dos tipos principales de cáncer de mama, el Carcinoma Ductal Infiltrante (CDI) y el Carcinoma Lobular Infiltrante (CLI). El CDI se diagnostica en un 80-90%, este tipo de cáncer se inicia en los conductos que llevan leche desde los lóbulos hasta el pezón con infiltración en el tejido anexo. El CLI tiene una frecuencia del diagnóstico entre el 10-12 %, se desarrolla en los lóbulos que producen la leche materna con infiltración al tejido circundante. Existen otros tipos de cáncer que son poco frecuentes y representan alrededor del 10% del total de casos reportados, entre ellos tenemos: carcinoma ductal y lobular *in situ*, carcinoma inflamatorio de seno, enfermedad de Paget, angiosarcoma de mama, tumores filoides, carcinoma cribiforme, carcinoma papilar, carcinoma mucinoso y carcinoma medular [16].

La clasificación molecular de los tumores puede basarse en la identificación de la expresión de genes [17,18] y/o realizando agrupamientos de tumores que responden diferencialmente a los tratamientos de acuerdo a marcadores de superficie [19]. Desde el punto de vista molecular e inmunoquímico, cerca del 40% de los cánceres se clasifican como luminales A, originándose en las capas internas (luminales) de los conductos mamarios. Estos tumores son

ER+ (positivas para receptores de estrógenos) y/o PR+ (positivas para receptores de progesterona) y HER2- (negativas para receptores de factor de crecimiento epidérmico humano 2). Este tipo de cáncer presenta bajos niveles de Ki67 y el tratamiento a menudo incluye terapia hormonal. Los tumores luminales B representan un 20% de los diagnósticos, también se originan en las capas internas (luminales) de los conductos mamarios y presentan los siguientes marcadores: ER+ y/o PR+, además son HER2+ y/o HER2- con altos niveles de Ki67. Las mujeres con este tipo de tumores a menudo son diagnosticadas a edad más temprana con un pronóstico menos favorable que aquellas con tumores luminales A [20].

Los cánceres de mama clasificados como triple negativo representan alrededor del 15-20% de los casos, son ER-, PR- y HER2- (no expresan los marcadores de superficie), además tienen peor pronóstico con relación a los tumores luminales A y B. Un subgrupo de tumores triple negativo se conoce como “basal-like” debido a que tienen células con características similares a las células basales más profundas que rodean los conductos mamarios presentando mutaciones en la proteína p53. Los tumores Basal/mioepitelial también presentan células triples negativas que expresan citoqueratinas de alto peso molecular CK5, CK17, c-kit (tirosina quinasa del epitelio mamario). Son uno de los tipos más agresivos al no responder a terapias endocrinas observándose alteración de los genes que codifican para proteínas reparadoras. Presentan metilación del promotor del gen *BRC1* que genera el silenciamiento del gen, representan aproximadamente un 2 a 8% de los casos clínicos [21].

Los tumores clasificados como HER2/neu tienen células que expresan el receptor (HER2/neu+), sobre expresan genes de proliferación y tienen baja expresión de ER y PR. Cerca del 10 a 15% de los cánceres de mama que presentan este perfil son propensos a realizar metástasis y tienen mal pronóstico [22].

Los tumores Claudin low presentan baja expresión de Ki67 y sobre expresan un subconjunto de genes relacionados con diferenciación mesenquimal y transición epitelio-mesenquimal, estos rasgos están asociados al fenotipo de célula madre del cáncer (CSC) que puede estar presente en 12-14 % de los casos. Clínicamente corresponden a carcinomas ductales de alta infiltración que pueden presentar diferenciación metaplásica y generalmente tienen mal pronóstico [23].

1.2 Péptidos como agentes terapéuticos

A nivel biológico los péptidos presentan múltiples funciones tales como: actividad antimicrobiana, vaso dilatadora, antioxidante, neurotransmisora entre otras, por lo tanto son considerados como una valiosa fuente de moléculas para el desarrollo de agentes terapéuticos [24]. Por su naturaleza proteica poseen alta especificidad y tienen menos efectos secundarios y/o tóxicos. Los péptidos no se acumulan en el cuerpo y su degradación sigue las rutas metabólicas del organismo, sin embargo para ser usados como fármacos presentan algunas limitaciones como pobre absorción, baja permeabilidad frente a membranas, susceptibilidad a la degradación enzimática y pueden generar respuestas inmunes [10, 25]. Para suplir estas desventajas, la síntesis química de péptidos en fase sólida (SPPS) implementada por Bruce Merrifield, permitió la obtención de péptidos con modificaciones a la secuencia con el fin de incrementar la estabilidad fisicoquímica y potenciar la actividad biológica [26]. Actualmente las modificaciones posibles incluyen cambios de aminoácidos L por D, conjugación con moléculas como carbohidratos, lípidos, moléculas orgánicas, metales, etc. También es posible diseñar cadenas peptídicas que contengan secuencias de diferentes proteínas (quimeras), modificar al esqueleto peptídico para obtener estructuras diméricas, tetraméricas, poliméricas, cíclicas, ramificadas, entre otras [27]. Por lo tanto la SPPS permite la producción de moléculas peptídicas en cantidades suficientes para ser utilizadas en las fases de desarrollo, preclínicas y clínicas [6, 28].

La mayoría de los péptidos antimicrobianos (PAMs) presentan estructuras alfa hélices y hojas beta, otros no presentan patrones estructurales y adoptan estructuras definidas únicamente cuando interactúan con membranas celulares, facilitando su anclaje o paso a través de la misma. Algunos factores y/o características del péptido que influyen en la actividad antimicrobiana son la composición y secuencia de aminoácidos, longitud de la cadena peptídica, carga neta, hidrofobicidad, anfipaticidad, entre otros [29]. Los PAMs son moléculas anfipáticas que poseen aminoácidos polares e hidrofóbicos que les permiten unirse a las membranas plasmáticas de manera no específica [30]. El principal mecanismo de acción de los PAMs radica en la desorganización de la membrana plasmática del patógeno

generando lisis celular [31]. También se ha observado que algunos PAMs pueden inhibir la síntesis de proteínas, la síntesis de ácidos nucleicos o alterar el metabolismo celular [32].

Varios reportes han demostrado que la mayoría de PAMs de carácter catiónico también presentan efecto citotóxico sobre líneas celulares de cáncer (péptidos anticancerígenos, PACs) [33, 34], lográndose establecer la estrecha relación entre la actividad antimicrobiana y la actividad anticancerígena que poseen los PAMs [35, 36].

Se ha propuesto que el mecanismo de acción para la actividad antibacteriana es similar al que se propone para la actividad anticancerígena. La primera interacción de los PACs con la membrana citoplasmática de las células tumorales generalmente es de naturaleza electrostática. Esta interacción ocurre entre las cargas positivas de las cadenas laterales del péptido con moléculas y/o proteínas sobre expresadas (Proteínas con glicosilación O y N, ácido siálico y gangliósidos, fosfatidil serina, ácido siálico, sulfato de heparán etc.) que proporcionan una densidad de carga negativa a la superficie celular [37]. Se sugiere que el efecto oncolítico de los PACs con actividad antimicrobiana, se genera de la misma forma como ocurre con las bacterias, el mecanismo implica la disrupción o desestabilización de la bicapa lipídica de la membrana plasmática, causando la lisis celular y/o internalización del péptido que puede migrar para unirse a dianas intracelulares [38]. También se ha sugerido que la citotoxicidad de los PACs sobre células tumorales puede estar mediada por otros mecanismos que incluyen necrosis, apoptosis (dependiente e independientes de caspasas), inhibición de la angiogénesis e interferencia con proteínas constitutivas [39]. Los PACs pueden clasificarse en dos grandes grupos, (i) selectivos que afectan microorganismos y células cancerosas sin afectar las células normales e (ii) inespecíficos, que afectan por igual a microorganismos, células cancerosas y células normales [36].

1.3 Péptidos y cáncer de mama

Los péptidos son moléculas promisorias para el desarrollo de agentes terapéuticos en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Esto se ve reflejado en la creciente aprobación de péptidos como agentes terapéuticos por la “Food and Drug Administration”

(FDA). Esta entidad a julio 31 del 2017 aprobó 239 moléculas en 380 variantes de drogas[40] y la NIH en el año 2018 reportó 124 estudios clínicos que involucran péptidos contra cáncer de mama [9].

Muchos estudios buscan identificar péptidos que actúen como fármacos adyuvantes o que posean actividad anticancerígena intrínseca, por ejemplo el péptido LHRH fue utilizado para incorporar Cisplatino en células 4T1 iniciadoras de tumor de cáncer de mama en el modelo murino [41]. El péptido AP8 (AGNWTPI) inhibió la interacción del receptor FGFR1 con su ligando aFGF, disminuyendo la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, MCF7 y HUVEC [42]. El péptido EC-1 (WTGWCLNPEESTWGFCTGSF) inhibió la fosforilación de las proteínas codificadas por el gen ERBB2 (HER2/neu) de manera dosis y tiempo dependiente, inhibiendo la proliferación de células que sobre expresan este marcador [43]. El péptido Temporina-1Cea (FVDLKKIANIINSIFGK) indujo la muerte a células Bcap-37 de cáncer de mama de manera dependiente e independiente de caspasas provocando cambios en la morfología de las células [38]. El péptido Angiotensina 1-7 inhibió el crecimiento de fibroblastos asociados a cáncer en el modelo murino, reduciendo el proceso de fibrosis característico del cáncer de mama [44]. El péptido RGD se unió a células MDA-MDB-231 y MCF7 inhibiendo selectivamente la capacidad proliferativa [45]. El péptido LLRSSLILLQGSWF inhibió la angiogénesis y linfangiogénesis en tumores generados con células MDA-MB-231 en el modelo murino [46]. La Buforina IIb presentó efecto citotóxico contra células MCF-7 y MDA-MB231 (IC_{50} 15 μ g/mL); este péptido puede atravesar la membrana citoplasmática y acumularse en el núcleo de células de leucemia [47]. Los péptidos Aureina 1.2 y BMAP-28 presentaron efecto citotóxico contra líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MX-1 y el mecanismo propuesto fue la apoptosis dependiente de caspasas [48].

Estos reportes evidencian que los péptidos sintéticos pueden ser utilizados como moléculas para el desarrollo de agentes terapéuticos contra el cáncer de mama, presentando una amplia variedad de blancos farmacológicos.

1.4 Actividad antimicrobiana y anticancerígena de la Lactoferrina y Lactoferricina Bovina

La Lactoferrina (LF) es una glicoproteína identificada en mamíferos como cobayos, vacas, cabras, cerdos, equinos, ratones y humanos [49]. Esta proteína se encuentra en altas concentraciones en fluidos exocritos como los nasales, la saliva, las lágrimas y en menor proporción en fluidos corporales como la sangre y la leche [50]. La Lactoferrina Bovina (LFB) es considerada de alto interés farmacológico al exhibir múltiples tipos de funciones biológicas como: actividad antibacteriana, antiviral, antiparasitaria, anticancerígena, presenta actividad enzimática tipo ribonucleasa y de unión a ADN, además se ha encontrado puede modular la respuesta inmune innata y adquirida [51, 52].

La LFB incrementó la apoptosis en líneas celulares de cáncer de estómago SGC-7901[53] y evitó la migración de células de cáncer de mama HS578T y T47D [54]. La LFB presentó actividad contra el cáncer de pulmón, inhibiendo la angiogénesis por el bloqueo de VEGF y disminuyendo la inflamación por la regulación de las citoquinas IL4, IL10 y el factor de necrosis tumoral alfa tanto *in-vitro* como *in-vivo* [55]. La LFB administrada por vía oral a ratas inhibió competitivamente la interacción receptor-ligando (VEGF₁₆₅), principal responsable de la angiogénesis [56].

La acción de la pepsina porcina sobre la LFB produce un hidrolizado con mayor actividad antimicrobiana y menor antigenicidad que la proteína completa [57]. En este hidrolizado se identificó un péptido de 25 aminoácidos denominado Lactoferricina Bovina (LfcinB) (¹⁷FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF⁴¹) principal responsable de la actividad antimicrobiana de la proteína [58].

La LfcinB disminuyó la expresión de las D-metil-transferasas promotoras de la metilación anormal en células Jurkat T [59]. También indujo la fragmentación del DNA y cambios morfológicos en la membrana plasmática de las células MDA-MDB-435 inhibiendo la angiogénesis en el modelo murino e *in-vitro* y fue capaz de inhibir la migración celular, incrementando la fragmentación del ADN por la combinación con Tamoxifeno [60]. Al combinar la LfcinB (12.5 µg/mL) y el péptido HPN1 (10 µg/mL), se observó un aumento del

efecto citotóxico *in-vitro* contra líneas celulares provenientes de carcinomas orales de células escamosas [61]. Otros estudios han mostrado que secuencias aún más cortas que la LfcinB, como la LfcinB (17-26): ¹⁷FKCRRWQWRM²⁶ es citotóxica y permeabiliza específicamente líneas celulares de leucemia, cáncer de mama, cáncer de colon y ovario a 18 horas de tratamiento. El mecanismo propuesto para este péptido involucra la internalización para llegar a la mitocondria y producir la liberación de citocromo C y especies reactivas de oxígeno [62]. En contraste, el motivo mínimo de actividad antibacteriana, LfcinB (20-25): ²⁰RRWQWR²⁵, no logró internalizarse en las células cancerosas, sin embargo cuando fue suministrado mediante liposomas fusogénicos presentó un efecto citotóxico contra células MDA-MB-231 y Jurkat-T [63], en estos estudios se estableció que el mecanismo de acción está asociado a la apoptosis celular mediado por caspasas y catepsina B [64].

Algunos estudios han mostrado que péptidos monoméricos, diméricos, tetraméricos y cíclicos derivados de la LfcinB con actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas [65] han presentado efecto citotóxico contra células escamosas de cáncer oral (OSCC) [66]. El péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄, que contiene cuatro copias del motivo mínimo, presentó efecto citotóxico contra CAL27 y SCC15; estableciéndose que el péptido tetramérico se internaliza en las células induciendo la muerte celular [66]. El péptido palindrómico LfcinB (21-25)_{pal}: RWQWRWQWR presentó actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas y efecto citotóxico específico contra las líneas celulares CAL27 y SCC15 [66].

1.5 Modificaciones a péptidos de LfcinB para incrementar la actividad

La estrategia comúnmente utilizada para incrementar la actividad antibacteriana y anticancerígena de los péptidos se basa en modificar la secuencia primaria, posteriormente se realizan ensayos de estructura actividad (SAR) donde se genera toda la información sobre la efectividad de dichos cambios. Generalmente se crean bibliotecas de análogos peptídicos en donde se reemplaza cada aminoácido de la secuencia por aminoácidos como la Glicina o Alanina, permitiendo identificar los residuos críticos responsables de la actividad, de esta

forma se logra relacionar la estructura primaria de los péptidos con la actividad de la molécula [67]. Existen otras aproximaciones donde se explora el impacto de cambios estructurales tales como la ciclación, amidación de los extremos de la secuencia, síntesis de moléculas diméricas, tetraméricas e inclusión de aminoácidos no naturales y/o moléculas de origen sintético.

Se ha observado que la ciclación de péptidos ricos en Arginina y Triptófano puede contribuir a mejorar la actividad antibacteriana y la estabilidad a la degradación enzimática [68]. Los métodos para la obtención de péptidos cíclicos son: (i) formación de un enlace amida entre el extremo C-terminal y el N-terminal de la secuencia. (ii) formación de un puente disulfuro entre Cisteínas localizadas en el extremo C-terminal y el N-terminal. Se ha observado que la ciclación cabeza-cola por enlace amida aumenta la estabilidad a la proteólisis y la ciclación mediante puentes disulfuro mejora la actividad antimicrobiana [69]. La amidación del extremo C-terminal de PAMs lineales incrementa la actividad sin afectar la estabilidad a la degradación enzimática, mientras que la acetilación del extremo N-terminal decrece la actividad pero mejora la estabilidad [68].

2 Justificación

El informe Globocan del 2012, mostró que el cáncer de mama es el segundo cáncer con mayor prevalencia, mientras la OMS reportó que es el quinto con mayor tasa de mortalidad en el mundo [2].

En Colombia el panorama es similar, el Instituto Nacional de Cancerología (INC) indica que el cáncer de mama es una de las enfermedades con mayor incidencia y mortalidad. En el periodo 2002-2006 se reportó un promedio anual de 7000 nuevos casos y una mortalidad de 2500 personas [71]. El Ministerio de Salud y Protección Social manifestó respecto al cáncer de mama “*En Colombia, esta enfermedad se perfila como un problema de salud pública debido a que por su causa anualmente fallecen 2.649 mujeres...un problema de salud pública que va en crecimiento*” [72]. El cáncer de mama es una prioridad nacional y los esfuerzos se enfocan en el desarrollo e implementación de políticas y procedimientos para la prevención, diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades [73].

En cabeza del INC junto a diferentes estamentos académicos y gubernamentales, se definieron ocho líneas de investigación prioritarias orientadas a reducir la prevalencia del cáncer en Colombia [5]. Una de ellas corresponde a “*investigación en el diagnóstico y tratamiento del cáncer*” esta línea busca identificar alternativas para el tratamiento del cáncer a partir de la biodiversidad nacional. La búsqueda de nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer de mama es una prioridad para alcanzar los objetivos propuestos por el sistema de salud colombiano. El desarrollo de nuevos agentes terapéuticos debe involucrar fármacos con especificidad por las células tumorales, con menos efectos adversos para el paciente y que sean de bajo costo para asegurar una amplia cobertura [5].

El diseño y desarrollo de medicamentos es una labor dispendiosa que se realiza en varias etapas. Según Pfizer de 10.000 moléculas identificadas como potenciales, solo una llega a las etapas finales, estimándose que el costo del desarrollo de un medicamento es de 1000 millones de dólares y la duración del proceso es aproximadamente de 12 años, con ello la identificación de moléculas candidatas para el desarrollo de fármacos es la piedra angular del diseño y desarrollo de medicamentos de nueva generación [74].

De esta manera el desarrollo de medicamentos es un proceso costoso con objetivos a largo plazo que involucra varias fases de investigación [75].

Por lo tanto el grupo de investigación de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP; COL0115666) ha venido trabajando en la identificación de péptidos derivados de la LfcinB que son promisorios para el diseño y desarrollo de fármacos contra infecciones bacterianas y contra el cáncer. Actualmente se tienen identificados péptidos de LfcinB con actividad antibacteriana contra cepas Gram positivas y Gram negativas. También se ha reportado que modificaciones en la estructura peptídica para obtener los péptidos polivalentes como dímeros y tetrámeros mejoran la actividad antibacteriana respecto al péptido monomérico, así mismo los péptidos polivalentes presentan efecto citotóxico selectivo contra líneas celulares de cáncer oral de células escamosas OSCC [54,74].

Estos resultados demuestran que péptidos derivados de LfcinB con actividad antibacteriana pueden inhibir el crecimiento de células tumorales sugiriendo que estos péptidos tienen un alto potencial para su uso en pacientes con cáncer. Basados en la experiencia del grupo de investigación, es el interés de este trabajo identificar péptidos que puedan ser usados como fármacos específicamente en terapias contra el cáncer de mama. Acorde a los lineamientos establecidos por las entidades estatales, se desea contribuir con nuevas alternativas de moléculas que sirvan para combatir estas enfermedades.

Pregunta de Investigación

¿Los péptidos sintéticos derivados de LfcinB con actividad antibacteriana comprobada presentan actividad anticancerígena in vitro contra líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama?

Objetivo General

Evaluar la actividad anticancerígena in vitro de péptidos sintéticos derivados de LfcinB en líneas celulares humanas de cáncer de mama Humano.

Objetivos específicos

1. Obtener péptidos lineales purificados y caracterizados derivados de LfcinB.
2. Evaluar la actividad anticancerígena de péptidos lineales derivados de LfcinB en líneas celulares de cáncer de mama.
3. Diseñar y obtener péptidos diméricos, tetraméricos y cíclicos que contengan la secuencia del péptido lineal con mayor actividad anticancerígena in vitro en las líneas celulares de cáncer de mama evaluadas.
4. Evaluar la actividad anticancerígena in vitro del péptido dimérico, tetramérico y cíclico en líneas celulares de cáncer de mama.
5. Evaluar la actividad hemolítica y la actividad citotóxica en células normales de los péptidos diseñados que presentaron la mayor actividad anticancerígena in vitro.

3 Metodología

Para el desarrollo del presente trabajo se seleccionaron secuencias derivadas de la LfcinB, que contienen el motivo mínimo de actividad antibacteriana (RRWQWR). Se diseñaron péptidos polivalentes y con restricción conformacional (péptidos cíclicos) que contenían las secuencias seleccionadas. Inicialmente se pensó en una metodología excluyente donde se irían descartando péptidos según su actividad, sin embargo se optó por sintetizar todas las moléculas pensando en adquirir mayor información del comportamiento de los péptidos al evaluar la actividad citotóxica de todas las moléculas propuestas, para esto el trabajo se dividió en tres etapas:

Etapa 1. Síntesis química, purificación y caracterización de los péptidos diseñados. En esta etapa se realizó la síntesis química de los péptidos diseñados, la purificación y caracterización por RP-HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF (objetivo específico 1 y 3).

Etapa 2. Ensayos de citotoxicidad, selectividad y hemólisis. Esta etapa comprende los ensayos para establecer la citotoxicidad de los péptidos contra las líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™), MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™), MCF7 (ATCC® HTB-22™) y fibroblastos ATCC® PCS201-012™. También se evaluó la actividad hemolítica de los péptidos que presentaron el mayor efecto citotóxico contra las líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama (objetivos específicos 2, 4 y 5).

Etapa 3. Estudio preliminar del mecanismo de acción. Se realizaron ensayos para el estudio preliminar del mecanismo de acción del péptido LfcinB (20-25)₄ en la línea celular MCF7 (ATCC® HTB-22™) (trabajo no contemplado en los objetivos).

Las metodologías empleadas en cada una de las etapas formuladas se describen a continuación.

3.1 Etapa 1. Síntesis química, purificación y caracterización de los péptidos

Los péptidos utilizados en este trabajo contienen secuencias derivadas de la LfcinB que en ensayos previos presentaron actividad antibacteriana contra cepas Gram positivas y/o Gram negativas [77]. Se seleccionaron los péptidos lineales LfcinB (20-25) ²⁰RRWQWR²⁵, LfcinB (20-30) ²⁰RRWQWRMKKLG³⁰, [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31) ¹⁷FKARRWQWRMKKLG³¹ y el palíndromo LfcinB (21-25)_{Pal} RWQWRWQWR.

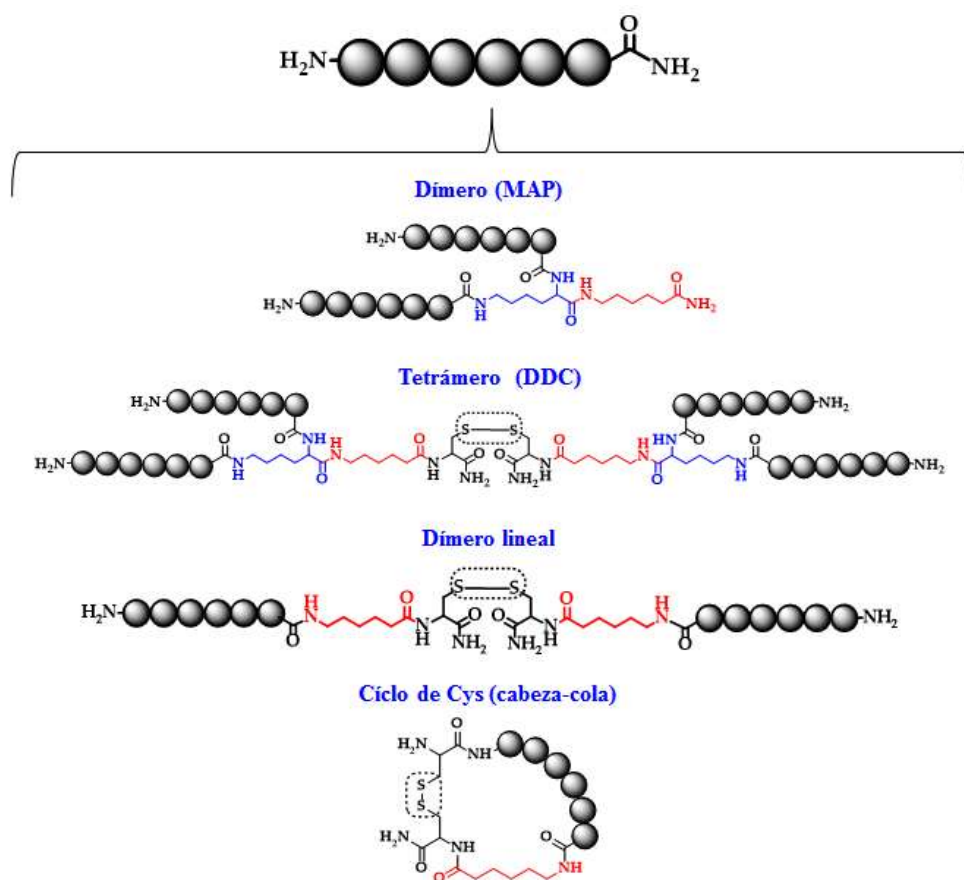


Figura 1. Estructura de los péptidos derivados de la LfcinB utilizados en este estudio. A partir de cada péptido lineal se diseñaron péptidos polivalentes; (i) péptido dimérico (MAP), péptido tetramérico (doble dímero, DDC) y (ii) péptidos cíclicos. Para la secuencia palindrómica se diseñó un péptido dimérico lineal. Los círculos grises representan los aminoácidos de la secuencia; la Cisteína se representa en (negro); ácido 6-aminohexanoico (rojo); Lisina (Azul).

Partiendo de cada secuencia lineal se construyó una familia de péptidos compuesta por: (i) péptido lineal o monomérico, (ii) péptido dimérico (MAP), (iii) péptido tetramérico (DDC) y (iv) péptido cíclico. Para el péptido palindrómico LfcinB (21-25)_{Pal} se sintetizó un péptido

dimérico lineal en lugar de un péptido cíclico. En la Figura 1 se muestran las estructuras diseñadas.

Adicionalmente, se sintetizaron péptidos que contienen la secuencia de la Aureina 1.2 que fueron utilizados como controles de actividad para determinar los parámetros experimentales necesarios para los ensayos de citotoxicidad [48]. En la Tabla 1 se reportan las secuencias de las moléculas que componen cada familia y el código asignado a cada una de ellas.

Tabla 1. Secuencias de péptidos diseñados para el presente estudio.

Familia	Código	Secuencia
LfcinB (20-25)	LfcinB (20-25)	²⁰ RRWQWR ²⁵
	LfcinB (20-25) ₂	(RRWQWR) ₂ K-Ahx
	LfcinB (20-25) ₄	((RRWQWR) ₂ K-Ahx-C) ₂
	LfcinB (20-25) _C	C-RRWQWR-Ahx-C
LfcinB (20-30)	LfcinB (20-30)	²⁰ RRWQWRMKKLG ³⁰
	LfcinB (20-30) ₂	(RRWQWRMKKLG) ₂ K-Ahx
	LfcinB (20-30) ₄	((RRWQWRMKKLG) ₂ K-Ahx-C) ₂
	LfcinB (20-30) _C	C-RRWQWRMKKLG-Ahx-C
[Ala ¹⁹]-LfcinB (17-31)	[Ala ¹⁹]-LfcinB (17-31)	¹⁷ FKARRWQWRMKKLGA ³¹
	[Ala ¹⁹]-LfcinB (17-31) ₂	(FKARRWQWRMKKLGA) ₂ K-Ahx
	[Ala ¹⁹]-LfcinB (17-31) ₄	((FKARRWQWRMKKLGA) ₂ K-Ahx-C) ₂
	[Ala ¹⁹]-LfcinB (17-31) _C	C-FKARRWQWRMKKLGA-Ahx-C
LfcinB (21-25) _{Pal}	LfcinB (21-25) _{Pal}	RWQWRWQWR
	LfcinB (21-25) _{Pal2}	(RWQWRWQWR) ₂ K-Ahx
	LfcinB (21-25) _{Pal4}	((RWQWRWQWR) ₂ K-Ahx-C) ₂
	LfcinB (21-25) _{Pal2*}	(RWQWRWQWR-Ahx-C) _{2*}
Aureina 1.2	Aureina 1.2	GLFDIIKKIAESF
	(Aureina 1.2) ₂	(GLFDIIKKIAESF) ₂ K-Ahx
	(Aureina 1.2) ₄	((GLFDIIKKIAESF) ₂ K-Ahx-C) ₂
	(Aureina 1.2) _C	C-GLFDIIKKIAESF-Ahx-C
*Dímero lineal		

Los péptidos diméricos, fueron construidos utilizando la estrategia de Multiple Antigen Peptides (MAPs) la cual utiliza el aminoácido Fmoc-Lys(Fmoc)-OH que permite sintetizar

simultáneamente dos cadenas peptídicas por sus extremos α -amino y ϵ -amino [78]. Los péptidos tetraméricos fueron obtenidas por la estrategia de doble dímeros, esta estrategia consiste en sintetizar el péptido dimérico conteniendo un residuo de Cisteína en el extremo C-terminal (dímero precursor), posteriormente se realiza un proceso de oxidación entre dos moléculas precursoras para formar un puente disulfuro intercatenario obteniendo el tetramero [79]. Los péptidos cíclicos fueron obtenidos mediante la incorporación de residuos de cisteína (Cys) en los extremos C y N-terminal de la secuencia, posteriormente esta molécula precursora se sometió a un proceso de oxidación para formar puentes disulfuro intracatenarios obteniendo el péptido cíclico [76]. El ácido 6-aminohexanoico (Ahx) se utilizó como espaciador facilitando las reacciones de oxidación y síntesis. La molécula palindrómica en forma de dímero lineal se obtuvo por oxidación del precursor monomérico que contiene un residuo de Cys en el extremo C-terminal (Figura 1), (Apartado 3.1.4).

3.1.1 Síntesis de péptidos en Fase Sólida estrategia Fmoc/tBu

Los péptidos fueron sintetizados usando la SPPS mediante la estrategia Fmoc/tBu [27] (Figura 2) utilizando el protocolo establecido en nuestro grupo de investigación.

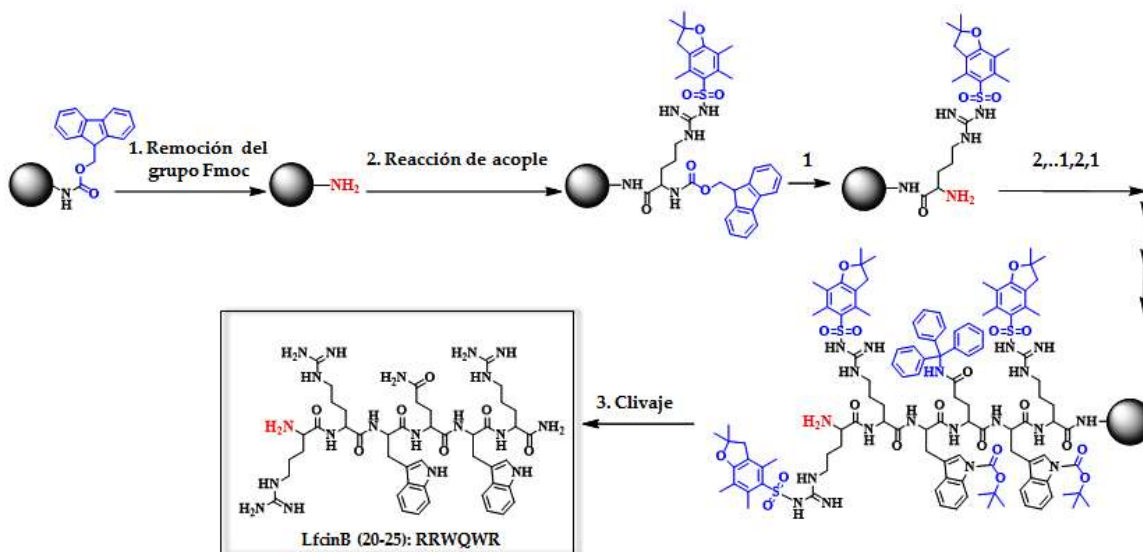


Figura 2. Esquema de la síntesis de péptidos en fase sólida por la estrategia Fmoc/tBu

Brevemente, la resina Rink amida (200 mg, con una sustitución de 0.46 meq/g) se sometió a un proceso de hinchamiento y solvatación de acuerdo con las recomendaciones del fabricante [80]. La remoción del grupo Fmoc (Figura 2. Paso 1) se realizó por tratamiento con solución de 4-metilpiperidina al 25%, tritón 1%, en N,N-dimetilformamida (DMF) (v/v) [81], luego la resina se lavó con DMF (4×1 min), 2-Isopropanol (IPA) (4×1 min) y Diclorometano (DCM) (4×1 min) y la presencia de los grupos amino libres se determinó por el test de Kaiser [82].

Las reacciones de activación y acople de los Fmoc-aminoácidos se realizaron utilizando carbodiimidas y/o sales de uronio (Figura 2. Paso 2). (i) *Estrategia de éster modificado*; se disolvió el aminoácido la N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y el 1-Hidroxi-6-clorobenzotriazol (6-Cl-HOBt) (1:1:1; 5 excesos respecto a los meq de resina) en DMF y se agitó por 15 min a temperatura ambiente (TA). (ii) *Estrategia del éster simple*; se disolvió el aminoácido, DCC, (1:1); 5 excesos respecto a los mEq de resina en DMF, agitando por 15 min a TA. (iii) *Sales de uronio*; se disolvió en DMF una mezcla de aminoácido, y tetrafluoroborato de O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) (1:1 meq respecto a los mEq de resina), luego se adicionaron 3 excesos de DIPEA respecto al TBTU y se mezcló por 5 min a TA. El aminoácido activado por las estrategias (i), (ii) o (iii) fue mezclado con la resina o resina-péptido y se mantuvo en reacción a TA (1 hora para (i) y (iii) y 2 horas o toda la noche para (ii), transcurrido el tiempo de reacción, la solución se retiró mediante filtración y se lavó con DMF (2×1 min), IPA (2×1 min) y DCM (2×1 min). La reacción fue monitoreada mediante el test de Kaiser.

Para realizar el test de Kaiser, se prepararon tres soluciones: (i) Fenol en etanol absoluto (4 g/mL); (ii) 1,0 mL de una solución acuosa de KCN (0,65 mg/mL) fue mezclado con 49,0 mL de Piridina; (iii) 1,25 g de Ninhídrina fueron disueltos en 25 mL de etanol absoluto. Las soluciones (i) y (ii) fueron mezcladas (1:1 v/v) y almacenadas y rotuladas como Solución A, la solución (iii) fue rotulada como Solución B y almacenada a 4°C en la oscuridad. Para realizar la prueba se tomó una fracción de la resina-péptido seca (~1 mg) a la que se adicionaron 150 µL de la mezcla de las soluciones A y B (2:1; v/v). La mezcla se sometió a calentamiento durante 5 min a 105°C. Una coloración azul indicó prueba positiva para la presencia de aminas primarias y la coloración amarilla indico prueba negativa.

La desprotección de las cadenas laterales y desanclaje del péptido se realizó tratando la resina-péptido con solución de TFA/H₂O/EDT/TIPS (92.5/2.5/2.5/2.5 % v/v) manteniéndose en reacción durante 4-6 horas a TA (Figura 2. Paso 3). La solución se filtró y el péptido se precipitó por adición de éter etílico frío. La solución se centrifugó a 2500 rpm por 10 min y el sobrenadante se desechó, luego se realizaron 5 lavados con éter etílico frío bajo las mismas condiciones descritas [83].

3.1.2 Caracterización de péptidos por cromatografía RP-HPLC analítica

De manera general; el péptido disuelto (1 mg/mL) en una mezcla de Agua:Acetonitrilo (1:1 v/v) fue analizado en un equipo HPLC Agilent series 1260 usando una columna C18 (Chromolith 4.6×50 mm) y empleando un gradiente de elución del 5 al 50% de solvente B (0,05% TFA en Acetonitrilo) en solvente A (0,05% TFA en Agua), el tiempo de gradiente fue de 8,0 min con un flujo de 2 mL/min y lectura a una longitud de onda de 210 nm. Para el caso de los péptidos de la familia Aureina 1.2 se empleó un gradiente de 15 a 75% de solvente B en 11,3 min.

3.1.3 Purificación de péptidos por extracción en fase sólida (RP-SPE)

Con base en el perfil cromatográfico se diseñó para cada péptido un gradiente de elución en una columna Supelclean LC-18 SPE-RP. La columna fue acondicionada de acuerdo con los protocolos del proveedor [84]. Los péptidos disueltos en solvente A, y/o A: B fueron filtrados por membrana de 0,44 µm y sembrados en la columna. La elución se realizó mediante un gradiente escalonado con concentraciones crecientes de Solvente B, las fracciones fueron recolectadas y analizadas por RP-HPLC reuniendo las fracciones con mayor pureza cromatográfica.

3.1.4 Formación de puentes disulfuro por oxidación

La formación de puentes disulfuro para la obtención de péptidos tetraméricos, cíclicos y dímeros lineales, fue llevada a cabo por oxidación de los péptidos precursores en medio acuoso y burbujeo de oxígeno atmosférico. Los péptidos fueron disueltos en agua desionizada (4 mg/mL para tetrámeros y dímeros lineales; 0,1 mg/mL para péptidos cíclicos) posteriormente el pH fue ajustado a 8,0 con Bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) a TA y agitación constante hasta desaparición de la especie de partida. Las reacciones fueron monitoreadas por RP-HPLC, finalmente el producto oxidado fue desalinizado y liofilizado [85].

3.1.5 Análisis de péptidos por espectrometría de masas

Se determinó la relación masa/carga de los péptidos mediante espectrometría de masas Matrix Assisted Laser Desorption Ionization -Time Of Flight (MALDI-TOF), utilizando un equipo Bruker Daltonics Microflex. El péptido (1 mg/mL) fue mezclado con ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinámico (1 mg/mL) en una relación 18:2,5 v/v. 1 μL de esta mezcla fue aplicada sobre la placa porta muestras del equipo y secada a TA, la lectura se realizó en modo de reflexión con una potencia de láser 35-50%. [86].

3.1.6 Disolución de los péptidos

Cada uno de los péptidos purificados y caracterizados (1mg), fueron solubilizados en 100 μL de PBS o en su defecto en 100 μL PBS/DMSO 3:1 v/v, se llevaron a una concentración final de 800 $\mu\text{g/mL}$ con medio de cultivo incompleto conteniendo penicilina a 50 U/mL y estreptomycin 50 $\mu\text{g/mL}$. Las soluciones fueron filtradas y congeladas a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso [87].

3.2 Etapa 2. Ensayos de citotoxicidad selectividad y hemólisis.

Las líneas celulares fueron seleccionadas teniendo en cuenta la frecuencia y agresividad del cáncer de mama, siendo los adenocarcinomas invasivos ductales los más frecuentemente diagnosticados en un 90% de casos.

Línea celular MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™): son células triples negativas tipo basal aisladas de un paciente de raza negra, presentan una frecuencia de diagnóstico de 10-20% y se relacionan con mal pronóstico. Fueron aisladas de la cavidad pleural y provienen de un adenocarcinoma invasivo ductal con morfología epitelial, sobre expresan EGFR y TGF α [88].

Línea celular MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™): Son células triples negativas con diferenciación estromal/mesenquimal, presentan una frecuencia de diagnóstico de 12-14%, presentan un mal pronóstico. Fueron aisladas de la cavidad pleural de un paciente caucásico y provienen de un adenocarcinoma invasivo ductal [89]. Son Claudin low y presentan mutación para el gen TP53, expresan el receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el receptor de crecimiento transformante alfa (TGF α) [90,91]. Se caracterizan por generar tumores o adenocarcinomas pobremente diferenciados grado III en el modelo murino. Son células adherentes altamente invasivas *in vitro*, mostrando un perfil de expresión génica característico que codifica vimetina (VIM), cadenas de colágeno I y IV, c-jun (JUN), glutatión transferasa p1 (GSTP1) y varios genes asociados a proteólisis (TIMP, MMP14, SERPINA 1). Esta línea celular ha sido ampliamente utilizada como modelo de cáncer de mama [92].

Línea celular MCF7 (ATCC® HTB-22™): son células luminales tipo A, se clasifican ER⁺, PR⁺ y HER2/neu⁻, subtipo luminal/epitelial, presentan una frecuencia de diagnóstico de 50-60 % y se relacionan con un buen pronóstico médico. Esta línea celular proviene de un adenocarcinoma invasivo ductal aisladas de la cavidad pleural [93], encontrándose intacto el gen TP53. Expresan las queratinas KRT8, KTR18 y KTR19, cadherina 1, claudina 4 y 7, desmoplakina, plakoglobina, proteína de unión a selenio 1 y proteína 1 censora de señales de calcio asociadas a tumor [94]. Esta línea celular ha sido ampliamente estudiada, utilizada en

modelos de cáncer de mama y tiene la característica de generar tumores y metástasis en el modelo murino, presentando alta motilidad [95].

Línea celular Primary Dermal Fibroblast Normal, Human, Adult (ATCC® PCS201-012™): formada por células normales provenientes de fibroblastos de piel, son las más abundantes del tejido conectivo y se encuentran en el estroma. Sintetizan factores de crecimiento, fibras de proteínas, colágeno y factores de la matriz extracelular [96].

3.2.1 Descongelamiento de líneas celulares, subcultivo y criopreservación

El criovial conteniendo las células, se descongeló con agitación suave a 37°C y se mezcló con medio de cultivo completo (DMEM + 10% de suero fetal bovino (SFB)) a 37° C, posteriormente las células fueron centrifugadas a 1250 rpm por 5 min, el sobrenadante fue descartado y el pellet se resuspendió en medio de cultivo completo. Se realizó el conteo celular mediante cámara de Newbauer y se determinó la viabilidad celular mediante la técnica de Azul de tripan (Apartado 3.2.2). Luego las células fueron dispensadas en cajas a una densidad de 2×10^4 células/cm². A una confluencia de 70-80% las células fueron cosechadas: primero fue descartado el medio de cultivo sin perturbar la monocapa, luego las células fueron lavadas dos veces con PBS y removidas de la caja con 1-2 mL de solución tripsina-EDTA a TA durante 5 min. Luego de separarse las células de la caja se adicionó medio de cultivo completo (6-8 mL) y la suspensión celular fue sometida a recuento por cámara de Newbauer y luego fue centrifugada a 1500 rpm durante 5 min. Las células fueron subcultivadas en una relación 1:3. Para la Criopreservación las células fueron cosechadas a 70-80 % de confluencia y fueron resuspendidas en criopreservante (medio de cultivo completo con DMSO al 5%) a razón de 2×10^6 células/mL siendo transferidas a crioviales y sometidas a enfriamiento en una rampa de -1°C /min hasta alcanzar los -80°C. Finalmente fueron almacenadas a -130°C en fase de vapor de nitrógeno líquido hasta su uso [97].

3.2.2 Viabilidad celular por conteo celular con Azul de tripán

Se mezclaron 90 µL de azul tripán (A.T) al 0.4% y 10 µL de la suspensión celular, luego 10 µL de esta mezcla fue colocada en la cámara de Newbauer y las células fueron contadas para

calcular el número de células vivas (células sin teñir) y células muertas (células teñidas de color azul). Las células localizadas en los márgenes externos superior e izquierdo no se incluyeron en el conteo. Para obtener valores confiables el rango de lectura del total de células se realizó entre $2,5 \times 10^4$ y $2,5 \times 10^6$ células/mL [98].

La suspensión celular se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \frac{\text{Total de células vivas}}{\text{Nº de cuadrantes } 4 \times 4 \text{ evaluados}} \times \text{factor de dilución} \times 10,000. \quad \text{Ec. 1}$$

$$\text{Células totales} = \frac{\text{Células}}{\text{mL}} \times \text{Volumen total (mL)} \quad \text{Ec. 2}$$

$$\text{Viabilidad celular (AT) (\%)} = \frac{\text{Nº Células vivas}}{\text{Nº Células vivas} + \text{Nº células muertas}} \times 10 \quad \text{Ec. 3}$$

3.2.3 Determinación de la cantidad óptima de células para los ensayos de toxicidad

La suspensión celular fue sembrada en cajas de 96 pozos partiendo de 100 μL (5×10^5 células/mL) y realizando diluciones seriadas en base 2, las células se incubaron toda la noche hasta su adhesión, posteriormente se cambió el medio de cultivo completo a medio incompleto por 24 horas para llevar a cabo la sincronización del cultivo hasta su uso [99]. La cantidad óptima de células correspondió a las densidades celulares con valores de absorbancia cercanos a la unidad en el ensayo de MTT.

3.2.4 Sincronización del cultivo celular

Las células fueron sembradas e incubadas hasta su adhesión al soporte, luego de 12 horas el medio de cultivo completo (DMEM-SFB) fue cambiado por medio de cultivo incompleto (DMEM). Las células fueron incubadas a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) y luego se realizó el ensayo MTT.

3.2.5 *Ensayo de Viabilidad celular por (MTT)*

Los ensayos MTT se realizaron de acuerdo con la metodología estandarizada en el grupo de investigación de Hormonas del Departamento de Química. Brevemente, las células sembradas y sincronizadas en placas de 96 pozos, fueron incubadas a 37°C durante 2 horas con 100 µL de péptido (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,1 µg/mL). Luego, la caja fue centrifugada por 5 min a 1500 rpm, el sobrenadante fue removido y reemplazado por 200 µL de medio incompleto conteniendo 10% de Bromuro de 3-4,5dimetiltiazol-2-ilo-2,5-difeniltetrazol (MTT) e incubadas por 2 horas. Luego, el medio fue reemplazado por 100 µL de DMSO y luego de 30 min de incubación a 37°C, la absorbancia fue medida a 550 nm. Como control negativo se usó medio de cultivo incompleto con MTT al 10% y como control positivo se usaron células sin tratamiento con MTT [100].

El porcentaje de viabilidad fue calculado de la siguiente manera:

$$\% Viabilidad = \frac{Abs\ tratamiento - Abs\ control\ negativo}{Abs\ control\ positivo - Abs\ control\ negativo} \times 100. \quad \text{Ec. 4}$$

3.2.6 *Actividad hemolítica de los péptidos*

Glóbulos rojos humanos normales (O+) fueron centrifugados a 2500 rpm. durante 5 min y lavados tres veces con PBS o en su defecto solución salina al 0.9%. Posteriormente 100 µL de células (2% de hematocrito) fueron mezclados con 100 µL del péptido (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,1 µg/mL) e incubados a 37°C durante 2 horas. Las muestras fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 5 min, el sobrenadante fue transferido a una placa de 96 pocillos y la absorbancia leída a 540 nm. El 0% de hemólisis fue tomado como el sobrenadante de los glóbulos rojos en PBS, mientras que el 100% de hemólisis correspondió al sobrenadante de glóbulos rojos tratados con agua destilada.[101]

El porcentaje de hemólisis fue calculado de la siguiente manera:

$$Hemólisis = \frac{(Abs\ tratamiento - a\ 0\% \text{ de hemólisis})}{(Abs\ a\ 100\% \text{ de hemólisis} - Abs\ 0\% \text{ de hemólisis})} * 100 \quad \text{Ec.5}$$

3.3 Etapa 3. Estudio preliminar del mecanismo de acción

Para la realización de estos ensayos se seleccionó el péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄ por su alta actividad citotóxica, el cual cuenta con estudios en otros tipos de cáncer como OSCC permitiendo realizar algunas comparaciones con resultados previos. Los ensayos preliminares del mecanismo de acción se realizaron con la línea celular HTB-22™ la cual es uno de los modelos *in-vitro* más ampliamente usado en investigaciones de cáncer de mama.

3.3.1 Evaluación de la membrana citoplasmática utilizando SYTO 9/ IP

Las células MCF7 (ATCC® HTB-22™) fueron sembradas y sincronizadas en caja de 24 pozos a razón de 6×10^5 células/pozo, el medio de cultivo fue reemplazado con 400 μ L de una solución que contiene el péptido LfcinB (20-25)₄ (15, 30 y 60 μ g/mL), luego de 6 horas de tratamiento las células fueron cosechadas con tripsina y centrifugadas a 2500 rpm. durante 5 min, el pellet fue lavado con PBS y teñido con 30 μ L de una solución del kit comercial LIVE/DEAD® FungaLight™ que contenía la mezcla los fluorocromos (0,5 μ L de SYTO9 y/o 0,5 μ L de Ioduro de Propidio (IP) con 99 μ L de PBS). Luego, las células fueron incubadas a TA durante 20 min y centrifugadas, el pellet fue resuspendido en 100 μ L de PBS y analizado mediante citometría de flujo en un equipo BD Accuri C6. Los eventos fueron registrados usando el canal verde (FL1) y rojo (FL3). Control negativo: células no tratadas marcadas, control positivo: células tratadas con actinomicina 10 μ g/mL durante 24 horas [102, 103].

3.3.2 Ensayo para determinar tipo de muerte celular Apoptosis / Necrosis

Las células MCF7 (ATCC® HTB-22™) fueron sembradas y sincronizadas en caja de 24 pozos a razón de 6×10^5 células/pozo, el medio de cultivo incompleto fue reemplazado con 400 μ L de una solución de péptido LfcinB (20-25)₄ a una concentración de 30 μ g/mL (MIC) durante 1 hora. Pasado el tiempo las células fueron cosechadas con tripsina, centrifugadas a 1800 rpm, lavadas con PBS y resuspendidas en 20 μ L de buffer de tinción con los fluorocromos (Hepes 10 mM pH 7,4; 10 mM NaCl y 2,5 mM de CaCl₂ que contenían 1 μ L

de fluorocromo 7AAD y 1 μL de Anexina V). Las células con los fluorocromos fueron incubadas a 37°C por 15 min y resuspendidas en 80 μL de buffer de tinción sin fluorocromos y analizadas por citometría de flujo. Como controles se usaron células necróticas: células tratadas con EDTA 15 mM por 20 min, células apoptóticas: células tratadas con Actinomicina a 10 μM durante 12 horas, control negativo: células sin tratamiento [104].

3.3.3 Determinación de la despolarización de la membrana mitocondrial

Para este ensayo se utilizó el kit MitoProbe™ JC-1 Assay (M34152 de Termofisher). Las células sembradas y sincronizadas en caja de 24 pozos (6×10^5 células/pozo) fueron incubadas con 400 μL del péptido LfcinB (20-25)₄ (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 0,5, 1 y 2 horas. Luego las células fueron tripsinizadas y recolectadas mediante centrifugación a 400 g x 5 min. El pellet resultante fue teñido agregando 100 μL de JC1 “working solution” (solución 1:100 de JC1 reconstituido en DMSO: Buffer assay 1X) e incubando a 37°C por 20 min. Luego las células fueron lavadas dos veces con “Buffer assay 1X” y finalmente fueron resuspendidas en 100 μL de Buffer assay 1X para su lectura en el citómetro. Control negativo: células sin tratamiento, control positivo: células tratadas con actinomicina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 horas [105].

3.3.4 Determinación de la liberación de Calcio intracelular

Se utilizó el kit “Calcium Assay Kit de DB Biosciences (640176)”. A las células sembradas y sincronizadas en caja de 24 pozos (6×10^5 células/pozo) se les adicionó una solución de tinción (10 μL de “calcium indicator” y 10 mL “signal enhancer 1X”) en relación 1:1 respecto al medio de cultivo e incubadas a 37°C durante 1 hora, el sobrenadante fue removido y las células tripsinizadas, recolectadas y centrifugadas a $400\text{g} \times 5$ min, el pellet fue resuspendido con 500 μL de medio de cultivo incompleto con posterior análisis mediante lectura continua de la fluorescencia en el canal FL1 durante 5 min, al término del tiempo se adicionaron 50 μL de péptido LfcinB (20-25)₄ (concentración final 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) manteniéndose la lectura hasta los 25 min. Como control negativo se realizó una adición de 50 μL de medio incompleto bajo las mismas condiciones [106].

4 Resultados y Discusión

4.1 Etapa 1. Síntesis química, purificación y caracterización de los péptidos (objetivos específicos 1 y 3)

Logros alcanzados	
Etapa 1	<ul style="list-style-type: none">• Se obtienen 20 péptidos derivados de la LfcinB; péptidos monoméricos, diméricos lineales. Diméricos (MAPs), tetraméricos y cíclicos• Se purifican los péptidos por cromatografía RP-SPE y caracterizan por cromatografía RP-HPLC, en la mayoría de los casos con una pureza cromatográfica superior al 90%.• Se caracterizan los péptidos por espectrometría de masas MALDI-TOF, presentando la relación m/z esperada.• Se obtienen los péptidos tetraméricos, cíclicos y el péptido dimérico lineal mediante la formación de puentes disulfuro.• Se Implementa la estandarización de la metodología para la obtención, purificación y caracterización de péptidos diméricos, tetraméricos y cíclicos que contienen las secuencias LfcinB(20-30), [Ala¹⁹]-LfcinB(17-31), LfcinB(21-25)_{Pal} y de Aureina 1.2.

4.1.1 Síntesis química

La obtención de los péptidos se realizó utilizando la estrategia SPPS-Fmoc/*t*Bu de forma manual. El proceso sintético no presentó mayores dificultades siendo posible realizar todas las reacciones de acople, desprotección, monitoreo y desanclaje. Cada familia de péptidos LfcinB (20-25), LfcinB (21-25)_{Pal}, LfcinB (20-30), [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31) y Aureina 1,2 conto con cuatro miembros los cuales fueron sintetizados simultáneamente de tal forma que los reactores se sometieron al mismo número de ciclos de reacción de acople, monitoreo y desprotección. Este procedimiento se realizó para garantizar la homogeneidad en los productos finales.

La Figura 3 muestra el número de ciclos de reacción necesarios para la incorporación completa de cada uno de los aminoácidos en su respectiva familia.

La síntesis de las familias LfcinB (20-25) y LfcinB (21-25)_{Pal} mostraron un comportamiento similar; Los aminoácidos Arginina (Arg) y Glutamina (Gln) presentaron la mayor dificultad en el proceso de acople requiriendo dos o tres ciclos de reacción y diferentes estrategias sintéticas para la completar incorporación del aminoácido a la secuencia peptídica.

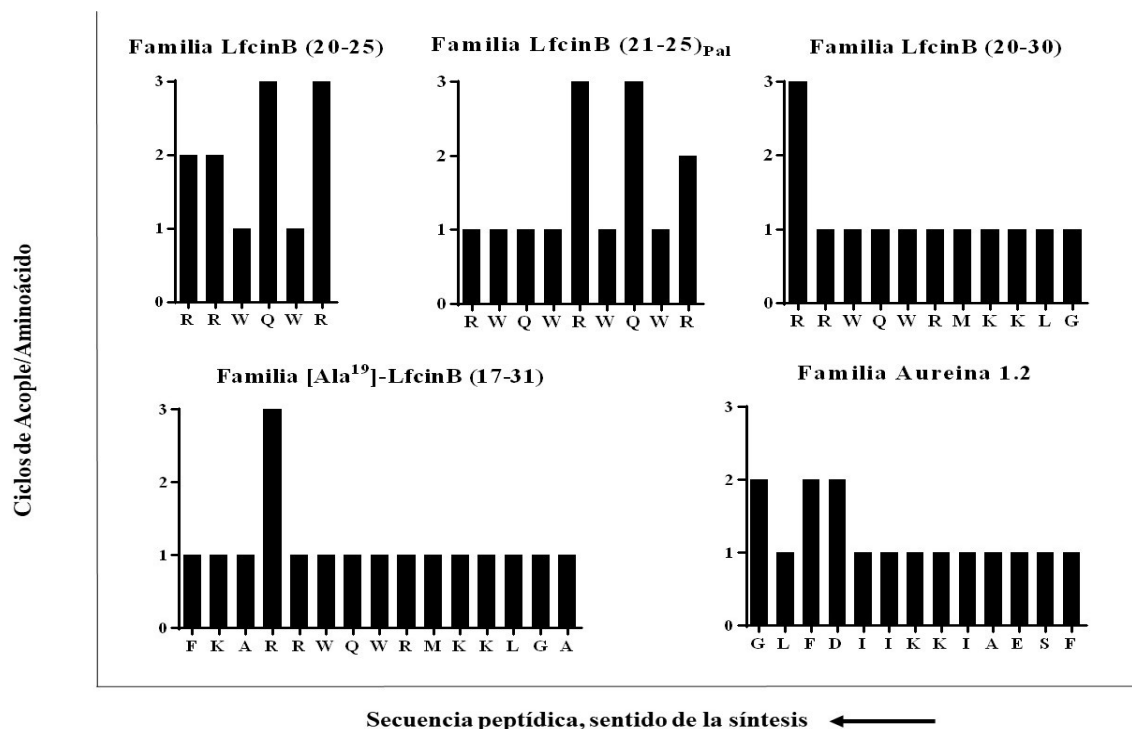


Figura 3. Número de ciclos de reacción necesarios para la incorporación de cada uno de los aminoácidos. El sentido de la síntesis fue realizado desde el extremo carboxi terminal hacia el extremo N-terminal (sentido derecha-izquierda en la secuencia peptídica).

Para las familias LfcinB (20-30) y [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31), la incorporación de la Arg en la posición 20 requirió tres ciclos de reacción de acople. En el caso de los péptidos de la familia de Aureina 1.2, la mayor dificultad en las reacciones de acople se presentó en los aminoácidos de la región N-terminal; ácido aspártico (Asp), Fenilalanina (Phe) y Glicina (Gly), donde se requirieron dos ciclos de reacción de acople para su incorporación a la secuencia.

Se ha sugerido por varios autores que la dificultad para completar las reacciones de acople de los aminoácidos en la SPSS se debe en mayor medida al impedimento estérico; a medida

que aumenta la longitud de la cadena peptídica se incrementa la dificultad del acceso del aminoácido activado a los sitios de reacción. El impedimento estérico puede estar influenciado por el volumen del aminoácido a incorporar, la secuencia peptídica unida a la resina, el solvente y a la agregación de las cadenas peptídicas en crecimiento sobre el soporte sólido [107].

4.1.2 Purificación y Caracterización

Posterior a la síntesis de las cadenas peptídicas se realiza del proceso de clivaje para obtener los péptidos crudos (péptidos sin purificar). Cada molécula fue analizada por cromatografía RP-HPLC. Todas las moléculas presentaron perfiles cromatográficos con una especie mayoritaria, indicando que el proceso de síntesis y clivaje fue eficiente.

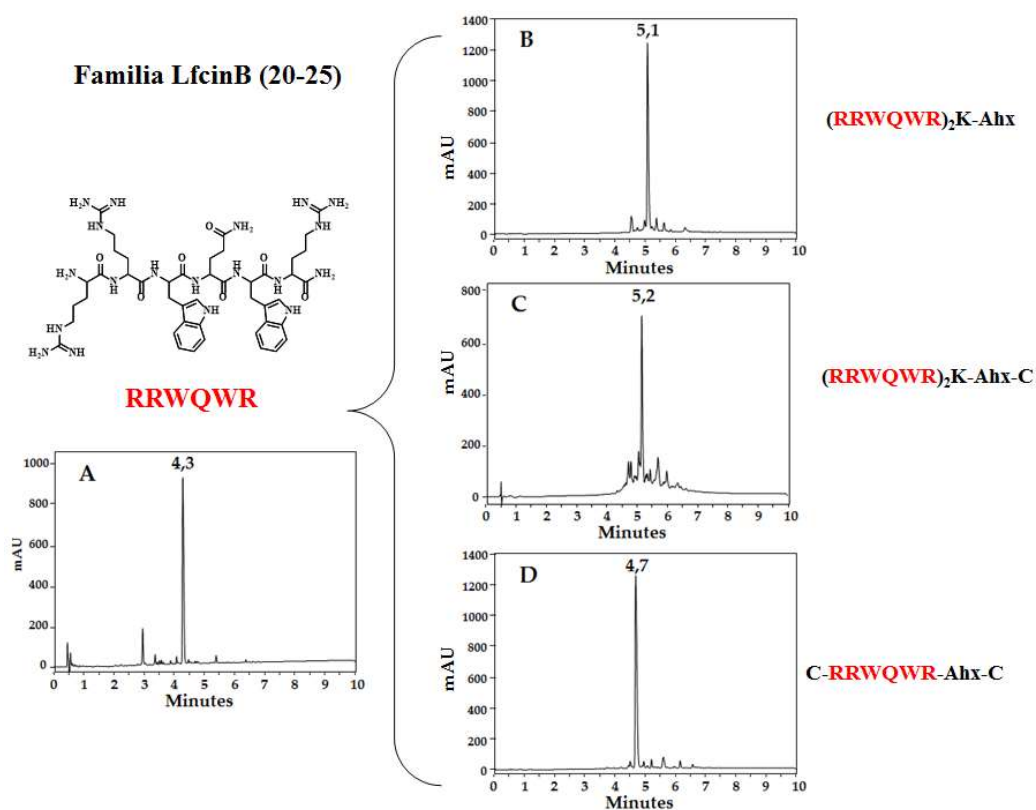


Figura 4. Perfiles cromatográficos de los productos crudos de la familia LfcinB (20-25). Péptido monomérico (A), Péptido dimérico (MAP) (B), Precursor del péptido tetramérico (C) y precursor del péptido cíclico (D).

A manera de ejemplo se muestran los perfiles cromatográficos de los péptidos crudos correspondientes a la familia LfcinB (20-25) (Figura 4), allí se observa una especie mayoritaria y la presencia de especies no deseadas que se encuentran en menor cantidad. Los perfiles cromatográficos muestran que el tiempo de retención (t_R) del péptido dimérico (RRWQWR)₂K-Ahx y el péptido precursor del tetrámero (RRWQWR)₂K-Ahx-C son similares entre si y mayores al t_R del péptido monomérico, este comportamiento fue común para todas las familias de péptidos (Tabla 2).

El aumento del t_R de los dímeros y tetrámeros posiblemente obedece al incremento de la hidrofobicidad causado por la duplicación de la secuencia en las moléculas.

Los precursores de los péptidos cíclicos presentaron t_R intermedios entre los péptidos monoméricos y los tetrámeros, este comportamiento pudo ser debido a la presencia extra de los residuos de Aminohexanoico (Ahx) y cisteínas (Cys) ubicados en los extremos C y N terminal, generando un ligero aumento en la hidrofobicidad de la molécula [108].

La purificación de los péptidos se realizó por RP-SPE teniendo en cuenta el perfil cromatográfico de cada péptido crudo. Las fracciones obtenidas por RP-SPE fueron analizadas por RP-HPLC y aquellas con mayor pureza cromatográfica fueron unidas y liofilizadas. El producto puro fue analizado nuevamente por RP-HPLC y luego por EM MALDI-TOF. La mayoría de los péptidos presentaron purezas cromatográficas entre el 85 y 99 %, (Tabla 2) (Anexo I). A manera de ejemplo presenta la caracterización del péptido LfcinB (20-25) purificado (Figura 5).

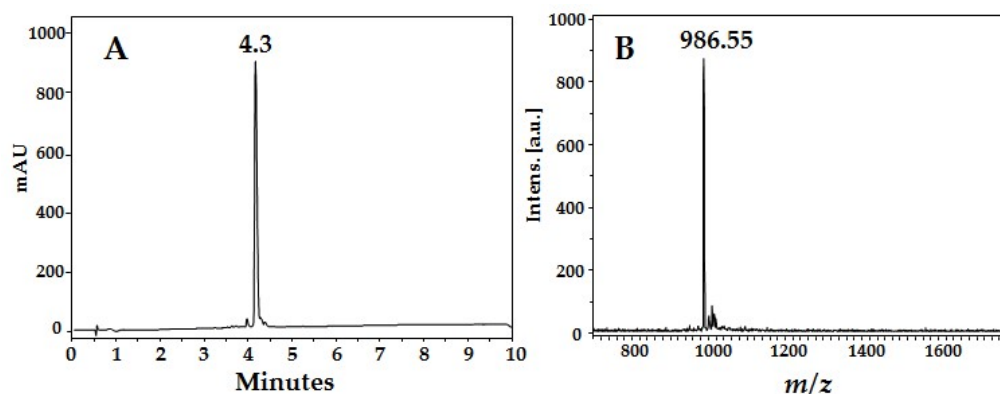


Figura 5. Caracterización del péptido LfcinB (20-25) purificado. Análisis por RP-HPLC (A) y por EM MALDI-TOF (B), la señal observada corresponde a la especie [M+H].

Tabla 2. Caracterización de los péptidos puros por cromatografía RP-HPLC y EM MALDI-TOF.

Péptido	Caracterización Analítica				
	RP-HPLC		EM MALDI-TOF		
	t _R (min)	Pureza ^c (%)	Masa Monoisotópica	Experimental <i>m/z</i> , [M + H] ⁺ [M + Na] ⁺	
²⁰RRWQWR²⁵	4,3	92	985,54	986,55	-
(RRWQWR) ₂ K-Ahx	5,1	86	2195,24	2198,46	-
(RRWQWR) ₂ K-Ahx-C ^a	5,2	86	2298,24	2300,93	-
C-RRWQWR-Ahx-C ^b	4,7	85	1304,64	1306,08	-
²⁰RRWQWRMKKLG³⁰	4,6	95	1542,87	1544,53	-
(RRWQWRMKKLG) ₂ K-Ahx	5,3	86	3309,91	3311,62	-
(RRWQWRMKKLG) ₂ K-Ahx-C ^a	5,3	90	3412,92	3415,07	-
C-RRWQWRMKKLG-Ahx-C ^b	4,9	95	1861,98	1862,14	-
¹⁷FKARRWQWRMKKLG³¹	4,8	95	1960,11	1961,99	-
(FKARRWQWRMKKLG) ₂ K-Ahx	5,4	88	4144,38	4146,73	-
(FKARRWQWRMKKLG) ₂ K-Ahx-C ^a	5,5	85	4247,39	4255,51	-
C-FKARRWQWRMKKLG-Ahx-C ^b	5,5	92	2279,21	2279,93	-
RWQWRWQWR	5,8	89	1485,70	1486,40	-
(RWQWRWQWR) ₂ K-Ahx	6,5	91	3195,60	3197,00	-
(RWQWRWQWR) ₂ K-Ahx-C ^a	6,5	90	3298,60	3300,90	-
RWQWRWQWR-Ahx-C ^d	6,0	94	1704,80	1703,40	-
GLFDIHKIAESF	7,0	90	1478,80	1479,90	1501,40
(GLFDIHKIAESF) ₂ K-Ahx	9,5	98	3181,80	3183,80	3205,70
(GLFDIHKIAESF) ₂ K-Ahx-C ^a	9,5	65	3284,80	3290,80	3313,00
C-GLFDIHKIAESF-Ahx-C ^b	7,3	90	1799,10	1823,10	1845,00

^a precursor del péptido tetramérico; ^b precursor del péptido cíclico, ^c pureza cromatográfica correspondiente al porcentaje de área del pico cromatográfico respecto a todo el cromatograma. ^d precursor del dímero lineal.

4.1.3 Oxidación de los péptidos precursores

La obtención de los péptidos tetraméricos y cíclicos implicó la oxidación de los péptidos precursores para formar los puentes disulfuro tanto intermoleculares (péptidos tetraméricos y dímero lineal) como intramoleculares (péptidos cíclicos). El proceso de oxidación de los precursores fue monitoreado por cromatografía RP-HPLC.

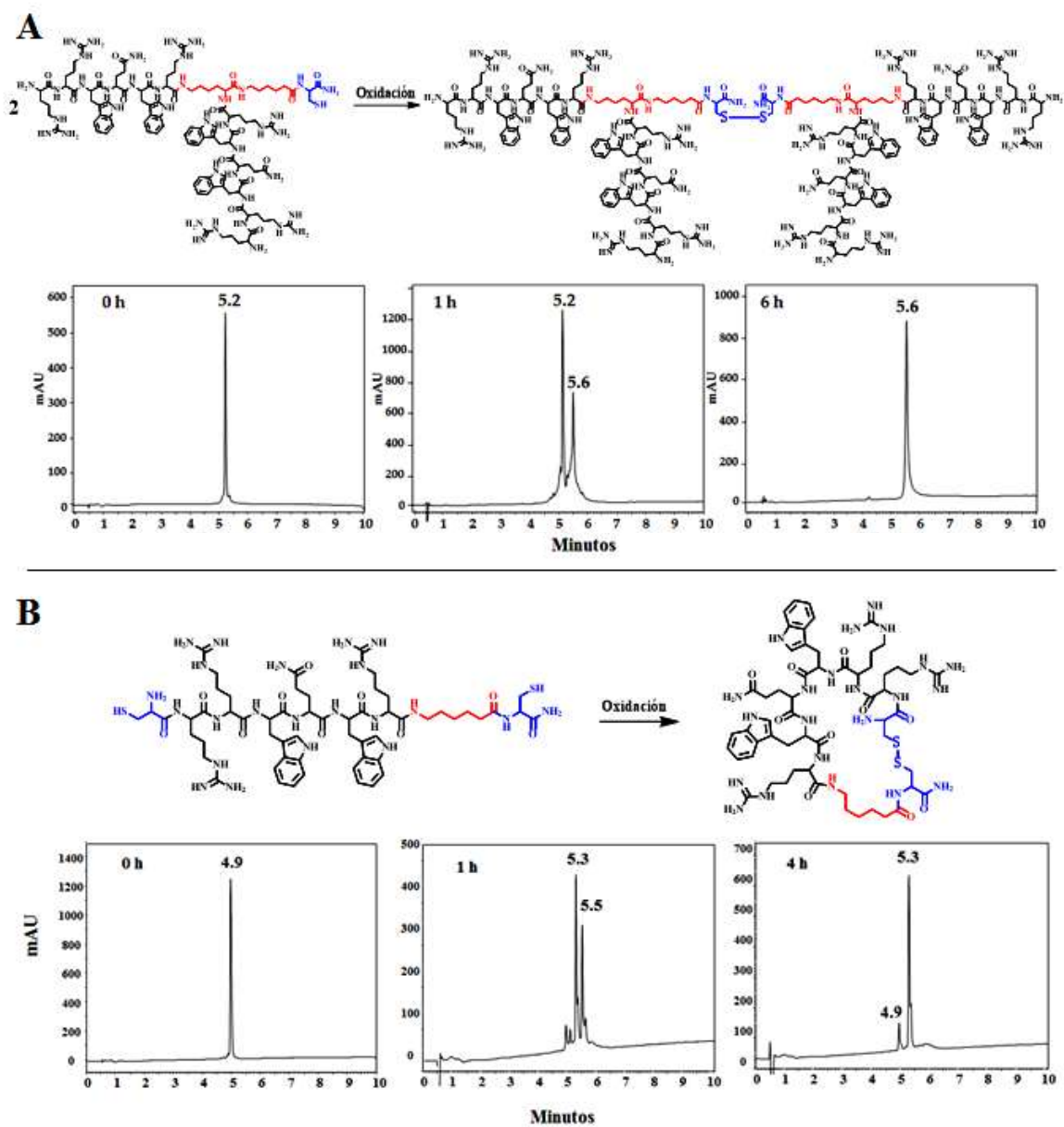


Figura 6. Monitoreo de las reacciones de oxidación de péptidos precursores por cromatografía RP-HPLC. A) se observa el esquema de la reacción de oxidación del péptido precursor $(RRWQWR)_2K-Ahx-C$ para la obtención del péptido $LfcinB(20-25)_4$, se aprecian los perfiles cromatográficos de la mezcla de reacción a tiempos de reacción 0, 1 y 6 h. B) el esquema de la reacción de oxidación para la obtención del péptido $LfcinB(20-25)_C$ y los perfiles cromatográficos de la mezcla de reacción a tiempos de reacción 0, 1 y 4 h.

La reacción de oxidación para la obtención del péptido tetramérico $LfcinB(20-25)_4$ se muestra en la Figura 6A; se puede observar el perfil cromatográfico del péptido precursor con $t_R = 5,2$ min (reactivo de partida). El perfil cromatográfico de la mezcla de reacción luego de 1 hora de oxidación muestra la presencia de dos señales; el precursor y el péptido $LfcinB$

(20-25)₄ ($t_R = 5,6$ min). El perfil cromatográfico de la mezcla de reacción luego de 6 horas de oxidación presenta una sola señal que corresponde al péptido LfcinB (20-25)₄ indicando que la oxidación fue completa. Para la formación de las moléculas cíclicas las moléculas precursoras se oxidaron usando una solución diluida de péptido lo cual promueve la formación del péptido cíclico y minimiza la formación de moléculas diméricas. En la Figura 6B se muestra la oxidación del péptido precursor C-RRWQWR-Ahx-C para obtener el péptido cíclico LfcinB (20-25)_C. El perfil cromatográfico del precursor puro presenta una señal en $t_R = 5,3$ min. El perfil cromatográfico de la mezcla de reacción luego de 1 hora de oxidación muestra la presencia de dos señales; la del precursor y la del péptido LfcinB (20-25)_C ($t_R = 5,3$ min) y luego de 4 horas de reacción se observa que la señal del péptido cíclico es mayoritaria y la señal del péptido precursor es minoritaria. Los resultados de síntesis, purificación y caracterización de los péptidos de la familia de Aureina 1.2 puede ser consultada en el Anexo II.

4.2 Etapa 2. Evaluación del efecto citotóxico y actividad hemolítica de los péptidos derivados de la LfcinB (Objetivos específicos 2,4 y 5)

Logros alcanzados	
Etapa 2	<ul style="list-style-type: none"> • Se evalúa el efecto citotóxico de los péptidos obtenidos contra las líneas celulares HTB-132TM y HTB-26TM. • Se determina el mayor efecto citotóxico de los péptidos diméricos y tetraméricos respecto a los péptidos monoméricos de las familias LfcinB (20-25), LfcinB (20-30) y [Ala1¹⁹]-LfcinB (17-31). También se demuestra la toxicidad de los péptidos de la familia LfcinB (21-25)_{Pal}. • Se evidencia que el efecto citotóxico de los péptidos es rápido y dependiente de la concentración. • Se establece que los péptidos con mayor efecto citotóxico contra las líneas celulares HTB-132TM y HTB-22TM no presentaron efecto citotóxico significativo contra la línea celular de fibroblastos normales PCS201-012TM. • Se determina que uno de los mayores efectos citotóxicos y selectivos fue presentado por el péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄ contra las líneas celulares de cáncer de mama evaluadas. • Se establece que el efecto citotóxico del péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄ contra las líneas celulares HTB-132TM y HTB-26TM, fue rápido y mantenido durante las 4 horas de tratamiento. • Se determina que los péptidos LfcinB (20-30)₂ y LfcinB (21-25)_{Pal} presentaron el mayor índice de selectividad con una baja actividad hemolítica. • Se concluye que los péptidos LfcinB (20-25)₄, LfcinB (20-30)₂ y LfcinB (21-25)_{Pal} pueden ser considerados promisorios para el desarrollo de agentes terapéuticos contra el cáncer de mama.

4.2.1 Determinación del número óptimo de células para los ensayos MTT

Las curvas de calibración (N° células vs Absorbancia) se realizaron para cada una de las líneas celulares estableciéndose la cantidad óptima de células para los ensayos de MTT

(Anexo III). Las curvas fueron construidas incubando diferentes cantidades de células y realizando los ensayos de MTT en ausencia de tratamiento. Los resultados obtenidos mostraron que hay una relación lineal directa entre la cantidad de células y la absorbancia en todas las líneas celulares. Se determinó la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación por ajuste de mínimos cuadrados. La cantidad óptima de células se determinó a confluencias celulares entre 80-90% y absorbancias cercanas a 1 (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de las curvas de calibración obtenidas con cada línea celular.

Línea celular ATCC	Tiempo duplicación (h)	Ecuación de la recta	R ²	10 ⁴ Células x pozo /absorbancia
HTB-132™	47	$Y = 4,419 \times 10^{-005} X + 0,09996$	0,9951	2,5/1,20
HTB-26™	36	$Y = 2,882 \times 10^{-005} X + 0,14100$	0,9927	2,5/0,86
HTB-22™	38	$Y = 1,349 \times 10^{-005} X + 0,04803$	0,9814	1,5/0,25
PCS201-012™	24	$Y = 3,592 \times 10^{-005} X + 0,05187$	0,9951	2,5/0,94

4.2.2 Sincronización del cultivo celular

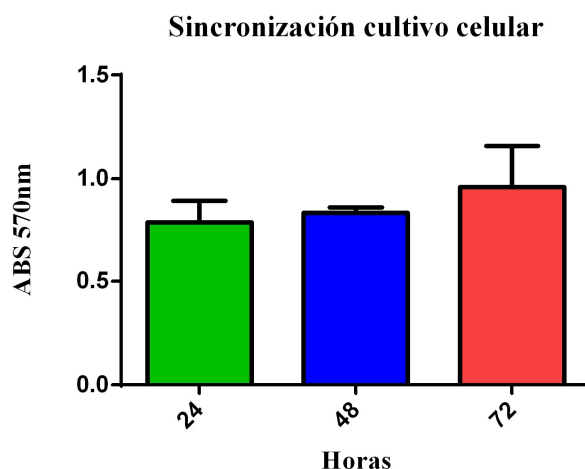


Figura 6. Sincronización de las células HTB-132™. Viabilidad celular evaluada por el ensayo de MTT. La absorbancia fue medida a 570 nm a 24, 48 y 72 horas. ± S.D. (n = 6); (análisis ANOVA, p > 0,05).

Los resultados obtenidos (Figura 6) muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las lecturas en los diferentes tiempos, sugiriendo una correcta sincronización del cultivo celular ya que el metabolismo y/o la cantidad de células viables no fueron afectados durante los tiempos evaluados. Teniendo en cuenta que el tiempo de duplicación celular es de 47 horas [88], es posible inferir que la sincronización de las células se realizó en la etapa G0-G1 [99].

4.2.3 Viabilidad celular (MTT) en células HTB-132TM y HTB-26TM

Se determinó la citotoxicidad de los péptidos a diferentes concentraciones en las líneas celulares HTB-132TM y HTB-26TM. Los resultados muestran que los péptidos diméricos y tetraméricos que incluyen la secuencia RRWQWR [LfcinB (20–25)₄, LfcinB (20–30)₂, LfcinB (20–30)₄, [Ala¹⁹]-LfcinB (17–31)₂] presentaron los mayores efectos citotóxicos en sus respectivas familias exhibiendo viabilidades celulares inferiores al 20% bajo el rango de concentraciones utilizado, los miembros de la familia LfcinB(21-25)_{pal} [(LfcinB(21-25)_{pal}, LfcinB(21-25)_{pal2}, LfcinB(21-25)_{pal2L} y LfcinB(21-25)_{pal4}] también mostraron efectos citotóxicos, exhibiendo viabilidades celulares inferiores a 40% bajo las condiciones del ensayo (Figura 7 y 9).

Los péptidos monoméricos LfcinB (20–25), LfcinB (20–30), [Ala¹⁹]-LfcinB (17–31) y los péptidos cíclicos LfcinB (20–25)_c y [Ala¹⁹]-LfcinB (17–31)_c presentaron los menores efectos citotóxicos contra las dos líneas celulares, presentando viabilidades cercanas a 80% a 2 horas de tratamiento en el rango de concentraciones utilizados, sin embargo el péptido LfcinB (20–30)_c fue el único péptido cíclico que presentó actividad citotóxica similar a dímeros y tetrameros en la línea celular HTB-132TM (Figura 7).

El bajo efecto citotóxico observado para el péptido monomérico LfcinB (20–25) es consistente con reportes previos donde esta molécula también presentó efecto citotóxico disminuido contra las líneas celulares Jurkat T, CCRF-CEM y HTB-26TM. Sin embargo, cuando el péptido fue liberado en el citoplasma de las células HTB-26TM utilizando liposomas fusogénicos, se indujo fragmentación del ADN dependiente de cathepsina B y mediado por caspasas [63]. Los autores sugieren que el efecto citotóxico del péptido LfcinB (20-25) está

asociado principalmente contra blancos intracelulares. Además, se ha descrito que la quimera formada por LfcinB (20–25) y el péptido hLF11 separados por Pro o Gly-Gly tiene mayor efecto citotóxico contra células Jurkat T que los péptidos individuales. Se sugiere que el péptido monomérico difícilmente permea la membrana celular [109]. Nuestros resultados están de acuerdo con los estudios que indican una baja toxicidad de los péptidos LfcinB (20–25) y LfcinB (20–30) contra líneas celulares de cáncer [AGS ($IC_{50} > 500 \mu M$)] [110]. Además la LfcinB y el péptido LfcinB (20–25) presentaron bajo efecto citotóxico contra la línea celular humana derivada de cáncer de mama HTB-26TM [109].

En contraste, los péptidos diméricos y tetraméricos en este trabajo tienen el máximo efecto citotóxico contra las líneas celulares evaluadas en el rango de concentraciones de 50-100 $\mu g/mL$. En la línea celular HTB-132TM el mayor efecto citotóxico lo presentó el péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄, exhibiendo un porcentaje de viabilidad cercano a cero en una concentración de 50 $\mu g/mL$. En la línea celular HTB-26TM el péptido con mayor efecto citotóxico correspondió al dímero LfcinB (20-30)₂ con un porcentaje de viabilidad cercano al 5% a la concentración de 100 $\mu g/mL$ (Figura 7).

Los péptidos diméricos y tetraméricos LfcinB (20–30)₂, LfcinB (20–30)₄, [Ala¹⁹]-LfcinB (17–31)₂ y [Ala¹⁹]-LfcinB (17–31)₄ presentaron efecto citotóxico significativo contra ambas líneas celulares a una concentración de 200 $\mu g/mL$, con un porcentaje de viabilidad celular cercano a cero. El efecto citotóxico de estos péptidos fue dependiente de la concentración con valores de IC_{50} entre 6 y 12 μM para la línea celular HTB-132TM y entre 4 y 31 μM para la línea celular HTB-26TM (Figura 7; Tabla 4). El efecto citotóxico de los péptidos diméricos y tetraméricos fue mayor para la línea celular HTB-132TM, indicando que esta línea celular presentó mayor sensibilidad.

Los valores calculados de IC_{50} (Tabla 4) muestran que los péptidos diméricos y tetraméricos que contienen el motivo RRWQWR tienen mayor citotoxicidad contra las líneas celulares de cáncer de mama respecto a sus análogos monoméricos y cíclicos. Este comportamiento sugiere que la polivalencia incrementa significativamente la actividad anticancerígena.

El mecanismo de acción propuesto para la LfcinB se basa en una interacción inicial de naturaleza electrostática entre las cargas positivas de las cadenas laterales de la LfcinB y las cargas negativas de algunas moléculas en la superficie celular, este proceso es completamente

indispensable para que las cadenas hidrofóbicas del péptido entren en contacto con la membrana lipídica, llevando a internalización del péptido. En este contexto el incremento del efecto citotóxico causado por la polivalencia de la secuencia puede ser debido a:

(i) El mayor número de cargas positivas y cadenas laterales hidrofóbicas; los péptidos diméricos contienen dos cadenas con la secuencia RRWQWR y presentan 6 residuos de Arg, 4 residuos de Trp y una carga a pH fisiológico de +8. En contraste los péptidos tetraméricos tienen cuatro cadenas con un total de 12 Arg, 8 residuos de Trp y una carga a pH fisiológico de +16 [29,111].

(ii) La complejidad estructural del péptido; la polivalencia de la secuencia puede brindar mayor estabilidad y resistencia a la degradación proteolítica causada por proteasas [112]. Lo anterior está de acuerdo con estudios previos que muestran que los péptidos lineales son degradados más fácilmente que aquellos que poseen estructuras más complejas ya que poseen mayor impedimento estérico [113].

(iii) Presencia de aminoácidos no naturales; Se ha reportado que los péptidos que contienen aminoácidos no naturales son menos susceptibles a la degradación enzimática y en algunos casos potencian la actividad biológica [114] y los péptidos diméricos y tetraméricos sintetizados contienen el ácido 6-aminohexanoico (Ahx) utilizado como espaciador, el cual podría estar causando este efecto.

Los resultados obtenidos en este trabajo son concordantes con reportes previos donde se muestra que la polivalencia de la secuencia de la LfcinH (dímeros, trímeros, tetrameros, octámeros, etc.), incrementa la actividad antibacteriana [115] la cual puede asociarse con la actividad anticancerígena [53]. Se ha sugerido que los péptidos estructurados mediante la estrategia “Multiple Antigen Peptide” (MAP) presentan mayor actividad antibacteriana, la cual puede llegar a ser comparable con los antibióticos clásicos [116]. Por otro lado, nuestros resultados pueden asociarse a los estudios que sugieren que las cadenas de LfcinB necesitan auto ensamblarse para formar estructuras poliméricas como requisito en la interacción con la superficie bacteriana [117].

En la figura 7 se puede apreciar que los péptidos monoméricos (líneas de color negro) presentan el menor efecto citotóxico contra las dos líneas celulares, este fenómeno es recurrente en todas las familias. De manera particular se observó que el péptido LfcinB (20-30)c (línea roja) fue el único péptido cíclico en presentar efecto citotóxico contra la línea celular HTB-132™, siendo la viabilidad celular cercana a cero a una concentración de 200 µg/mL (107µM).

Se evidencio que los péptidos diméricos (líneas color verde) LfcinB (20-30)₂ y [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31)₂ presentaron un mayor efecto citotóxico respecto al péptido dimérico LfcinB (20-25)₂, este hecho sugiere que la secuencia MKKLGa presente en los péptidos LfcinB (20-30)₂ y [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31)₂ es relevante para el efecto citotóxico de las formas diméricas [11].

El efecto citotóxico del péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄ se evaluó contra la línea celular HTB-132™ a diferentes concentraciones (3-200 µg/mL/0,65-43,5 µM) y diferentes tiempos de incubación (30-240 min), los resultados mostraron que el efecto citotóxico del péptido fue dependiente de la concentración e independiente del tiempo de incubación en esta línea celular, por lo tanto se sugiere que el efecto citotóxico es rápido y se mantiene hasta las 4 horas de tratamiento. Cuando la concentración del péptido fue de 50 µg/mL (11 µM) la viabilidad celular fue alrededor del 30%, mientras que el máximo efecto citotóxico se presentó a 100 µg/mL (22 µM), a concentraciones mayores de 100 µg/mL la viabilidad celular se mantuvo constante alrededor del 5% (Figura 8).

Se puede establecer que en la primera media hora de tratamiento el péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄, afecta significativamente la viabilidad de las células HTB-132™. A tiempos de tratamiento mayores a 30 min se observaron cambios que afectan significativamente la morfología celular, haciendo a las células frágiles y susceptibles a daños por manipulación mecánica.

Estas observaciones concuerdan con estudios previos que mostraron que el efecto citotóxico del péptido LfcinB (20-25)₄ contra las líneas celulares de OSCC fue instantáneo. Cuando las líneas celulares CAL27 fueron tratadas con este péptido tetramérico se observó lisis celular en los 15 min de tratamiento, los ensayos de microscopía electrónica mostraron que el péptido

LfcinB (20-25)₄ causó daño estructural de la membrana, en el citoplasma y el núcleo de las células CAL27 [118].

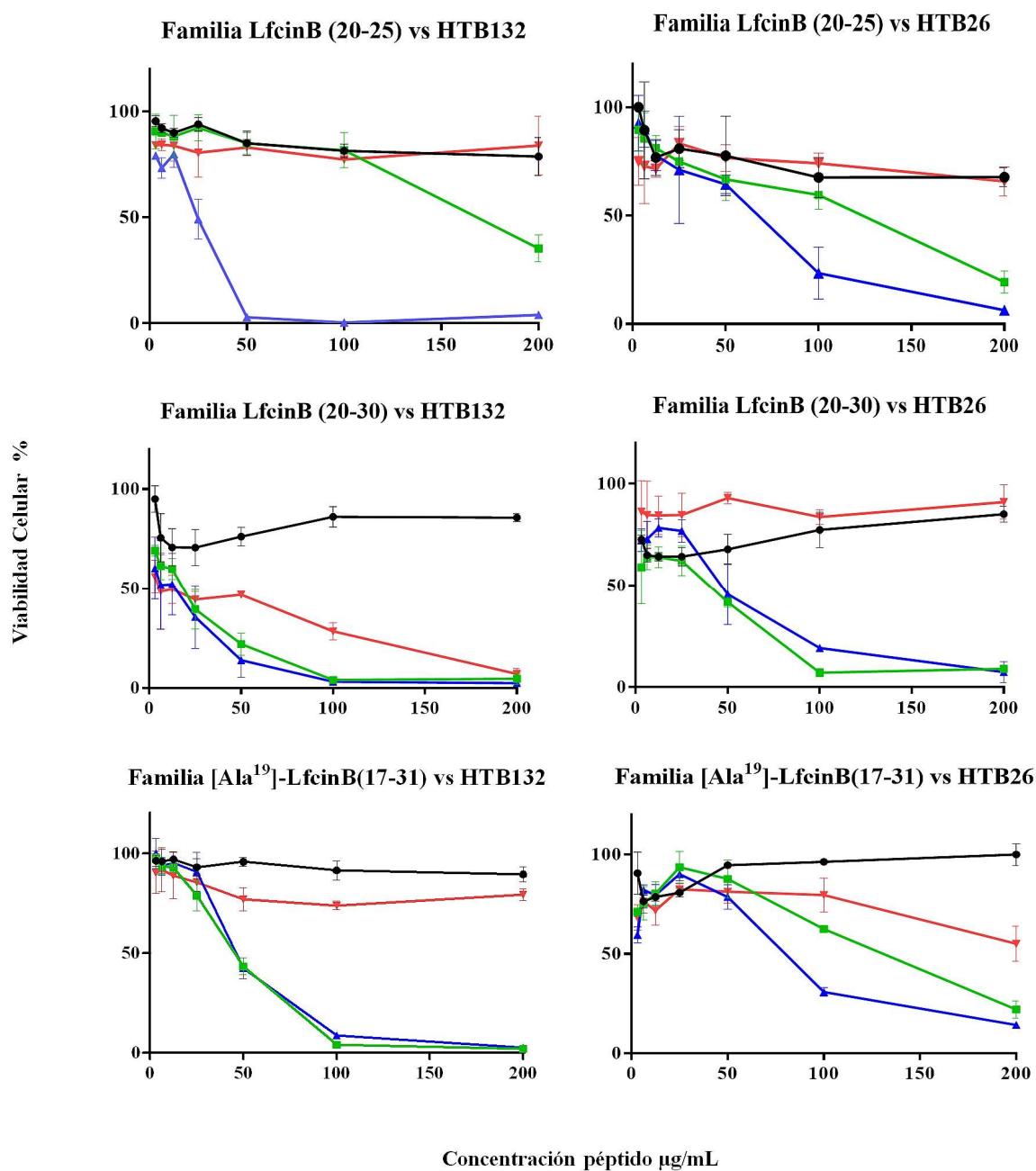


Figura 7. Efecto citotóxico de los péptidos monoméricos, diméricos, tetraméricos y cíclicos derivados de las secuencias LfcinB (20-25), LfcinB (20-30) y [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31) contra líneas celulares de cáncer de mama humano HTB-132TM y HTB-26TM. ● Péptido monomérico; ■ péptido dimérico; ▲ péptido tetramérico y ▼ péptido cíclico. Las barras de error corresponden a ± S.D. (n = 3), (ANOVA, Post hoc Bonferroni, 100 µg/mL entre dímeros y tetrameros vs péptido monomérico, p < 0.05)

Tabla 4. Valores del IC₅₀ obtenidos de los ensayos de viabilidad celular de los péptidos derivados de la LfcinB en las líneas celulares HTB-132TM y HTB-26TM.

Péptido	MDA-MB-468 (HTB-132 TM)		MDA-MB-231 (HTB-26 TM)	
	IC ₅₀		IC ₅₀	
	µg/mL	µM	µg/mL	µM
LfcinB (20-25)	>200	>202	>200	>200
LfcinB (20-25) ₂	160	>100	94	30
LfcinB (20-25) ₄	22	6	42	15
LfcinB (20-25)c	>200	>200	>200	>153
LfcinB (20-30)	>200	>130	>200	>230
LfcinB (20-30) ₂	12	5	21	14
LfcinB (20-30) ₄	9	2	33	6
LfcinB(20-30)c	50	>107	>200	>107
[Ala¹⁹]-LfcinB (17-31)	>200	>102	>200	>102
[Ala ¹⁹]-LfcinB (17-31) ₂	43	11	121	31
[Ala ¹⁹]-LfcinB (17-31) ₄	44	5	76	9
[Ala ¹⁹]-LfcinB (17-31)c	>200	>88	>200	>88
LfcinB (21-25)_{Pal}	18	12	20	14
LfcinB (21-25) _{Pal2}	12	4	10	3
LfcinB (21-25) _{Pal4}	79	12	38	6
LfcinB (21-25) _{Pal2L} *	~3	1	82	23
Aureina 1.2**	32	22	29	20
(Aureina 1.2) ₂	50	16	13	4
(Aureina 1.2)c	>200	>64	>200	>111

*Péptido dimérico lineal. ** Las gráficas de la actividad citotóxica de la familia Aureina 1.2 pueden ser consultadas en el Anexo IV.

Péptido LfcinB(20-25)₄ vs HTB 132

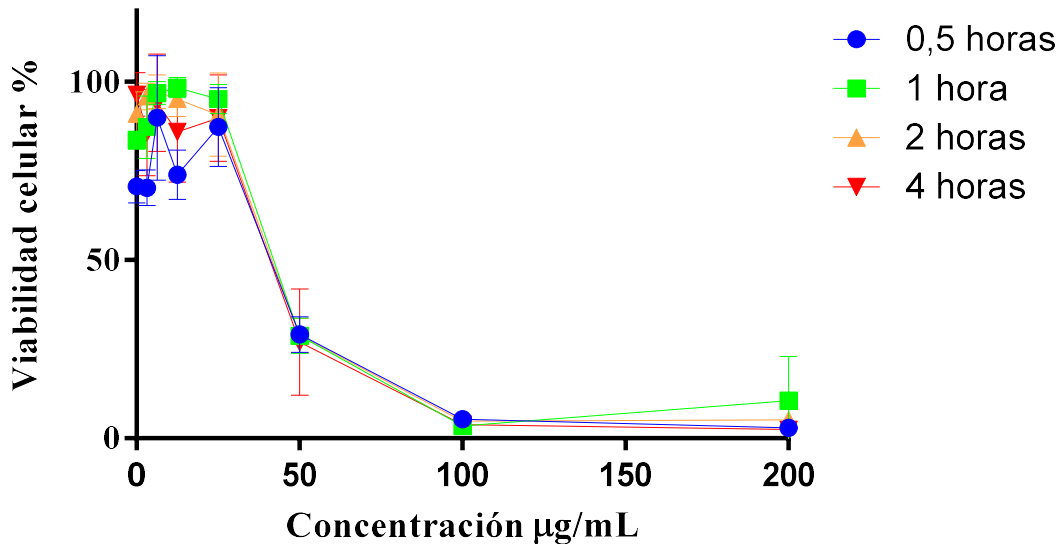


Figura 8. Efecto citotóxico del péptido de LfcinB (20–25)₄ contra la línea celular HTB-132TM a diferentes tiempos de tratamiento. Las barras de error corresponden a \pm S.D. (n = 3). (ANOVA, Post hoc Bonferroni, 100 y 50µg/mL, $p > 0.05$)

El efecto citotóxico observado del péptido LfcinB (20-25)₄ contra las líneas celulares HTB-26TM, HTB-132TM en este trabajo [11], concuerda con reportes previos donde se observó la actividad citotóxica en células de cáncer oral CAL27 y SCC15 [66].

Se ha reportado que la línea celular HTB-26TM tratada con LfcinB por 18 horas a una concentración de 31 µM (100 µg/mL) exhibió una viabilidad celular del 55% [63], en nuestro caso estas mismas células tratadas con el multímetro más pequeño de todas las familias el péptido LfcinB (20–25)₂ a 31 µM (70 µg/mL), exhibieron una viabilidad celular del 45%, mientras que para las células tratadas con el péptido LfcinB (20–25)₄ a 31 µM (150 µg/mL), la viabilidad celular fue del 18% siendo el tiempo de tratamiento tan solo de 2 horas. Nuestros resultados muestran que los péptidos diméricos y tetraméricos conteniendo el motivo RRWQWR mostraron un efecto citotóxico más rápido y de mayor magnitud que la LfcinB en la línea celular HTB-26TM.

Reportes previos han mostrado que la LFB, LfcinB y péptidos sintéticos que contienen el motivo mínimo han presentado actividad anticancerígena así:

(i) El péptido LfcinB (20-25) ha presentado efecto citotóxico contra la línea celular Jurkat [119].

(ii) El péptido LfcinB indujo la muerte celular mediada por apoptosis a las 24 horas en la línea celular humana derivada de cáncer de mama HTB-129 [60].

(iii) La LFB y LfcinB también mostraron actividad citotóxica mediada por apoptosis en células HT-29 de cáncer colorectal, el máximo efecto fue observado a las 12 horas de tratamiento y las concentraciones optimas fueron 800 $\mu\text{g/mL}$ (9,7 μM) y 400 $\mu\text{g/mL}$ (128 μM) respectivamente [120].

(iv) La LfcinB presentó efecto citotóxico contra las líneas celulares AGS, con un MIC de 200 $\mu\text{g/mL}$ (64 μM) [110].

Nuestros resultados demuestran que los péptidos que contienen el motivo mínimo de actividad RRWQWR presentado en forma de multímetros presentan un efecto citotóxico mayor y más rápido que el de los péptidos en forma monomérica e incluso al efecto citotóxico reportado para la LfcinB.

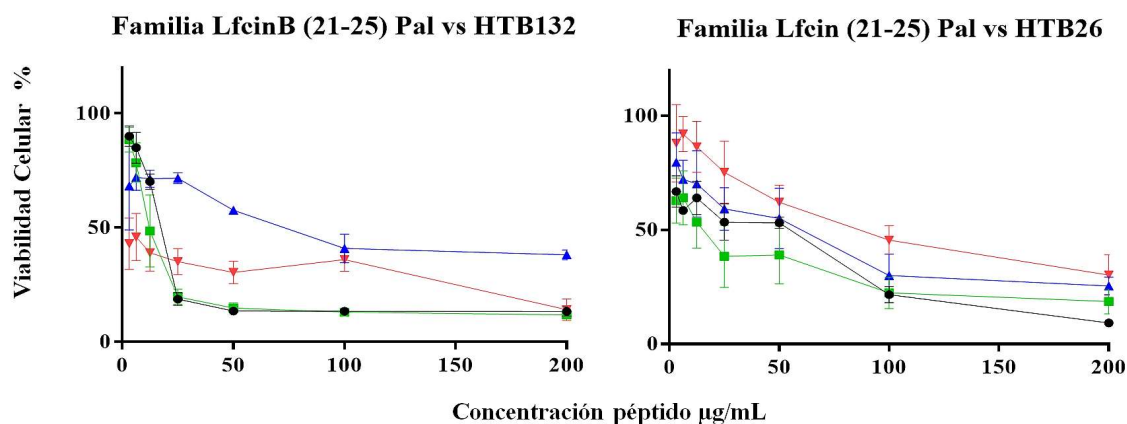
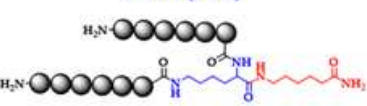



Figura 9. Efecto citotóxico de los péptidos derivados de LfcinB (21-25)_{Pal} contra las líneas celulares HTB-132TM y HTB-26TM. ● Péptido monomérico LfcinB (21-25)_{Pal}, ■ Péptido dimérico LfcinB (21-25)_{Pal2}, ▲ Péptido tetramérico LfcinB (21-25)_{Pal4} y ▼ Péptido dímero lineal LfcinB (21-25)_{Pal2L}. Las barras de error corresponden a \pm S.D. (n = 3).

Todos los péptidos que contienen la secuencia palindrómica presentaron efecto citotóxico significativo contra las dos líneas celulares evaluadas (Figura 9). El péptido dimérico lineal y tetramérico presentaron menor efecto citotóxico que el monómero LfcinB (21-25)_{Pal} y dímero LfcinB (21-25)_{Pal2}. El efecto citotóxico de los péptidos monomérico y dimérico fue rápido y dependiente de la concentración. En el caso de las células HTB-26TM se puede observar que todos los péptidos de esta familia presentaron similar efecto citotóxico. Los resultados muestran que la polivalencia de la secuencia palindrómica no incremento significativamente el efecto citotóxico, este resultado contrasta a lo observado con los péptidos que contienen el motivo mínimo de actividad RRWQWR [LfcinB (20-25), LfcinB (20-30) y [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31)]. El hecho que la polivalencia en la familia LfcinB (21-25)_{Pal} no incrementa el efecto citotóxico, sugiere que estructuralmente hay factores determinantes para que se ejerza el efecto citotóxico del péptido. El dímero lineal LfcinB (21-25)_{Pal2L} presentó menor efecto citotóxico que el péptido dimérico LfcinB (21-25)_{Pal2} en la mayoría de las concentraciones evaluadas. Los péptidos contienen cada uno dos cadenas con la misma secuencia sin embargo la estructura difiere en la forma en que están unidas (Figura 9; Tabla 5). Por lo anterior se puede inferir que además de factores como secuencia, carga e hidrofobicidad, el arreglo estructural puede ser otro factor determinante en la actividad citotóxica del péptido que debe ser estudiado con mayor detalle.

Tabla 5. Diferencias entre el dímero lineal LfcinB (21-25)_{Pal2L} y el dímero tipo MAP LfcinB (21-25)_{Pal2}

Dimero (MAP)		Dimero lineal	
			
LfcinB(21-25) _{Pal2}		LfcinB (21-25) _{Pal2L}	
HTB-132	IC ₅₀ 4 μM	HTB-132	IC ₅₀ 1 μM
HTB-26	IC ₅₀ 3 μM	HTB-26	IC ₅₀ 23 μM

Teniendo en cuenta el mecanismo propuesto para la LfcinB y los PAMs catiónicos, se sugiere que las propiedades anfipáticas de la secuencia RWQWRWQWR son relevantes para el efecto citotóxico del péptido LfcinB (21-25)_{Pal}. La naturaleza catiónica de la cadena lateral de la Arg y las propiedades aromáticas del Trp se complementan en el proceso de interacción con las membranas bacterianas, esto puede ser extrapolado a la interacción con la superficie

de las células cancerosas. La carga catiónica de la Arg es esencial para la interacción electrostática, además la capacidad de formar puentes de hidrógeno facilita la interacción con las cargas negativas de la superficie celular [121].

Otros estudios han demostrado que la cadena lateral del Trp penetra la capa interfacial de la membrana y puede interactuar con los grupos cargados de la colina en la bicapa lipídica. Se ha propuesto que el complejo de naturaleza electrostática en la región interfacial de la bicapa lipídica es ideal para acomodar las cadenas laterales de los Trp. Se ha establecido que el Trp tiene la capacidad de prolongar la asociación del péptido con la membrana actuando como un ancla, posiblemente para permitir que el péptido atraviese la membrana plasmática dirigiéndose a sus blancos intracelulares [39].

El efecto citotóxico del péptido LfcinB (21-25)_{Pal} contra las líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama HTB-26TM y HTB-132TM fue mayor que el efecto citotóxico reportado para este péptido contra las líneas celulares OSCC [66]. Lo anterior indica que el péptido palindrómico RWQWRWQWR es un péptido promisorio para el desarrollo de fármacos contra el cáncer de mama. Además, el hecho de ser monomérico lo hace viable sintéticamente y por lo tanto menos costoso.

4.2.4 Viabilidad celular (MTT) en fibroblastos y ensayo de hemólisis

Los péptidos diméricos y tetraméricos de las secuencias LfcinB (20-25), LfcinB (20-30), [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31) y los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal} y LfcinB (21-25)_{Pal2} presentaron las mayores efectividades contra las líneas celulares de cáncer de mama evaluadas. Para determinar si este efecto citotóxico también se presentaba en líneas celulares humanas normales, los péptidos fueron retados contra la línea celular humana PCS-201-102TM no cancerosa derivada de fibroblastos normales. Los resultados muestran que la citotoxicidad de los péptidos evaluados frente a esta línea celular fue significativamente menor (Figura 10).

El péptido LfcinB (20–25)₄ mostró el máximo efecto citotóxico contra las líneas HTB-132TM y HTB-26TM a concentraciones entre 50-100 µg/mL con una viabilidad celular promedio ~5%, en contraste el efecto citotóxico contra la línea PCS-201-102TM en el rango de concentraciones 50-100 µg/mL fue ~70% de viabilidad celular (Figura 10).

Los péptidos LfcinB (20-30)₂, LfcinB (30-30)₄, [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31)₂ y [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31)₄ presentaron un comportamiento similar al descrito, observándose el máximo efecto citotóxico entre 100-150 µg/mL, mientras que en las células PCS-201-012 a las mismas concentraciones presentaron viabilidades celulares entre 75-80%. En forma similar, los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal} y LfcinB (21-25)_{Pal2}, presentaron el máximo efecto citotóxico en células cancerosas a concentraciones entre 25-200 µg/mL, mientras que las células PCS 201-102TM en el mismo rango de concentraciones presentaron viabilidades celulares entre el 70 y 75% (Figura 10).

La diferencia del efecto citotóxico de los péptidos frente a las líneas celulares cancerosas y de fibroblastos normales, indica de manera general que los péptidos presentan selectividad por las líneas celulares derivadas de cáncer de mama, sugiriendo un óptimo de actividad anticancerígena con un mínimo de citotoxicidad en células normales en el rango de 50-100 µg/mL.

El índice de selectividad (IS) de los péptidos fue determinado con los valores de IC₅₀ obtenidos de las curvas de viabilidad celular (ensayos MTT) con las líneas HTB-26TM, HTB-132TM y PCS 201-102TM.

El IS fue calculado de la siguiente manera:

$$IS = IC_{50}(PCS\ 201-102^{TM}) / IC_{50}(HTB-132^{TM}\ o\ HTB-26^{TM}) \quad \text{Ec.6}$$

Los valores de IS = 1 indican que las moléculas no son selectivas y son tóxicas para los dos tipos de células, valores superiores a 1 indican que los péptidos presentan selectividad por las células cancerosas [122] (Tabla 5).

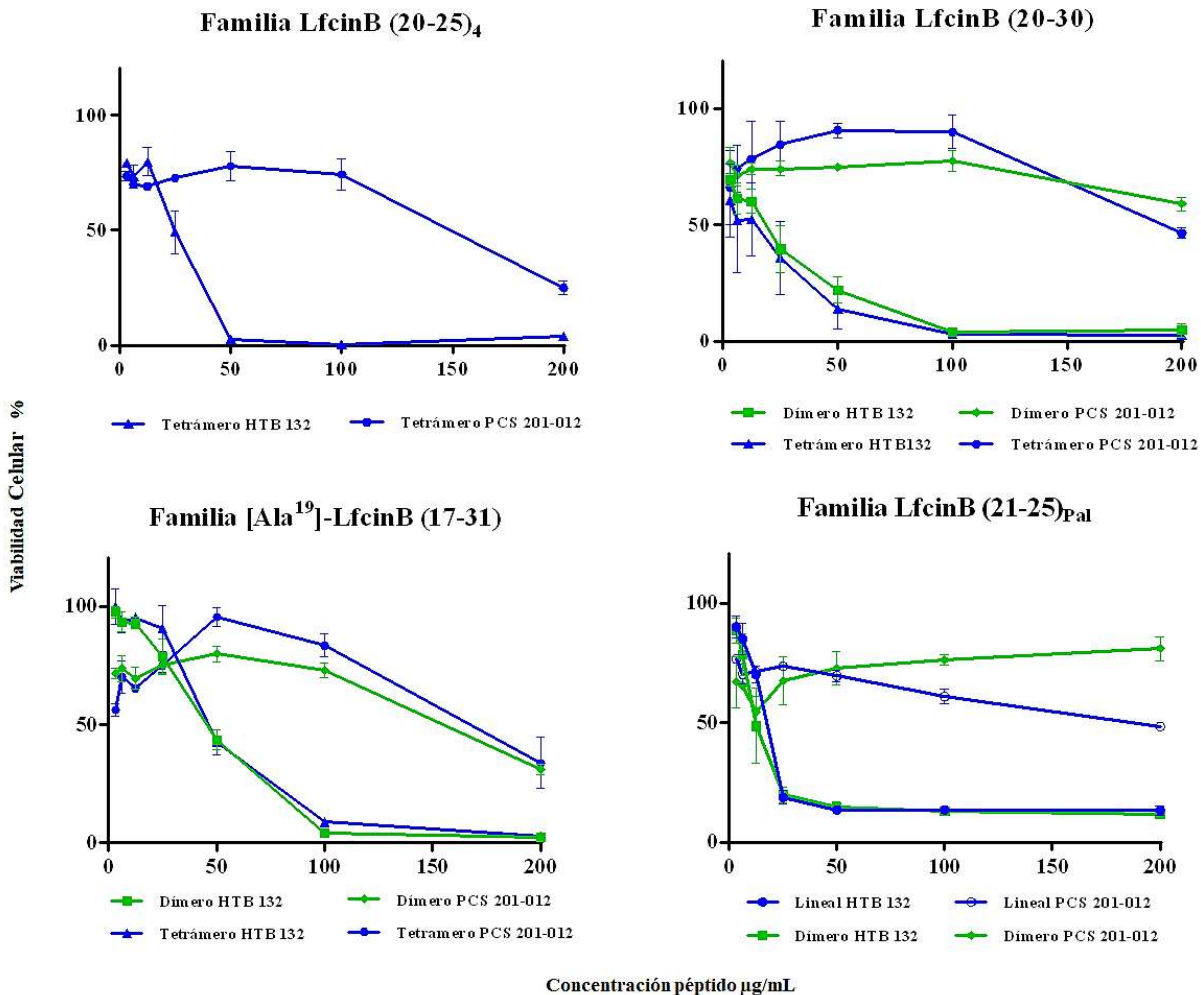


Figura 10. Viabilidad celular de las líneas celulares HTB-132TM y PCS 201-102 tratadas con los péptidos lineales, diméricos y tetraméricos derivados de la LfcinB. Las barras de error corresponden a \pm S.D. (n = 3). (ANOVA, Post hoc Bonferroni, 100 μ g/mL entre líneas celulares, p < 0.05).

Se puede observar de manera general que los péptidos exhiben índices de selectividad ≥ 1 , indicando que presentan efecto citotóxico selectivo contra las líneas celulares de cáncer de mama. Los valores calculados de IS varían desde 1 para el péptido [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31)₂ en la línea celular HTB-26TM, hasta valores superiores a 20 para el péptido LfcinB (21-25)_{Pal2} (Tabla 6).

Tabla 6. Índice de selectividad y actividad hemolítica. La actividad hemolítica fue determinada en la concentración correspondiente al valor de IC_{50max} calculada para las dos líneas celulares cancerosas.

Péptido	IC ₅₀ (PCS-201-012)	Índice Selectividad		Actividad Hemolítica	
	(µg/mL)	HTB- 132 TM	HTB- 26 TM	*IC _{50max} µM (µg/mL)	Hemolisis (%)
LfcinB (20-25) ₄	133	6	3	15	13
LfcinB (20-30) ₂	>200	>17	>9	14	3
LfcinB (20-30) ₄	192	21	6	6	13
[Ala ¹⁹]LfcinB (17-31) ₂	135	3	1	31	17
[Ala ¹⁹]LfcinB (17-31) ₄	159	4	2	9	ND
LfcinB (21-25) _{Pal}	193	11	10	14	4
LfcinB (21-25) _{Pal2}	>200	>17	>20	4	ND

ND: No Determinado. * Valor IC₅₀ calculado de las curvas de viabilidad celular (ensayos MTT).

Se observa que los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal} y LfcinB (21-25)_{Pal2} presentaron los mayores IS en las dos líneas celulares de cáncer de mama. De manera general todos los péptidos presentaron mayor IS en las líneas celulares HTB-132TM comparado con el valor obtenido para las células HTB-26TM.

El índice de selectividad es un indicador análogo al índice terapéutico, permitiéndonos sugerir que los péptidos seleccionados y evaluados para este ensayo contra las líneas celulares HTB-132TM y HTB-26TM, pueden ser considerados candidatos promisorios para futuros estudios en el modelo animal [123].

El ensayo de hemólisis brindo información sobre la toxicidad de los péptidos en glóbulos rojos, para ello se construyó una curva de hemólisis a diferentes concentraciones para cada péptido (Anexo V). De las curvas generadas se calculó el porcentaje de hemólisis mediante interpolación del valor IC_{50 máx} entre las dos líneas celulares cancerosas HTB-132TM y HTB-26TM obtenido previamente de los ensayos MTT.

Los péptidos LfcinB (20-25)₄, LfcinB (20-30)₄ y [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31)₂ presentaron los mayores porcentajes de hemólisis (13-17%), sugiriendo que los péptidos diméricos y tetraméricos son más hemolíticos que el péptido monomérico LfcinB (21-25)_{Pal} (Tabla 6).

Este comportamiento concuerda con estudios donde los péptidos monoméricos son menos hemolíticos que péptidos diméricos, los autores sugieren que el incremento de las cargas positivas puede causar el efecto hemolítico [124]. Es importante resaltar que los péptidos LfcinB (20-30)₂ y LfcinB (21-25)_{Pal}, presentaron los mayores valores de IS con una baja actividad hemolítica sugiriendo que estos péptidos son principales candidatos para posteriores estudios en el desarrollo de una molécula con actividad contra el cáncer de mama.

El hecho que los demás péptidos seleccionados presenten un efecto hemolítico moderado, implica que se requiere diseñar formas farmacéuticas para su administración en una eventual aplicación terapéutica [11, 53, 54, 77 y 118].

4.3 Etapa 3. Estudio preliminar del mecanismo de acción del péptido LfcinB (20-25)₄ Vs la línea celular HTB-22TM (MCF-7). (no contemplado en objetivos)

Logros alcanzados	
Etapa 3	<ul style="list-style-type: none"> • Se establece que el efecto citotóxico del péptido LfcinB (20-25)₄ contra la línea celular HTB-22TM es máximo a 100 µg/mL con una viabilidad celular promedio del 20%. • Se evidencia afectación de la membrana celular a concentraciones bajas de péptido LfcinB (20-25)₄ (15 µg/mL) curiosamente este efecto disminuye a medida que la concentración aumenta • Se determina que el efecto citotóxico del péptido LfcinB (20-25)₄ contra la línea celular HTB-22TM está asociado a cambios morfológicos en la célula, con incremento en la concentración de calcio libre intracelular y despolarización de la membrana mitocondrial. • Se sugiere que el efecto citotóxico del péptido LfcinB (20-25)₄ contra la línea celular HTB-22TM involucra principalmente procesos apoptóticos.

El péptido LfcinB (20-25)₄ fue seleccionado para el estudio preliminar del mecanismo de acción por presentar efecto citotóxico selectivo contra líneas celulares derivadas de cáncer de mama (HTB-26TM, HTB-132TM y HTB-22TM) y además efecto citotóxico contra líneas celulares OSSC como CAL27. Se ha establecido que el efecto citotóxico contra células de OSSC es rápido, dependiente de concentración con un mecanismo de acción mediado por eventos necróticos [66]. El efecto citotóxico del péptido LfcinB (20-25)₄ contra las líneas celulares de cáncer de mama también es rápido y dependiente de la concentración. En este apartado se buscó establecer si el mecanismo de acción del péptido en las líneas celulares derivadas de cáncer de mama se relaciona con el observado en OSSC.

Se realizaron ensayos preliminares para estudiar el mecanismo de acción del péptido LfcinB (20-25)₄ en la línea celular HTB-132TM, sin embargo el efecto citotóxico del péptido fue rápido impidiendo identificar los procesos que median la toxicidad. Se realizaron los ensayos disminuyendo la concentración del péptido y utilizando diferentes tiempos de incubación

siendo complejo obtener resultados positivos. Se estableció que el efecto citotóxico es instantáneo causando lisis celular en forma similar a lo reportado para las células OSCC [66]. Por lo tanto, se decidió utilizar la línea celular HTB-22TM por ser presentar menor sensibilidad al péptido LfcinB (20-25)₄ y ser un modelo ampliamente documentado en este tipo de estudios.

4.3.1 Viabilidad celular de péptidos LfcinB (20-25)₄ y LfcinB (21-25)_{Pal}

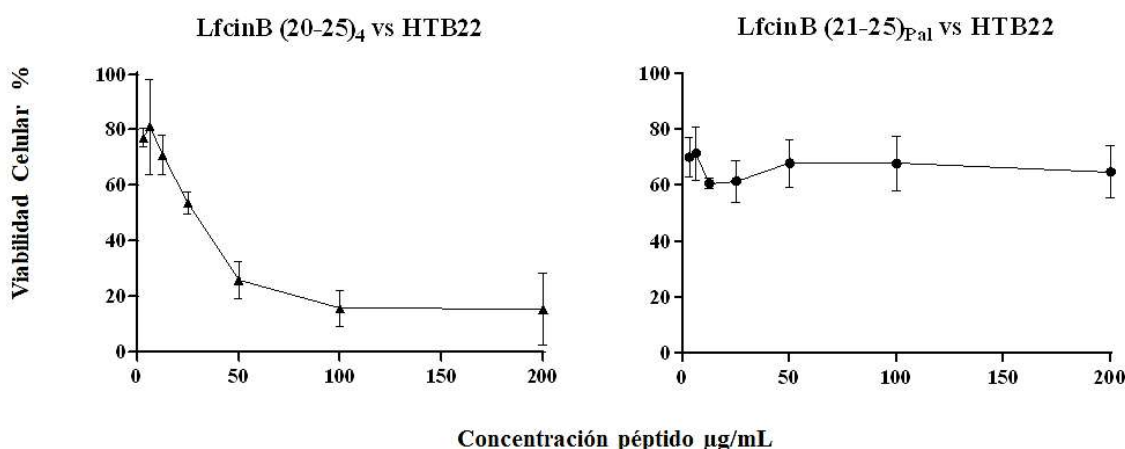


Figura 11. Citotoxicidad de los péptidos LfcinB (20-25)₄ y LfcinB (21-25)_{Pal} contra la línea celular HTB-22TM. Tratamientos a 2 horas utilizando 1.5×10^3 células, \pm S.D. (n = 3).

Inicialmente se evaluó el efecto citotóxico de los péptidos LfcinB (20-25)₄ y LfcinB (21-25)_{Pal} contra la línea celular HTB-22TM (MCF7). Los resultados mostraron que péptido LfcinB (20-25)₄ presentó el mayor efecto citotóxico y que este es dependiente de la concentración. El máximo efecto citotóxico se observó a concentraciones entre 100-200 µg/mL (~20 % de viabilidad celular) a dos horas de tratamiento y un IC₅₀ de 30 µg/mL (6,5 µM). El péptido LfcinB (21-25)_{Pal} presentó un efecto citotóxico moderado y prácticamente constante a la mayoría de las concentraciones evaluadas (viabilidad celular 60-70 %) (Figura 11).

El péptido palindrómico presentó menor efecto citotóxico en la línea celular HTB-22TM en comparación a las líneas HTB-132TM y HTB-26TM, por tal motivo se trabajó únicamente con el péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄.

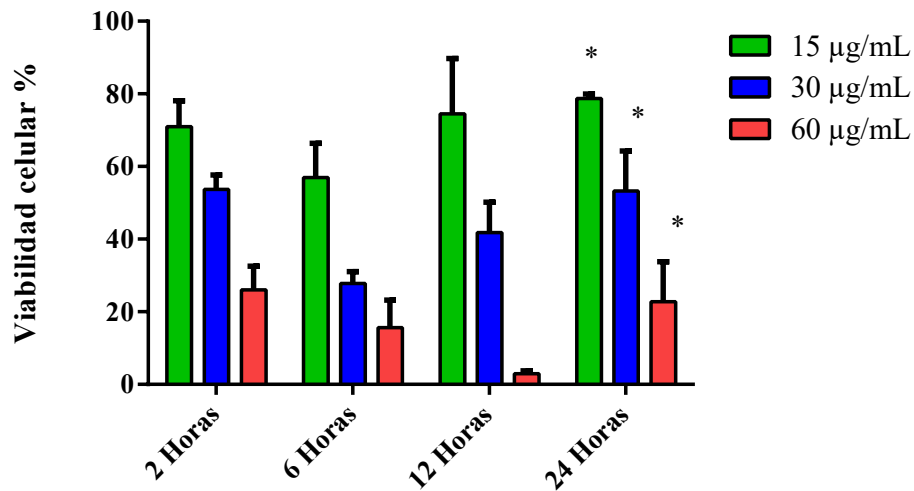


Figura 12. Efecto citotóxico del péptido LfcinB (20-25)₄ contra la línea celular HTB-22TM a diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento. ± S.D. (n = 6) con tres experimentos independientes. ANOVA Post hoc Tukey, p < 0.05. *diferencias estadísticamente significativas respecto al máximo efecto citotóxico alcanzado.

La Figura 12 muestra la relación del incremento de la toxicidad del péptido LfcinB (20-25)₄ con el aumento de la concentración contra la línea celular HTB-22TM. Este mismo comportamiento fue observado en las líneas celulares HTB-132TM y HTB-26TM.

En la figura 12 se puede apreciar la influencia del tiempo en el efecto citotóxico del péptido, para las concentraciones de 15 y 30 µg/mL se observó que los mayores efectos citotóxicos se encontraron a 6 horas de tratamiento y a 12 horas para la concentración de 60 µg/mL.

Se encontraron cambios estadísticamente significativos entre 6 y 24 horas para las concentraciones de 15 y 30 µg/mL indicando la pérdida de actividad del péptido luego de alcanzar su máximo efecto (6 horas post ensayo), este mismo comportamiento se observó a la concentración de 60 µg/mL entre 12 y 24 horas de tratamiento.

La recuperación en la viabilidad celular puede atribuirse a varias factores entre los que podemos enumerar la posible pérdida de la actividad citotóxica del péptido debido a la actividad de las metaloproteasas presentes en la matriz extracelular [125], el aumento del metabolismo de las células sobrevivientes debido al estrés al que fueron sometidas y/o al proceso conocido como anastasis [126] estos eventos podrían explicar el aumento de la viabilidad celular en un tiempo relativamente corto después de cesar el estímulo apoptótico.

4.3.2 *Afectación de la membrana citoplasmática*

Este ensayo se realizó utilizando los fluorocromos SYTO 9/ IP. La técnica está basada en las propiedades químicas de los fluorocromos y su comportamiento frente a la membrana citoplasmática. El SYTO 9 es un fluorocromo que puede permear la membrana citoplasmática uniéndose con alta afinidad al ADN de la célula, las células marcadas con este fluorocromo fueron identificadas dentro de la caja color azul. El IP por su naturaleza química es incapaz de permear la membrana citoplasmática y solo puede unirse al ADN de células que tienen la membrana citoplasmática afectada o comprometida las cuales fueron identificadas dentro de la caja color rojo (Figura 13), por lo tanto una doble marcación SYTO 9/ IP indica la existencia de células con membranas plasmáticas afectadas, mientras que las células marcadas únicamente con SYTO 9, son células que mantienen una membrana citoplasmática en buenas condiciones.

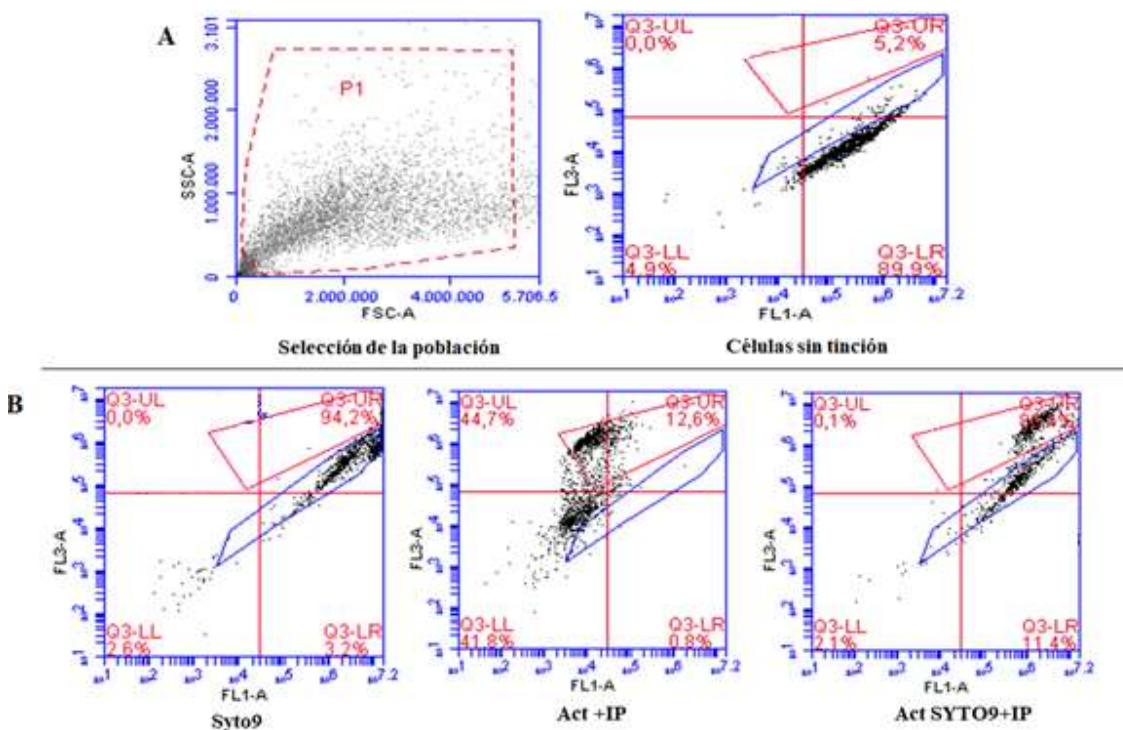


Figura 13. Plots representativos de los controles usados para evaluar el efecto citotóxico del péptido LfcinB (20-25)₄ por citometría de flujo con SYTO 9/IP. a) Selección de la población celular y citometría de las células sin tinción. b) distribución de las poblaciones con los diferentes marcadores y tratamientos: (Act) = Actinomicina 10 µg/mL/24 horas. Las cajas de color rojo corresponden a células doblemente marcadas con SYO9 / IP (células con membrana comprometida), las cajas de color azul representan a células marcadas con SYTO9 (células integra).

En la Figura 13 A. se observa la selección de la población celular después del tratamiento a 6 horas con el péptido LfcinB (20-25)₄, el porcentaje de eventos analizados corresponde a un 39% debido a la alta cantidad de detritos presentes en las muestras producto de la acción del péptido. En la figura 13 B se observa que es posible discriminar las células sin marcaje; las poblaciones celulares marcadas con SYTO 9 y las doblemente marcadas con SYTO 9/IP.

En la Figura 14 se observan dos tipos de barras, unas con relleno sólido correspondiente a células doblemente marcadas (células con membrana comprometida) y otras con textura que corresponden a células marcadas únicamente con el fluorocromo SYTO9 (células con membrana citoplasmática íntegra). La barra sólida negra del control negativo correspondió al 5% de células, mientras la barra negra con textura correspondió al 92% de la población, estos resultados están de acuerdo a la muerte basal esperada para un cultivo celular. El control positivo (células tratadas con actinomicina/24 h) permitió llevar a las células hasta eventos apoptóticos tardíos mostrando que aproximadamente el 55% de las células presentaron la membrana comprometida, estos resultados son consistentes con el comportamiento esperado [127].

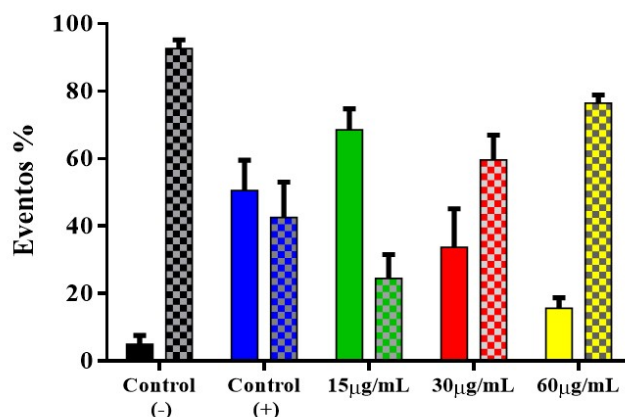


Figura 14. Afectación de la membrana citoplasmática evaluada por citometría de flujo con los fluorocromos SYTO9/IP a 6 horas de tratamiento con el péptido Lfcin (20-25)₄, ± S.D. (n = 6) y dos experimentos independientes. Las barras sólidas corresponden a células marcadas con SYTO 9/ IP mientras las barras con textura corresponden a células marcadas con SYTO 9. Negro: control negativo (células sin tratamiento); azul: control positivo; células tratadas con actinomicina por 24 h; Células tratadas con péptido a 15 µg/mL (verde); 30 µg/mL (rojo) y 60 µg/mL (amarillo).

Los resultados muestran que las células tratadas con el péptido LfcinB (20-25)₄ a 15 µg/mL presentan la mayor afectación sobre la membrana citoplasmática con un 69% de la población, se puede evidenciar que a medida que se incrementa la concentración del péptido (30 y 60 µg/mL, barras color solido) el efecto sobre la membrana disminuye (32 y 17% respectivamente) indicando que la membrana citoplasmática se ve más afectada por el péptido a menores concentraciones dentro del rango usado (Anexo VI). Estos resultados sugieren que el efecto citotóxico del péptido a concentraciones bajas puede estar mediado principalmente por eventos necróticos mientras que a concentraciones mayores al IC₅₀ (30 µg/mL) el efecto citotóxico sobre las células HTB-22TM puede estar asociado a procesos apoptóticos. Algunos estudios han reportado AMPs con esta dualidad en el mecanismo de acción dependiendo de la concentración, generando procesos apoptóticos y/o necróticos [128].

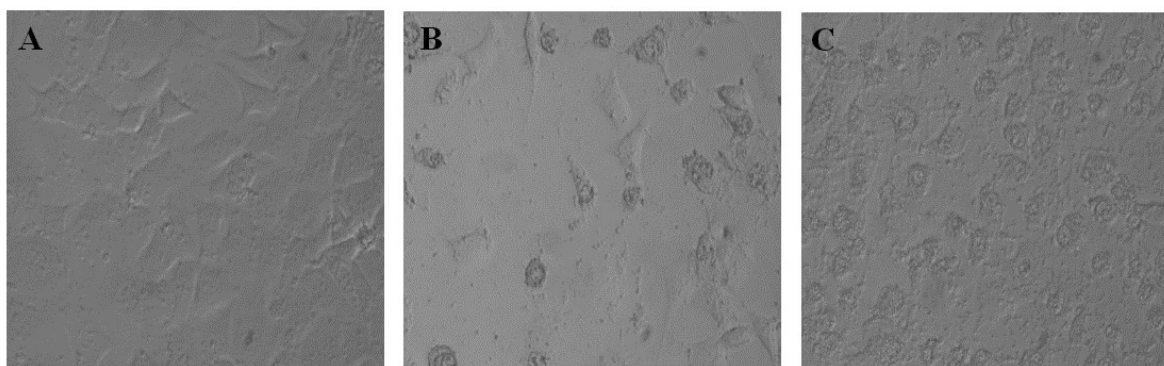


Figura 15. Micrografías de las células HTB-22TM tratadas con diferentes concentraciones del péptido LfcinB (20-25)₄ durante 6 h. A) 15 µg/mL, B) 30 µg/mL y C) 60 µg/mL.

La Figura 15 muestra los cambios morfológicos de las células tratadas con el péptido LfcinB (20-25)₄ a diferentes concentraciones. En la figura 15A se observa que las células tratadas con el péptido a concentraciones menores al IC₅₀ (15 µg/mL) mantienen su morfología, pero permitiendo el ingreso del IP en forma significativa en comparación a las otras concentraciones del péptido evaluadas. La figura 15B corresponde a células tratadas con el péptido a la concentración del IC₅₀ (30 µg/mL) donde se observa que aproximadamente el 50% de la población celular ha sufrido cambios en su morfología, la figura 15C (células

tratadas con 60 $\mu\text{g/mL}$) muestra que la mayoría de las células presentan cambios drásticos en su morfología, observándose reducción del volumen celular, aparición de detritos unidos al soporte con células que presentan pequeñas proyecciones recubriendo la superficie de la membrana citoplasmática. Curiosamente y a pesar de estos cambios morfológicos en membrana el IP no se acumuló al interior de la célula. Nuestras observaciones concuerdan con los resultados obtenidos en ensayos previos donde se sugiere que el efecto citotóxico del péptido LfcinB (20-25)₄ en las células HTB-22™ puede estar mediado por necrosis [66] y/o apoptosis [118]. A bajas concentraciones de péptido la permeabilización de la membrana puede indicar posibles procesos necróticos o apoptóticos tardíos mientras que a concentraciones iguales o superiores al IC₅₀ los cambios morfológicos de las células sugieren procesos apoptóticos en sus etapas finales.

4.3.3 Determinación de Apoptosis/Necrosis

Este ensayo permitió identificar cambios más específicos a nivel de membrana citoplasmática durante los procesos de apoptosis y/o necrosis. En los procesos iniciales de la apoptosis, la fosfatidilserina es expuesta en la cara externa de la membrana citoplasmática y puede detectarse mediante Anexina V. La marcación del DNA por la incorporación de 7AAD permite determinar la integridad de la membrana citoplasmática y sirve como indicador de eventos apoptóticos tardíos y/o eventos necróticos.

Como se observa en la Figura 16A, las células en procesos apoptóticos fueron tomadas de los cuadrantes superior e inferior derecho (apoptosis tardía y temprana respectivamente). En la figura 16B en el control negativo (células sin tratamiento) se observa la barra color rojo con un 1% de la población representando las células necróticas, la barra color verde representa las células apoptóticas con un 5% y la barra de color azul representa células vivas integras con un 94%, estos resultados están acorde con lo esperado para un cultivo celular sin tratamientos donde los porcentajes de células necróticas y apoptóticas es bajo. Como control positivo se usó actinomicina durante 12 horas para estimular mayoritariamente eventos de apoptosis temprana, en este control se observó un aumento en los eventos correspondientes a células necróticas y apoptóticas con un 2 y 37% respectivamente respecto al control negativo. El control de necrosis correspondió a células tratadas con EDTA 15 mM

por 20 min, observándose un aumento en los eventos necróticos correspondientes a un 19%. Las células expuestas al tratamiento con el péptido a su IC_{50} (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) presentaron un aumento en los eventos correspondientes a células apoptóticas similar al control positivo, llegando hasta un 30%.

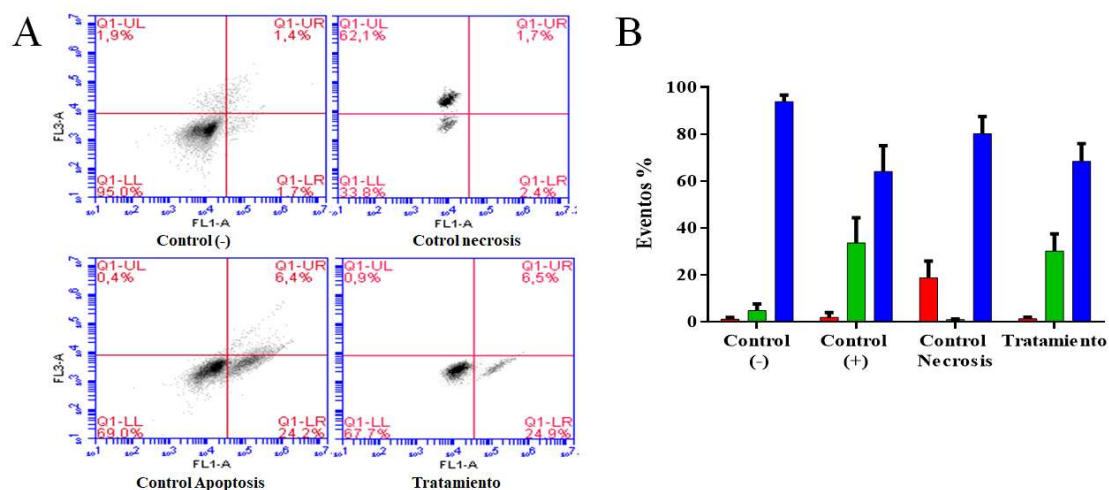


Figura 16. Ensayo de apoptosis / necrosis. (A) Plots representativos de los controles y las células tratadas con el péptido LfcinB (20-25)₄ durante 1 h; cuadrante superior izquierdo: células en estado necrótico, cuadrante superior derecho: células en apoptosis tardía, cuadrante inferior izquierdo: células vivas integra, cuadrante inferior derecho: células en apoptosis temprana. (B) Porcentaje de células en los diferentes cuadrantes; Rojo efecto necrótico; Verde efecto apoptótico (suma del cuadrante superior e inferior derecho), Azul células vivas. \pm S.D. (n = 6) con dos experimentos independientes.

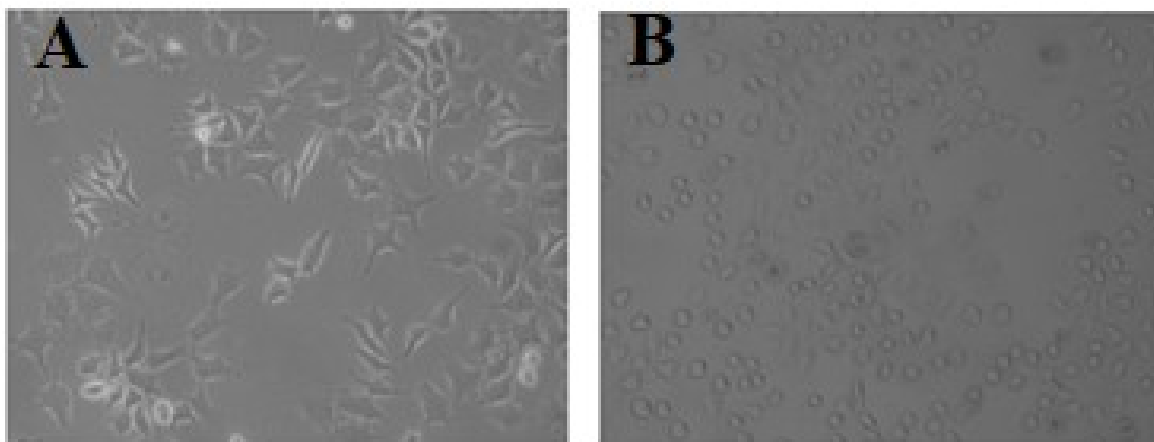


Figura 17. Micrografía de células HTB-22TM normales y con tratamiento con el péptido LfcinB (20-25)₄ antes de ser cosechadas para los ensayo de apoptosis/ necrosis. (A) Células sin tratamiento; (B) Células tratadas con el péptido LfcinB (20-25)₄ a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ luego de 1 h de incubación.

Los resultados muestran que fue posible discriminar entre eventos correspondientes a células con procesos apoptóticos o necróticos, lográndose establecer que el efecto citotóxico del péptido LfcinB (20-25)₄ contra las células HTB-22TM es rápido y está mediado principalmente por eventos apoptóticos a 1 hora de tratamiento utilizando la concentración de péptido correspondiente a IC₅₀ (30 µg/mL).

La micrografía de la Figura 17B muestra que las células tratadas con el péptido LfcinB (20-25)₄ presentaron cambios morfológicos característicos de células que sufren procesos apoptóticos, adquiriendo formas redondeadas por contracción celular y evidenciándose un pequeño número de células en etapa necrótica. En este caso los resultados obtenidos sugieren que el efecto citotóxico del péptido involucra mayoritariamente la muerte celular causada por apoptosis, sin embargo es importante mencionar que el efecto citotóxico puede estar mediado por apoptosis y/o necrosis, donde cada mecanismo se puede presentar en mayor o menor medida dependiendo de diversos factores [129,130].

4.3.4 Despolarización membrana mitocondrial

La mitocondria tiene un papel crítico en la regulación de la muerte celular, la permeabilización de este organelo es uno de los primeros pasos en la ruta apoptótica por la vía intrínseca liberando proteínas y calcio al citoplasma. El potencial de membrana de la mitocondria ($\Delta\psi_m$) es producido por la polarización de la cara interna y externa de la misma, esta polarización es clave en procesos de respiración celular y generación de ATP. El fluorocromo JC1 (Ioduro de tetraetil-benzimidazolilcarbocianina) se acumula en la mitocondria dependiendo únicamente del potencial de la membrana. Cuando la membrana mitocondrial sufre la pérdida del potencial (despolarización) la fluorescencia disminuye debido a la baja fijación del fluorocromo [131].

En la Figura 18A se puede observar el comportamiento de la fluorescencia para los diferentes controles y los tratamientos. En la caja identificada como P2 se encuentran los eventos correspondientes al control negativo representando células sin tratamiento que mantienen el potencial de membrana mitocondrial, en la caja identificada como P3 se ubican los eventos en los cuales se ha perdido la fluorescencia debido a la disminución o pérdida de potencial

de membrana mitocondrial y fuera de las cajas se puede apreciar la población de células que no incorporan el fluorocromo.

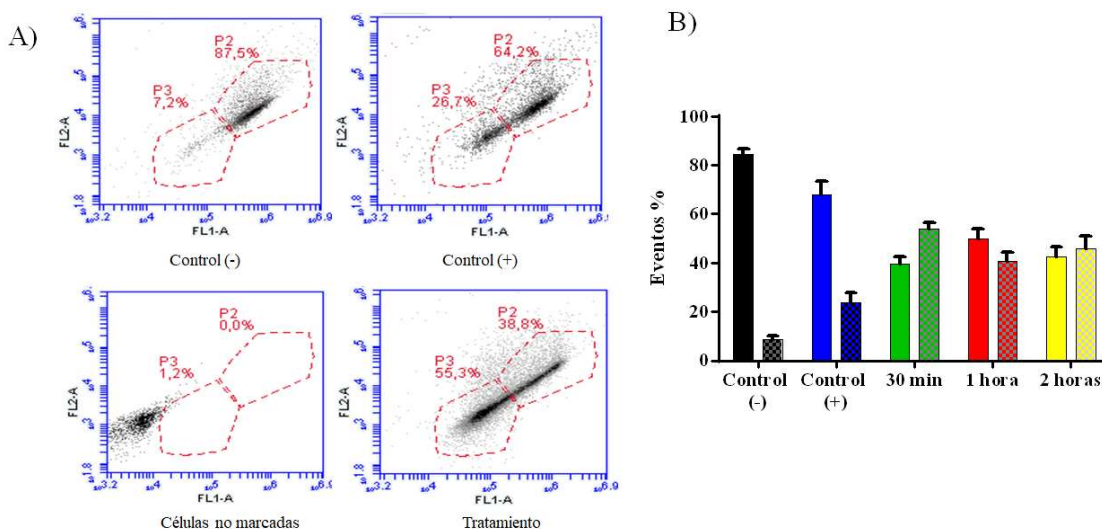


Figura 18. Controles tratamientos utilizados en el ensayo de despolarización de membrana mitocondrial. (A) Plots representativos de los controles usados y de las células tratadas con el péptido LfcinB (20-25)₄ a 30 µg/mL durante 30 min. (B) Representación gráfica del porcentaje de eventos, Barras sólidas indican los eventos de polarización y las barras con textura indican los eventos de despolarización. Control negativo negro (células sin tratamiento); Control positivo azul (células tratadas con 10 µg/mL de actinomicina durante 24 horas); 30 min tratamiento (verde); 1 hora de tratamiento (rojo); 2 horas de tratamiento (amarillo). ± S.D. (n = 6) con dos experimentos independientes.

En la Figura 18B se observa que las células utilizadas como control negativo (células sin tratamiento) presentaron un 85% de eventos correspondientes a células que mantienen el potencial de membrana mitocondrial y un 8% que lo han perdido; estos resultados están acorde a lo esperado para un cultivo celular y su manipulación donde existe un porcentaje latente de células senescentes. Como control positivo se utilizó un tratamiento con actinomicina (10 µg/mL durante 24 horas), allí se observó un 23% de eventos con pérdida de potencial lo cual es un aumento significativo en comparación al control positivo estando acorde con lo esperado. Los tratamientos con el péptido LfcinB (20-25)₄ se realizaron a diferentes tiempos y se observó que a partir de 30 min, el porcentaje de eventos con pérdida de potencial de membrana mitocondrial se encuentra en un 40% sufriendo mínimos cambios durante el transcurso del tiempo evaluado. Los valores son concordantes con los resultados

anteriores donde se evidencia que el efecto citotóxico del péptido LfcinB (20-25)₄ involucra eventos apoptóticos.

La despolarización de la membrana mitocondrial se puede producir por mecanismos directos e indirectos. Los directos tienen en cuenta la interacción física y/o acumulación del péptido con la membrana generando poros que llevan a la pérdida del potencial entre las caras de la membrana mitocondrial [132]. Los mecanismos indirectos involucran interacciones moleculares que regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial como daños en la maquinaria por procesos oxidativos, alteración en la homeostasis de calcio, desacoplamiento de la cadena respiratoria con defectos en la síntesis de ATP y/o formación de especies reactivas de oxígeno [133]. Todos estos mecanismos se producen por alteraciones en las rutas endógenas propias de la célula, terminando en el daño de la membrana mitocondrial y permitiendo la salida de Citocromo C como molécula efectora de eventos apoptóticos posteriores, por lo tanto, es importante realizar más ensayos que permitan establecer la naturaleza de la despolarización de la membrana mitocondrial causada por el péptido tetramérico.

4.3.5 Cambios del nivel de calcio intracelular

Las alteraciones en la homeostasis del calcio pueden llevar y/o inducir daño y muerte celular. El calcio intracelular participa en los procesos apoptóticos y ha sido identificado como efector central de la necrosis. Los compartimientos u organelos principales de almacenamiento de calcio son el retículo endoplasmático y la mitocondria, desde allí el calcio puede ser liberado hacia el citoplasma.

En la Figura 19A se observa que no existen cambios en la fluorescencia de células HTB-22TM durante el tiempo del ensayo (25 min) aun siendo inyectado medio de cultivo incompleto a 5 min de lectura. En la Figura 19B se observa el rápido aumento en la fluorescencia de las células expuestas al péptido LfcinB (20-25)₄ a 5 min de inyección. El incremento de la fluorescencia hace referencia al aumento en la concentración de calcio citoplasmático, creemos que la liberación de calcio observada es de carácter irreversible al

mantenerse constante durante los 23 min sin observarse una disminución significativa del mismo.

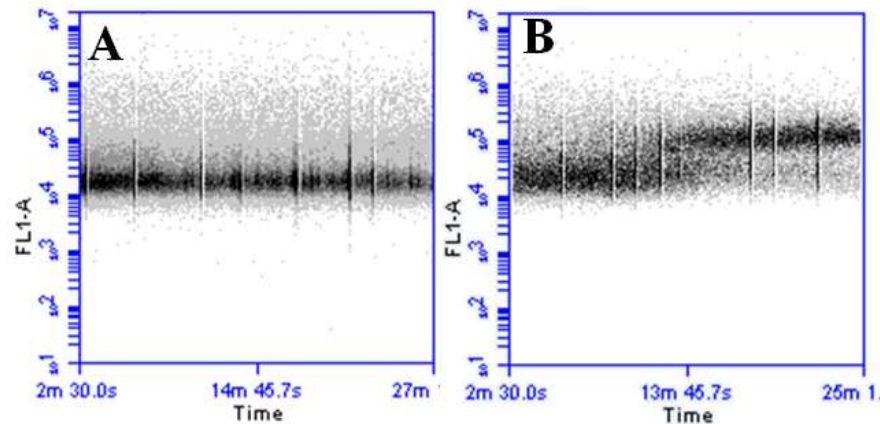


Figura 19. Cambios en la concentración de calcio citoplasmático en células HTB-22™ tratadas con el péptido LfcinB (20-25)₄. (A) Control negativo; inyección de medio incompleto a 5 min de lectura; (B) tratamiento con el péptido LfcinB (20-25)₄, concentración final 30 µg/ml e inyección a 5 min.

Los resultados obtenidos en esta etapa experimental están acorde con trabajos previos que se relacionan a continuación:

- La LfcinB y el péptido LfcinB(20-25) presentaron efecto citotóxico contra células Jurkat T siendo el péptido LfcinB(20-25) administrado mediante liposomas fusiogénicos ya que la secuencia corta por sí misma es incapaz de permear la membrana citoplasmática de las células siendo el mecanismo de acción asociado a eventos apoptóticos. Se evidencia la liberación de catepsina B causada por ruptura lisosomal y posterior liberación de Ca²⁺. La activación de la catepsina B ha sido asociada con la apoptosis mediada por caspasas y la permeabilización de la membrana mitocondrial [63,119]. Estos hallazgos concuerdan con nuestros resultados ya que el péptido LfcinB (20-25) presentó bajo efecto citotóxico contra las líneas celulares evaluadas. Lo anterior sugiere que el efecto citotóxico del péptido LfcinB (20-25) solo ocurre cuando el péptido es internalizado en la célula. Nuestros resultados demuestran que el péptido LfcinB (20-25)₄ que contiene cuatro copias del motivo mínimo de actividad RRWQWR es capaz de internalizarse en la célula y producir el efecto citotóxico esperado.

- La Lfcin causa disrupción de la membrana de células tumorales y dispara una endonucleasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ produciendo la apoptosis mediada por la vía oxidativa [134]. El péptido LfcinB (20-25)₄ posiblemente causó daño a la membrana citoplasmática de las células HTB-22TM a una concentración inferior (15µg/mL) que el IC₅₀ determinado.

- La LFB y LfcinB presentan una potente actividad antitumoral activando varias vías de señalización incluyendo apoptosis, p53, respuesta antioxidante, inhibición de angiogénesis y detención del ciclo celular. concordando con el hecho que la LFB y la LfcinB ha presentado actividad anticancerígena en diferentes tipos de cáncer, por lo que se ha sugerido que la LFB tiene potencial terapéutico contra el cáncer de colorectal [120]. En trabajos previos el péptido LfcinB (20-25)₄ presentó efecto citotóxico contra líneas celulares humanas derivadas de cáncer oral y nosotros demostramos su efecto selectivo y citotóxico contra líneas celulares de cáncer de mama, sin embargo este trabajo permitió identificar varios péptidos con alto potencial para uso terapéutico.

- La LfcinB fue citotóxica para células de linfoma B, observándose fragmentación del ADN, condensación de la cromatina y desintegración nuclear, sugiriendo que la muerte celular es mediada por apoptosis [135]. El mecanismo de acción asociado al efecto citotóxico del péptido LfcinB (20-25)₄ contra la línea celular HTB-22TM también esta mediado por procesos apoptóticos.

- La LfcinB presentó efecto citotóxico contra la línea celular de cáncer gástrico AGS. El efecto citotóxico fue selectivo, dependiente de la concentración y es mediado por apoptosis [110], así mismo el mecanismo propuesto para el efecto citotóxico del péptido ⁷FKCRRWQWRM²⁶ contra células Jurkat T, involucra la internalización del péptido para llegar a la mitocondria y producir la liberación de citocromo C y especies reactivas de oxígeno [62]. Nuestros resultados muestran que fragmentos cortos de la LfcinB presentados en formas multivalentes tienen efecto citotóxico contra líneas celulares humanas derivadas del cáncer de mama, sugiriendo que es posible diseñar péptidos a partir de la LfcinB que pueden ser promisorios para el tratamiento del cáncer.

- La LFB induce apoptosis en las líneas celulares HTB-22TM y HTB-26TM a 24 h [136], La LfcinB induce apoptosis en la línea celular derivadas de cáncer de mama HTB-22TM y HTB-129 aproximadamente a 10 h de tratamiento [62]. El péptido LfcinB (20-25)₄ ha demostrado

mayor efecto citotóxico en algunas de estas líneas celulares a concentraciones menores que la LFB y la LfcinB y el mecanismo de acción del péptido sobre células HTB-22TM involucra eventos apoptóticos.

De esta manera los resultados obtenidos en los ensayos realizados sugieren que el efecto citotóxico del péptido LfcinB (20-25)₄ contra las células HTB-22TM es selectivo, rápido y dependiente de la concentración. Se estableció de manera preliminar que el mecanismo de acción involucrado en la muerte celular de las células HTB-22TM involucra principalmente procesos apoptóticos. Estos resultados están en concordancia con reportes que indican que la actividad antitumoral del péptido LfcinB (20-25)₄ en modelo animal, ha sido asociada con necrosis o apoptosis, dependiendo de la concentración del péptido [118].

5 Conclusiones generales

Los péptidos diméricos y tetaméricos que contienen las secuencias LfcinB (20-25), LfcinB (20-30) y [Ala¹⁹]-LfcinB (21-25) presentaron el mayor efecto citotóxico que el resto de moléculas contra las líneas celulares derivadas de cáncer de mama HTB-26TM y HTB-132TM, sugiriendo que la polivalencia de secuencias que contienen el motivo RRWQWR es una estrategia que permite incrementar significativamente el efecto citotóxico de los péptidos.

En específico los péptidos LfcinB (20-25)₄, LfcinB (20-30)₂, LfcinB (20-30)₄ y LfcinB (21-25)_{Pal} presentaron un efecto citotóxico rápido y selectivo contra las líneas celulares HTB-132TM y HTB-26TM derivadas de cáncer de mama. Adicionalmente, el péptido LfcinB (20-25)₄ presentó un efecto citotóxico contra la línea celular HTB-22TM, sugiriendo que puede presentar un efecto citotóxico de amplio espectro.

Los resultados obtenidos permiten sugerir que el mecanismo acción asociado con el efecto citotóxico del péptido LfcinB (20-25)₄ contra la línea celular HTB-22TM está mediado principalmente por procesos apoptóticos.

El diseño de péptidos polivalentes a partir de secuencias con actividad antibacteriana reconocida de LfcinB es una estrategia viable y novedosa que permitió la obtención de péptidos selectivos con un significativo efecto citotóxico contra líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama.

Los péptidos LfcinB (20-25)₄, LfcinB (21-25)_{Pal} y LfcinB (20-30)₂ se consideran promisorios para la realización de futuros estudios en aras de establecer su uso terapéutico contra el cáncer de mama.

6 Bibliografía

- [1] U.S. Department of Health and Human services, “What Is Cancer?” [Online]. Available: <http://www.cancer.gov/about-cancer/what-is-cancer>. [Accessed: 21-Aug-2015].
- [2] National Cancer Institute, “Cancer Types,” 2018. [Online]. Available: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>. [Accessed: 22-Oct-2018].
- [3] Organización Mundial de la Salud (OMS), “Cáncer,” *Cancer*, 2018. [Online]. Available: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. [Accessed: 22-Oct-2018].
- [4] La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer IRCA, “Breast Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012,” 2012. [Online]. Available: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>. [Accessed: 06-Feb-2018].
- [5] S. A. Arias, R. Hernando, M. Moreno, M. Piñeros, M. M. Bravo, G. Hernández, C. Pardo, Á. Quintero, D. Rivera, R. Sánchez, M. Venegas, and C. Wiesner, “Prioridades de investigación para el control del cáncer en Colombia,” *Revista Colombiana de Cancerología*, vol. 11, no. 3, pp. 152–164, 2008.
- [6] P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez, and M. Khrestchatisky, “Synthetic therapeutic peptides: science and market,” *Drug Discovery Today*, vol. 15, no. 1–2, pp. 40–56, 2010.
- [7] “WATCHING PEPTIDE DRUGS GROW UP,” *Chemical & Engineering News Archive*, vol. 83, no. 11, pp. 17–24, Mar. 2005.
- [8] E. B.V., “ScienceDirect,” 2015. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/>. [Accessed: 01-Sep-2015].
- [9] National library of Medicine, “Home - ClinicalTrials.gov.” [Online]. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>. [Accessed: 23-Oct-2018].
- [10] K. Fosgerau and T. Hoffmann, “Peptide therapeutics : current status and future directions §,” *Drug Discovery Today*, vol. 20, no. 1, pp. 122–128, 2015.
- [11] Y. V. Casanova, J. Antonio, Y. Adriana, P. Umaña, A. Luc, L. Castro, G. A. Reina, J. Eduardo, Z. Jenny, and R. Monroy, “Antibacterial Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Cytotoxic Effect against,” *Molecules*, vol. 22, no. 10, p. 1641, 2017.

- [12] R. Bailie, J. Katzenellenbogen, M. Hoffman, G. Schierhout, H. Truter, and D. Dent, "Breast Cancer Risk and Prevention," vol. 87, 1997.
- [13] P. Eroles, A. Bosch, J. Alejandro Pérez-Fidalgo, and A. Lluch, "Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways," *Cancer Treatment Reviews*, vol. 38, no. 6, pp. 698–707, 2012.
- [14] L. J. Solin, R. Gray, F. L. Baehner, S. M. Butler, L. L. Hughes, C. Yoshizawa, D. B. Cherbavaz, S. Shak, D. L. Page, G. W. Sledge, N. E. Davidson, J. N. Ingle, E. a. Perez, W. C. Wood, J. a. Sparano, and S. Badve, "A multigene expression assay to predict local recurrence risk for ductal carcinoma in situ of the breast," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 105, no. 10, pp. 701–710, 2013.
- [15] M. J. van de Vijver, Y. D. He, L. J. van't Veer, H. Dai, A. a M. Hart, D. W. Voskuil, G. J. Schreiber, J. L. Peterse, C. Roberts, M. J. Marton, M. Parrish, D. Atsma, A. Witteveen, A. Glas, L. Delahaye, T. van der Velde, H. Bartelink, S. Rodenhuis, E. T. Rutgers, S. H. Friend, R. Bernards, V. De Vijver, and T. N. England, "Numb Er 25 a Gene-Expression Signature As a Predictor of Survival in Breast Cancer," *English Journal*, vol. 347, no. 25, pp. 1999–2009, 2002.
- [16] Instituto Nacional del Cáncer, "Cancer de seno (mama) Aspectos generales." [Online]. Available: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno>. [Accessed: 06-Aug-2015].
- [17] J. Kao, K. Salari, M. Bocanegra, Y.-L. Choi, L. Girard, J. Gandhi, K. A. Kwei, T. Hernandez-Boussard, P. Wang, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. R. Pollack, "Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery.," *PloS one*, vol. 4, no. 7, p. e6146, Jul. 2009.
- [18] F. Imigo G., E. Mansilla S., I. Delama G., M. T. Poblete S., and C. Fonfach Z., "Clasificación molecular del cáncer de mama," *Cuadernos de Cirugía; Vol. 25 Núm. 1 (2011)*, May 2018.
- [19] A. Prat, J. S. Parker, C. Fan, M. C. U. Cheang, L. D. Miller, J. Bergh, S. K. L. Chia, P. S. Bernard, T. O. Nielsen, M. J. Ellis, L. a. Carey, and C. M. Perou, "Concordance among gene expression-based predictors for ER-positive breast cancer treated with adjuvant tamoxifen," *Annals of Oncology*, vol. 23, no. 11, pp. 2866–2873, 2012.
- [20] K. D. Voduc, M. C. U. Cheang, S. Tyldesley, K. Gelmon, T. O. Nielsen, and H. Kennecke, "Breast Cancer Subtypes and the Risk of Local and Regional Relapse," *Journal of Clinical*

Oncology, vol. 28, no. 10, pp. 1684–1691, Apr. 2010.

- [21] A.-R. Hartman, R. R. Kaldate, L. M. Sailer, L. Painter, C. E. Grier, R. R. Endsley, M. Griffin, S. A. Hamilton, C. A. Frye, M. A. Silberman, R. J. Wenstrup, and J. F. Sandbach, “Prevalence of BRCA mutations in an unselected population of triple-negative breast cancer.,” *Cancer*, vol. 118, no. 11, pp. 2787–95, 2012.
- [22] M. Cianfrocca and L. J. Goldstein, “Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer.,” *The oncologist*, vol. 9, no. 6, pp. 606–616, 2004.
- [23] B. T. Hennessy, A.-M. Gonzalez-Angulo, K. Stemke-Hale, M. Z. Gilcrease, S. Krishnamurthy, J.-S. Lee, J. Fridlyand, A. Sahin, R. Agarwal, C. Joy, W. Liu, D. Stivers, K. Baggerly, M. Carey, A. Lluch, C. Monteagudo, X. He, V. Weigman, C. Fan, J. Palazzo, G. N. Hortobagyi, L. K. Nolden, N. J. Wang, V. Valero, J. W. Gray, C. M. Perou, and G. B. Mills, “Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics.,” *Cancer research*, vol. 69, no. 10, pp. 4116–4124, May 2009.
- [24] L. O. Brandenburg, J. Merres, L. J. Albrecht, D. Varoga, and T. Pufe, “Antimicrobial peptides: Multifunctional drugs for different applications,” *Polymers*, vol. 4, no. 1, pp. 539–560, 2012.
- [25] M. Ayoub and D. Scheidegger, “Peptide drugs, overcoming the challenges, a growing business,” *Chimica Oggi*, vol. 24, no. 4, pp. 46–48, 2006.
- [26] R. B. Merrifield, “Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 85, no. 14, pp. 2149–2154, Jul. 1963.
- [27] E. G. Paul Lloyd-Williams, Fernando Albericio, *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*. Barcelona España: CRC Press, 1997.
- [28] M. Anand, M. Alagar, J. Ranjitha, and V. Selvaraj, “Total synthesis and anticancer activity of a cyclic heptapeptide from marine sponge using water soluble peptide coupling agent EDC,” *Arabian Journal of Chemistry*, 2015.
- [29] W. Shoombuatong, N. Schaduagrath, and C. Nantasenamat, “Unraveling the bioactivity of anticancer peptides as deduced from machine learning,” *EXCLI Journal*, vol. 17, no. Thundimadathil 2012, pp. 734–752, 2018.
- [30] V. Teixeira, M. J. Feio, and M. Bastos, “Role of lipids in the interaction of antimicrobial

- peptides with membranes,” *Progress in Lipid Research*, vol. 51, no. 2, pp. 149–177, 2012.
- [31] a. Giuliani, G. Pirri, a. Bozzi, a. Di Giulio, M. Aschi, and a. C. Rinaldi, “Antimicrobial peptides: Natural templates for synthetic membrane-active compounds,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 65, no. 16, pp. 2450–2460, 2008.
- [32] Y. H. Tu, Y. H. Ho, Y. C. Chuang, P. C. Chen, and C. S. Chen, “Identification of lactoferricin B intracellular targets using an escherichia coli proteome chip,” *PLoS ONE*, vol. 6, no. 12, 2011.
- [33] D. W. Hoskin and A. Ramamoorthy, “Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides,” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1778, no. 2, pp. 357–375, 2008.
- [34] D. Gaspar, A. Salomé Veiga, and M. a R. B. Castanho, “From antimicrobial to anticancer peptides. A review,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 4, no. OCT, pp. 1–17, 2013.
- [35] M. R. Felício, O. N. Silva, S. Gonçalves, N. C. Santos, and O. L. Franco, “Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities,” *Frontiers in Chemistry*, vol. 5, 2017.
- [36] F. Schweizer, “Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity,” *European Journal of Pharmacology*, vol. 625, no. 1–3, pp. 190–194, 2009.
- [37] Y.-Q. C. Yang-Yang Han, Hong-Yan Liu, Dong-Ju Han, Xi-Cui Zong, Shuang-Quan Zhang, “Role of glycosylation in the anticancer activity of antibacterial peptides against breast cancer cells,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 86, no. 9, pp. 1254–1262, 2013.
- [38] C. Wang, Y. Zhou, S. Li, H. Li, L. Tian, H. Wang, and D. Shang, “Anticancer mechanisms of temporin-1CEa, an amphipathic α -helical antimicrobial peptide, in Bcap-37 human breast cancer cells,” *Life Sciences*, vol. 92, no. 20–21, pp. 1004–1014, 2013.
- [39] D. I. Chan, E. J. Prenner, and H. J. Vogel, “Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action,” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, vol. 1758, no. 9, pp. 1184–1202, 2006.
- [40] S. S. Usmani, G. Bedi, J. S. Samuel, S. Singh, S. Kalra, P. Kumar, A. A. Ahuja, M. Sharma, A. Gautam, and G. P. S. Raghava, “THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics,” *PLOS ONE*, vol. 12, no. 7, p. e0181748, Jul. 2017.
- [41] M. Li, Z. Tang, Y. Zhang, S. Lv, Q. Li, and X. Chen, “Targeted delivery of cisplatin by LHRH-peptide conjugated dextran nanoparticles suppresses breast cancer growth and

- metastasis,” *Acta Biomaterialia*, vol. 18, pp. 132–143, 2015.
- [42] X. Dai, C. Cai, F. Xiao, Y. Xiong, Y. Huang, Q. Zhang, Q. Xiang, G. Lou, M. Lian, Z. Su, and Q. Zheng, “Identification of a novel aFGF-binding peptide with anti-tumor effect on breast cancer from phage display library,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 445, no. 4, pp. 795–801, 2014.
- [43] S. L. K. I. Ichards, D. L. W. Eaver, J. B. Ond, D. N. K. Rag, S. C. Pero, G. S. Shukla, A. L. Armstrong, D. Peterson, S. P. Fuller, K. Godin, S. L. Kingsley-Richards, D. L. Weaver, J. Bond, and D. N. Krag, “Identification of a small peptide that inhibits the phosphorylation of ErbB2 and proliferation of ErbB2 overexpressing breast cancer cells,” *International Journal of Cancer*, vol. 111, no. 6, pp. 951–960, 2004.
- [44] K. L. Cook, L. J. Metheny-Barlow, E. A. Tallant, and P. E. Gallagher, “Angiotensin-(1-7) reduces fibrosis in orthotopic breast tumors,” *Cancer Research*, vol. 70, no. 21, pp. 8319–8328, 2010.
- [45] W. Yang, L. Meng, H. Wang, R. Chen, R. Wang, X. Ma, G. Xu, J. Zhou, S. Wang, Y. Lu, and D. Ma, “Inhibition of proliferative and invasive capacities of breast cancer cells by arginine-glycine-aspartic acid peptide in vitro,” *Oncology Reports*, vol. 15, no. 1, pp. 113–117, 2006.
- [46] E. Lee, J. E. Koskimaki, N. B. Pandey, A. S. Popel, and T. Protein, “Inhibition of lymphangiogenesis and angiogenesis in breast tumor xenografts and lymph nodes by a peptide derived from transmembrane protein 45A.,” *Neoplasia (New York, N.Y.)*, vol. 15, no. 2, pp. 112–24, 2013.
- [47] H. Soo, C. Bae, J. Min, S. a. Jang, I. Yup, M. Sun, J. Hyun, S. Chang, H. S. Lee, C. B. Park, J. M. Kim, S. a. Jang, I. Y. Park, M. S. Kim, J. H. Cho, S. C. Kim, H. Soo, C. Bae, J. Min, S. a. Jang, I. Yup, M. Sun, J. Hyun, and S. Chang, “Mechanism of anticancer activity of buforin IIb, a histone H2A-derived peptide,” *Cancer Letters*, vol. 271, no. 1, pp. 47–55, Sep. 2015.
- [48] T. Rozek, K. L. Wegener, J. H. Bowie, I. N. Olver, J. a. Carver, J. C. Wallace, and M. J. Tyler, “The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*: The solution structure of aurein 1.2,” *European Journal of Biochemistry*, vol. 267, no. 17, pp. 5330–5341, 2000.
- [49] C. Conesa, L. Sánchez, C. Rota, M. D. Pérez, M. Calvo, S. Farnaud, and R. W. Evans,

- “Isolation of lactoferrin from milk of different species: Calorimetric and antimicrobial studies,” *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 150, no. 1, pp. 131–139, 2008.
- [50] M. L. Groves and L. Groves, “The Isolation of a Red Protein from Milk,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 82, pp. 3345–3350, 1960.
- [51] T. G. Kanyshkova, S. E. Babina, D. V. Semenov, N. Isaeva, A. V. Vlassov, K. N. Neustroev, A. a. Kul’minskaya, V. N. Buneva, and G. a. Nevinsky, “Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin,” *European Journal of Biochemistry*, vol. 270, no. 16, pp. 3353–3361, 2003.
- [52] P. Drobni, J. Näslund, and M. Evander, “Lactoferrin inhibits human papillomavirus binding and uptake in vitro,” *Antiviral Research*, vol. 64, no. 1, pp. 63–68, 2004.
- [53] X. X. Xu, H. R. Jiang, H. B. Li, T. N. Zhang, Q. Zhou, and N. Liu, “Apoptosis of stomach cancer cell SGC-7901 and regulation of Akt signaling way induced by bovine lactoferrin,” *Journal of Dairy Science*, vol. 93, no. 6, pp. 2344–2350, Jun. 2010.
- [54] D. Wu, Y. Gao, Y. Qi, L. Chen, Y. Ma, and Y. Li, “Peptide-based cancer therapy: Opportunity and challenge,” *Cancer Letters*, vol. 351, no. 1, pp. 13–22, 2014.
- [55] Y.-T. Tung, H.-L. Chen, C.-C. Yen, P.-Y. Lee, H.-C. Tsai, M.-F. Lin, and C.-M. Chen, “Bovine lactoferrin inhibits lung cancer growth through suppression of both inflammation and expression of vascular endothelial growth factor,” *Journal of Dairy Science*, vol. 96, no. 4, pp. 2095–2106, Apr. 2013.
- [56] K. Norrby, I. Mattsby-Baltzer, M. Innocenti, and S. Tuneberg, “Orally administered bovine lactoferrin systemically inhibits VEGF(165)-mediated angiogenesis in the rat.,” *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol. 91, no. 2, pp. 236–240, 2001.
- [57] M. Tomita, W. Bellamy, M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, and K. Kawase, “Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin.,” *Journal of dairy science*, vol. 74, no. 12, pp. 4137–4142, 1991.
- [58] H. Kuwata, T. T. Yip, M. Tomita, and T. W. Hutchens, “Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin,” *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 1429, no. 1, pp. 129–141, 1998.

- [59] T.-N. Zhang and N. Liu, "Effect of bovine lactoferricin on DNA methyltransferase 1 levels in Jurkat T-leukemia cells.," *Journal of dairy science*, vol. 93, no. 9, pp. 3925–3930, 2010.
- [60] S. J. Furlong, J. S. Mader, and D. W. Hoskin, "Lactoferricin-induced apoptosis in estrogen-nonresponsive MDA-MB-435 breast cancer cells is enhanced by C6 ceramide or tamoxifen," *Oncology Reports*, vol. 15, no. 5, pp. 1385–1390, 2006.
- [61] S. T. W. McKeown, F. T. Lundy, J. Nelson, D. Lockhart, C. R. Irwin, C. G. Cowan, and J. J. Marley, "The cytotoxic effects of human neutrophil peptide-1 (HNP1) and lactoferrin on oral squamous cell carcinoma (OSCC) in vitro," *Oral Oncology*, vol. 42, no. 7, pp. 685–690, 2006.
- [62] J. S. Mader, J. Salsman, D. M. Conrad, and D. W. Hoskin, "Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines.," *Molecular cancer therapeutics*, vol. 4, no. 4, pp. 612–624, 2005.
- [63] A. Richardson, R. de Antueno, R. Duncan, and D. W. Hoskin, "Intracellular delivery of bovine lactoferricin's antimicrobial core (RRWQWR) kills T-leukemia cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 388, no. 4, pp. 736–741, 2009.
- [64] D. J. Schibli, P. M. Hwang, H. J. Vogel, P. M. H. I, and H. J. Vogel, "The structure of the antimicrobial active center of lactoferricin B bound to sodium dodecyl sulfate micelles," *FEBS Letters*, vol. 446, no. 2–3, pp. 213–217, 1999.
- [65] N. D. J. Huertas Méndez, Y. Vargas Casanova, A. K. Gómez Chimbi, E. Hernández, A. L. Leal Castro, J. M. Melo Diaz, Z. J. Rivera Monroy, and J. E. García Castañeda, "Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Antimicrobial Activity against E. coli ATCC 11775, S. maltophilia ATCC 13636 and S. enteritidis ATCC 13076," *Molecules*, vol. 22, no. 3, 2017.
- [66] V. A. Solarte, J. E. Rosas, Z. J. Rivera, M. L. Arango-rodríguez, J. E. García, and J. Vernot, "A Tetrameric Peptide Derived from Bovine Lactoferricin Exhibits Specific Cytotoxic Effects against Oral Squamous-Cell Carcinoma Cell Lines," vol. 2015, 2015.
- [67] S. Y. Hong, "S tructure-activity relationship study : short an timicrobial pep tides," pp. 41–46, 1999.
- [68] L. T. Nguyen, J. K. Chau, N. a. Perry, L. de Boer, S. a J. Zaat, and H. J. Vogel, "Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs," *PLoS ONE*, vol. 5, no. 9, pp. 1–8, 2010.

- [69] M. Dathe, H. Nikolenko, J. Klose, M. Bienert, T. Hexapeptides, M. Dathe, H. Nikolenko, J. Klose, and M. Bienert, "Cyclization increases the antimicrobial activity and selectivity of arginine- and tryptophan-containing hexapeptides," *Biochemistry*, vol. 43, no. 28, pp. 9140–9150, 2004.
- [70] International Agency for Research on Cancer (IARC), "World Cancer Report 2014, IARC," 2014. [Online]. Available: <http://www.iarc.fr/en/publications/books/wcr/wcr-order.php>.
- [71] Instituto Nacional de Cancerología (INC), "CÁNCER EN CIFRAS." [Online]. Available: <http://www.cancer.gov.co/content/estadisticas>. [Accessed: 07-Feb-2018].
- [72] Ministerio de Salud y Protección Social (MINSALUD), "Cáncer de mama, una enfermedad en ascenso en Colombia Boletín de prensa 298 de 2014," 2014. [Online]. Available: <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/-Cancer-de-mama,-una-enfermedad-en-ascenso-en-Colombia.aspx>. [Accessed: 07-Feb-2018].
- [73] S. General and S. Social, *Guía de práctica clínica (GPC) para la detección temprana , tratamiento integral , seguimiento y rehabilitación del cáncer de mama*. 2013.
- [74] Pfizer, "I+D+i: El valor de los medicamentos innovadores," *16 de marzo de 2016*, 2016. [Online]. Available: https://www.pfizer.es/investigacion_desarrollo/investigacion_biomedica/idi_valor_medicamentos_innovadores.html#. [Accessed: 07-Feb-2018].
- [75] J. Marovac, "Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco," *Revista mÃcopyrightdica de Chile*, vol. 129, pp. 99–106, 2001.
- [76] M. A. León-calvijo, A. L. Leal-castro, G. A. Almanzar-reina, J. E. Rosas-pérez, J. E. García-castañeda, and Z. J. Rivera-monroy, "Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Derived from Lactoferricin against Escherichia coli ATCC 25922 and Enterococcus faecalis ATCC 29212," *BioMed Research International*, vol. 2015, no. 453826, p. 8, 2015.
- [77] N. de J. Huertas, Z. J. R. Monroy, R. F. Medina, and J. E. G. Castañeda, "Antimicrobial Activity of Truncated and Polyvalent Peptides Derived from the FKCRQWQWRMKKGLA Sequence against Escherichia coli ATCC 25922 and Staphylococcus aureus ATCC 25923," *Molecules*, vol. 22, no. 6, 2017.
- [78] K. Sadler and J. P. Tam, "Peptide dendrimers: applications and synthesis.," *Journal of biotechnology*, vol. 90, no. 3–4, pp. 195–229, May 2002.

- [79] Z. Rivera, G. Granados, M. Pinto, D. Varón, C. Carvajal, F. Chaves, J. Calvo, R. Rodríguez, F. Guzmán, and M. E. Patarroyo, "Double dimer peptide constructs are immunogenic and protective against *Plasmodium falciparum* in the experimental Aotus monkey model," *The Journal of Peptide Research*, vol. 59, no. 2, pp. 62–70, Dec. 2008.
- [80] Merck, "Rink Amide resin (100-200 mesh)," 2019. [Online]. Available: http://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Rink-Amide-resin-100-200-mesh,MDA_CHEM-855001. [Accessed: 18-Feb-2019].
- [81] V. Galeano, J. Rivera, E. Rosas, and E. García, "Efficient Synthesis of Peptides with 4-Methylpiperidine as Fmoc Removal Reagent by Solid Phase Synthesis," *J. Mex. Chem. Soc.*, vol. 58, no. 4, pp. 386–392, 2014.
- [82] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, and P. I. Cook, "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides," *Analytical Biochemistry*, vol. 34, no. 2, pp. 595–598, 1970.
- [83] E. M. D. Millipore and M. Kga, "Fmoc resin cleavage protocols," in *Nova Biochem*, .
- [84] Merck, "Solid Phase Extraction: Reversed-Phase Methodology," 2019. [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/solid-phase-extraction/reversed-phase-methodology.html>. [Accessed: 18-Feb-2019].
- [85] T. M. Postma and F. Albericio, "Disulfide Formation Strategies in Peptide Synthesis," pp. 3519–3530, 2014.
- [86] N. Rodthongkum, R. Ramireddy, S. Thayumanavan, and W. V. Richard, "Selective enrichment and sensitive detection of peptide and protein biomarkers in human serum using polymeric reverse micelles and MALDI-MS," *The Analyst*, vol. 137, no. 4, pp. 1024–1030, Feb. 2012.
- [87] D. of C. T. and D. National Institute of Health, National Cancer Institute, "Discovery & Development Services | DTP." [Online]. Available: https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm. [Accessed: 28-Oct-2018].
- [88] A. T. C. Collection, "Thawing, Propagating, and Cryopreserving Protocol NCI-PBCF-HTB132 (MDA-MB-468) Breast Adenocarcinoma," *American Type Culture Collection*, vol. 26, pp. 1–25, 2012.

- [89] P. Sheet, “MDA MB-231 (ATCC ® HTB- 26TM),” pp. 3–5.
- [90] R. Cailleau, R. Young, M. Olivé, and W. J. Reeves, “Breast tumor cell lines from pleural effusions.,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 53, no. 3, pp. 661–674, 1974.
- [91] “MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26TM).” [Online]. Available: <http://www.atcc.org/products/all/HTB-26.aspx#culturemethod>. [Accessed: 05-Sep-2015].
- [92] M. Lacroix, G. Leclercq, and M.- Vi, “Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours : an update,” *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 5254521, no. 5254521, pp. 1–41, 2003.
- [93] C. Sommers, S. Byers, E. Thompson, J. Torri, and E. Gelmann, “Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines,” *Breast Cancer Research and Treatment*, vol. 31, no. 2–3, pp. 325–335, 1994.
- [94] “MCF-7 Breast adenocarcinoma SOP : Thawing , Propagating and Cryopreserving,” vol. 22, 2012.
- [95] Ş. Comşa, A. M. Cîmpean, and M. Raica, “The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line : 40 years of Experience in Research,” vol. 3154, pp. 3147–3154, 2015.
- [96] S. Temp, “Primary Dermal Fibroblast ; Normal , Human , Adult Primary Dermal Fibroblast ; Normal , Human , Adult,” no. 480 mL, pp. 3–6.
- [97] T. F. S. Inc, *Cell Culture Basics Handbook*. thermofisher.com/gibcoeducation, 2016.
- [98] W. Strober, “Trypan blue exclusion test of cell viability.,” *Current protocols in immunology*, vol. Appendix 3, p. Appendix 3B, May 2001.
- [99] T. J. Langan and R. C. Chou, “Synchronization of mammalian cell cultures by serum deprivation.,” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 761, pp. 75–83, 2011.
- [100] T. Mosmann, “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays,” *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, no. 1, pp. 55–63, 1983.
- [101] A. Oddo and P. R. Hansen, “Hemolytic Activity of Antimicrobial Peptides.,” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1548, pp. 427–435, 2017.
- [102] N. Acid and S. Sampler, “SYTO ® Green-Fluorescent Nucleic Acid Stains,” pp. 1–8.
- [103] Invitrogen, “LIVE / DEAD ® BacLightTM Bacterial Viability Kits,” 2004.

- [104] Beckman Coulter, “ANNEXIN A5 FITC / 7-AAD KIT,” pp. 11–14, 2017.
- [105] Molecular Probes, “MitoProbe™ JC-1 Assay Kit for Flow Cytometry (M34152),” pp. 6–8, 2011.
- [106] BD BioScience, “Calcium Assay Kit,” pp. 1–5, 2008.
- [107] J. M. Walker, *Peptide Synthesis and Applications*. METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY™.
- [108] O. Krokhin, “Expert Review of Proteomics Peptide retention prediction in reversed-phase chromatography : proteomic applications,” vol. 9450, 2014.
- [109] M. Arias, A. L. Hilchie, E. F. Haney, J. G. M. Bolscher, M. E. Hyndman, R. E. W. Hancock, and H. J. Vogel, “Anticancer activities of bovine and human lactoferricin-derived peptides.,” *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, vol. 95, no. 1, pp. 91–98, Feb. 2017.
- [110] W. R. Pan, P.-W. Chen, Y.-L. Chen, H.-C. Hsu, C. Lin, and W.-J. Chen, “Bovine lactoferricin B induces apoptosis of human gastric cancer cell line AGS by inhibition of autophagy at a late stage,” *Journal of dairy science*, vol. 96, 2013.
- [111] H. Chu, B. Yip, K. Chen, H. Yu, and Y. Chih, “Novel Antimicrobial Peptides with High Anticancer Activity and Selectivity,” pp. 1–14, 2015.
- [112] J. Vázquezb, A. Martínc, and M. L. Lamelasb, “Aspartil-proteasas y cáncer de mama Aspartyl-proteases and breast cancer,” vol. 15, no. 3, pp. 123–132, 2002.
- [113] H. Ulvatne, H. H. Haukland, O. Samuelsen, M. Kramer, and L. H. Vorland, “Proteases in Escherichia coli and Staphylococcus aureus confer reduced susceptibility to lactoferricin B.,” *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 50, no. 4, pp. 461–467, Oct. 2002.
- [114] R. Saladino, G. Botta, and M. Crucianelli, “Advances in the synthesis of bioactive unnatural amino acids and peptides.,” *Mini reviews in medicinal chemistry*, vol. 12, no. 4, pp. 277–300, Apr. 2012.
- [115] M. Azuma, T. Kojima, I. Yokoyama, H. Tajiri, K. Yoshikawa, S. Saga, and C. a Del Carpio, “Antibacterial activity of multiple antigen peptides homologous to a loop region in human lactoferrin.,” *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society*, vol. 54, no. 3, pp. 237–241, 1999.
- [116] M. Azuma, T. Kojimab, I. Yokoyama, H. Tajiri, K. Yoshikawa, S. Saga, and C. A. Del

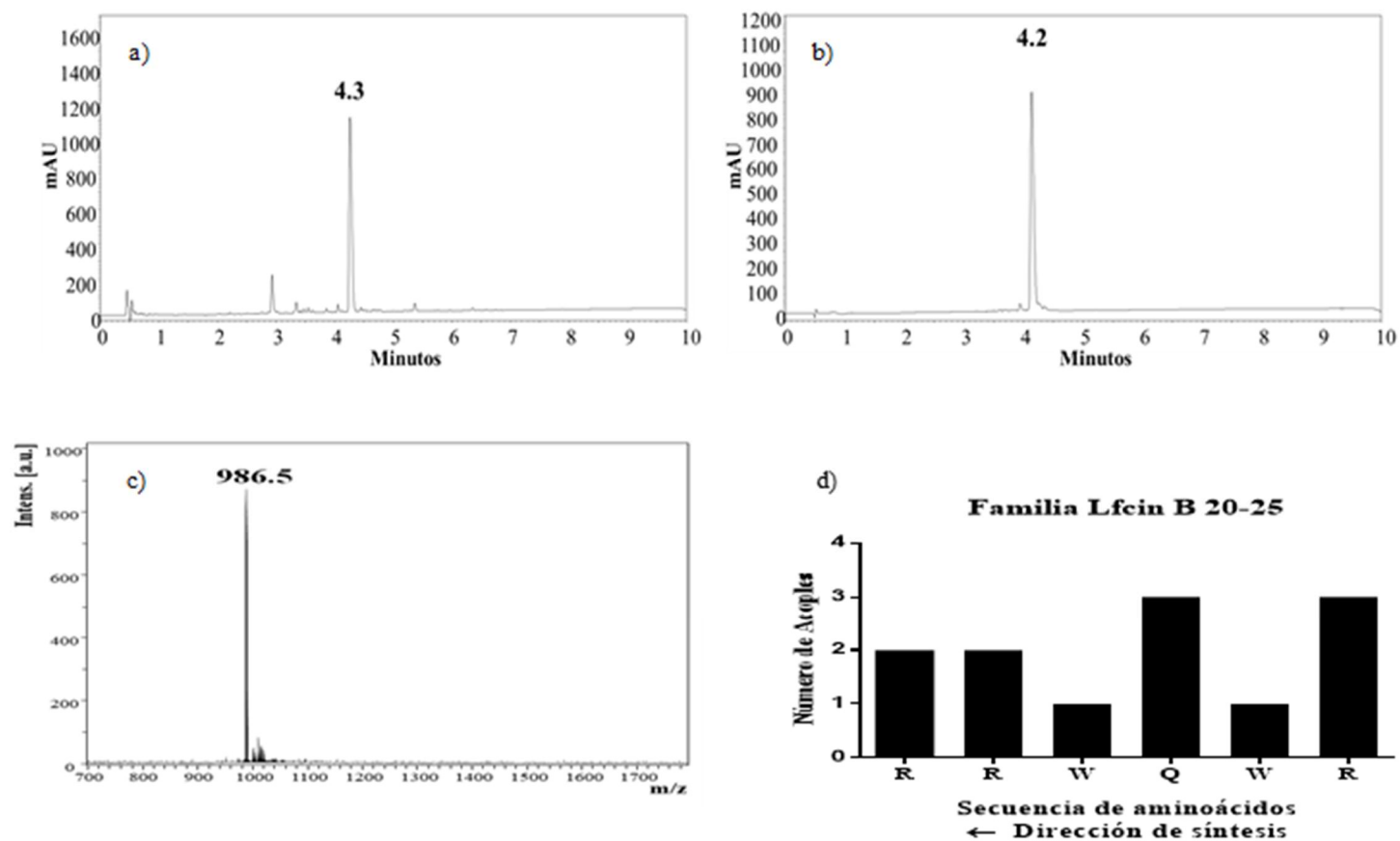
- Carpio, "A synthetic peptide of human apoprotein E with antibacterial activity.," *Peptides*, vol. 21, no. 3, pp. 327–330, Mar. 2000.
- [117] D. S. Chapple, R. Hussain, C. L. Joannou, R. E. W. Hancock, E. Odell, R. W. Evans, and G. Siligardi, "Structure and association of human lactoferrin peptides with *Escherichia coli* lipopolysaccharide.," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 48, no. 6, pp. 2190–2198, Jun. 2004.
- [118] V. Solarte David, P. Conget, J.-P. Vernot, J. Eduardo Rosas, Z. Jenny Rivera, J. Eduardo García, and M. Ligia Arango-Rodríguez, *A tetrameric peptide derived from bovine lactoferricin as a potential therapeutic tool for oral squamous cell carcinoma: A preclinical model*, vol. 12. 2017.
- [119] J. S. Mader, A. Richardson, J. Salsman, D. Top, R. de Antueno, R. Duncan, and D. W. Hoskin, "Bovine lactoferricin causes apoptosis in Jurkat T-leukemia cells by sequential permeabilization of the cell membrane and targeting of mitochondria," *Experimental Cell Research*, vol. 313, no. 12, pp. 2634–2650, 2007.
- [120] R. Jiang and B. Lonnerdal, "Bovine lactoferrin and lactoferricin exert antitumor activities on human colorectal cancer cells (HT-29) by activating various signaling pathways.," *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, vol. 95, no. 1, pp. 99–109, Feb. 2017.
- [121] E. Ellass-Rochard, a Roseanu, D. Legrand, M. Trif, V. Salmon, C. Motas, J. Montreuil, and G. Spik, "Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* 055B5 lipopolysaccharide.," *The Biochemical journal*, vol. 312 (Pt 3, pp. 839–845, 1995.
- [122] P. Y. Muller and M. N. Milton, "The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development," vol. 11, pp. 751–761, 2012.
- [123] M. J. Brearley, "Chapter 16 - Chemotherapy," S. J. Langley-Hobbs, J. L. Demetriou, and J. F. B. T.-F. S. T. and G. S. Ladlow, Eds. W.B. Saunders, 2014, pp. 161–167.
- [124] P. Niederhafner, L. Bednarova, M. Budesinsky, M. Safarik, S. Ehala, J. Jezek, L. Borovickova, V. Fucik, V. Cerovsky, and J. Slaninova, "Melectin MAPs: the influence of dendrimerization on antimicrobial and hemolytic activity.," *Amino acids*, vol. 39, no. 5, pp. 1553–1561, Nov. 2010.
- [125] M. J. Duffy, T. M. Maguire, A. Hill, E. McDermott, and N. O'Higgins, "Metalloproteinases:

- role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis,” *Breast Cancer Research*, vol. 2, no. 4, p. 252, 2000.
- [126] G. Sun, E. Guzman, V. Balasanyan, C. M. Conner, K. Wong, H. R. Zhou, K. S. Kosik, and D. J. Montell, “A molecular signature for anastasis , recovery from the brink of apoptotic cell death,” pp. 1–14.
- [127] H. Polet, “Role of the cell membrane in the uptake of 3H-actinomycin D by mammalian cells in vitro.,” *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 192, no. 2, pp. 270–279, Feb. 1975.
- [128] E. J. Paredes-gamero, M. N. C. Martins, F. A. M. Cappabianco, J. S. Ide, and A. Miranda, “Biochimica et Biophysica Acta Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides : Regulated cell death or membrane disruption,” vol. 1820, pp. 1062–1072, 2012.
- [129] V. Nikolettou, M. Markaki, K. Palikaras, and N. Tavernarakis, “Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy,” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, vol. 1833, no. 12, pp. 3448–3459, 2013.
- [130] M. Leist and M. Jaattela, “Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms.,” *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 2, no. 8, pp. 589–598, Aug. 2001.
- [131] Thermo Fisher, “MitoProbe JC-1 Assay Kit - Thermo Fisher Scientific.” [Online]. Available: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M34152?gclid=CjwKCAiA_ZTfBRBjEiwAN6YG4Tsgr4vJtB9TYyBZwr6RG4iTBkbnOlm8_wqC2QKfyqkDcYm47JtNMRoC_FAQAvD_BwE&s_kwid=AL!3652!3!258194071615!b!!g!!%2Bjc1%2Bmitochondrial&ef_id=CjwKCAiA_ZTfBRBjEiwAN6YG4Tsgr4. [Accessed: 09-Nov-2018].
- [132] L. F. Yousif, K. M. Stewart, K. L. Horton, and S. O. Kelley, “Mitochondria-penetrating peptides: Sequence effects and model cargo transport,” *ChemBioChem*, vol. 10, no. 12, pp. 2081–2088, 2009.
- [133] M. P. Murphy, “How mitochondria produce reactive oxygen species,” *Biochemical Journal*, vol. 417, no. 1, pp. 1–13, 2009.
- [134] J. L. Gifford, H. N. Hunter, and H. J. Vogel, “Lactoferricin : a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial , antiviral , antitumor and immunological,” vol. 62, pp. 2588–2598, 2005.

- [135] S. J. Furlong, J. S. Mader, and D. W. Hoskin, "Bovine lactoferricin induces caspase-independent apoptosis in human B-lymphoma cells and extends the survival of immune-deficient mice bearing B-lymphoma xenografts," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 88, no. 3, pp. 371–375, 2010.
- [136] J. A. Gibbons, J. R. Kanwar, and R. K. Kanwar, "Iron-free and iron-saturated bovine lactoferrin inhibit survivin expression and differentially modulate apoptosis in breast cancer," *Biomed central cancer*, pp. 1–16, 2015.
- [137] K. G. Huwiler, D. F. Mosher, and M. M. Vestling, "Optimizing the MALDI-TOF-MS Observation of Peptides Containing Disulfide Bonds," *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, vol. 14, no. 4, pp. 289–297, Dec. 2003.
- [138] A. M. Burger, "Preclinical Screening for New Anticancer Agents," pp. 29–45.
- [139] E. N. Lorenzón, P. R. S. Sanches, L. G. Nogueira, T. M. Bauab, and E. M. Cilli, "Dimerization of aurein 1.2: Effects in structure, antimicrobial activity and aggregation of *Cândida albicans* cells," *Amino Acids*, vol. 44, no. 6, pp. 1521–1528, 2013.
- [140] S. P. Liu, L. Zhou, R. Lakshminarayanan, and R. W. Beuerman, "Multivalent Antimicrobial Peptides as Therapeutics : Design Principles and Structural Diversities," pp. 199–213, 2010.

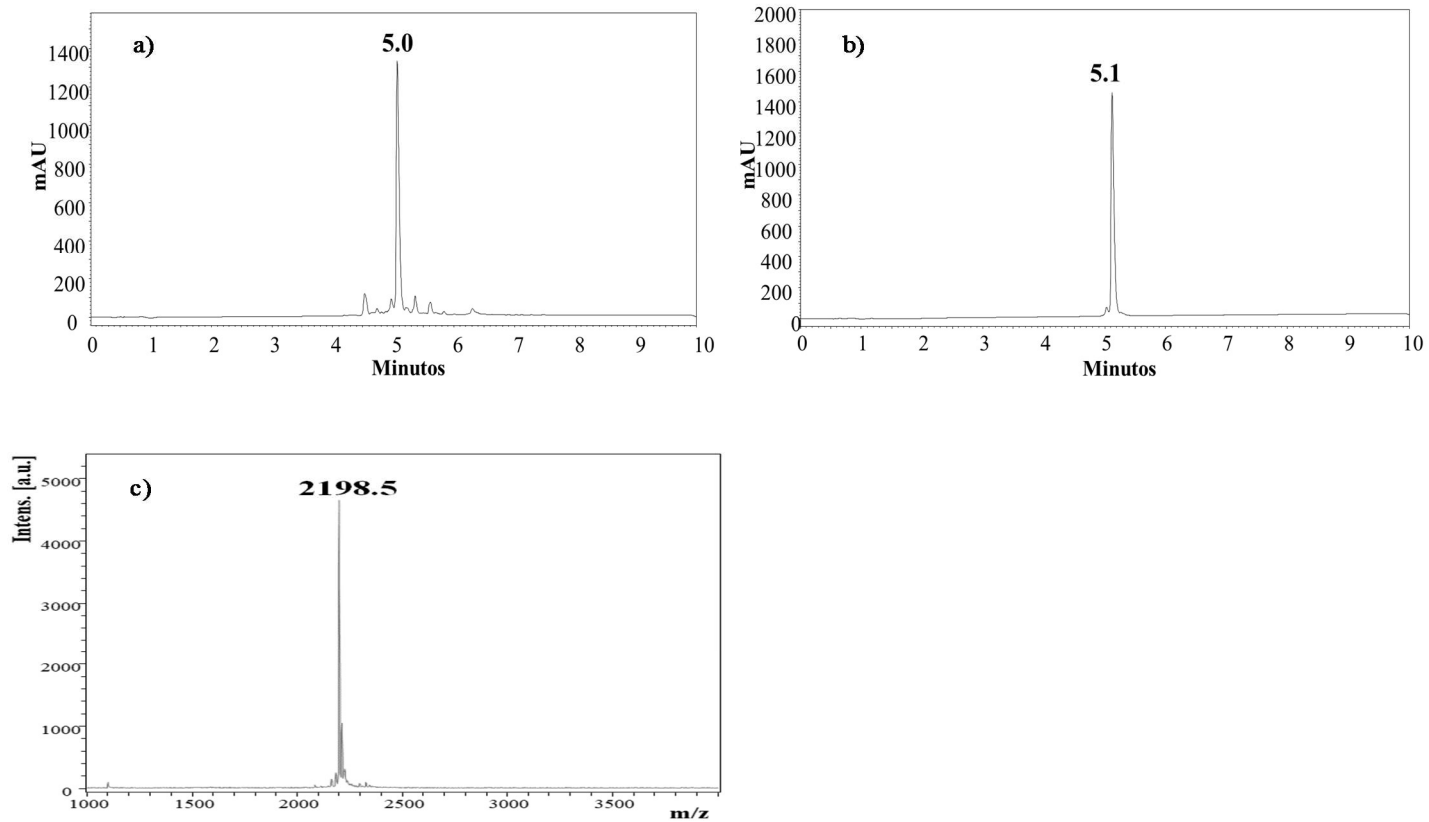
Anexo I. Purificación, Caracterización de péptidos derivados de la LfcinB

LfcinB (20-25) - RRWQWR



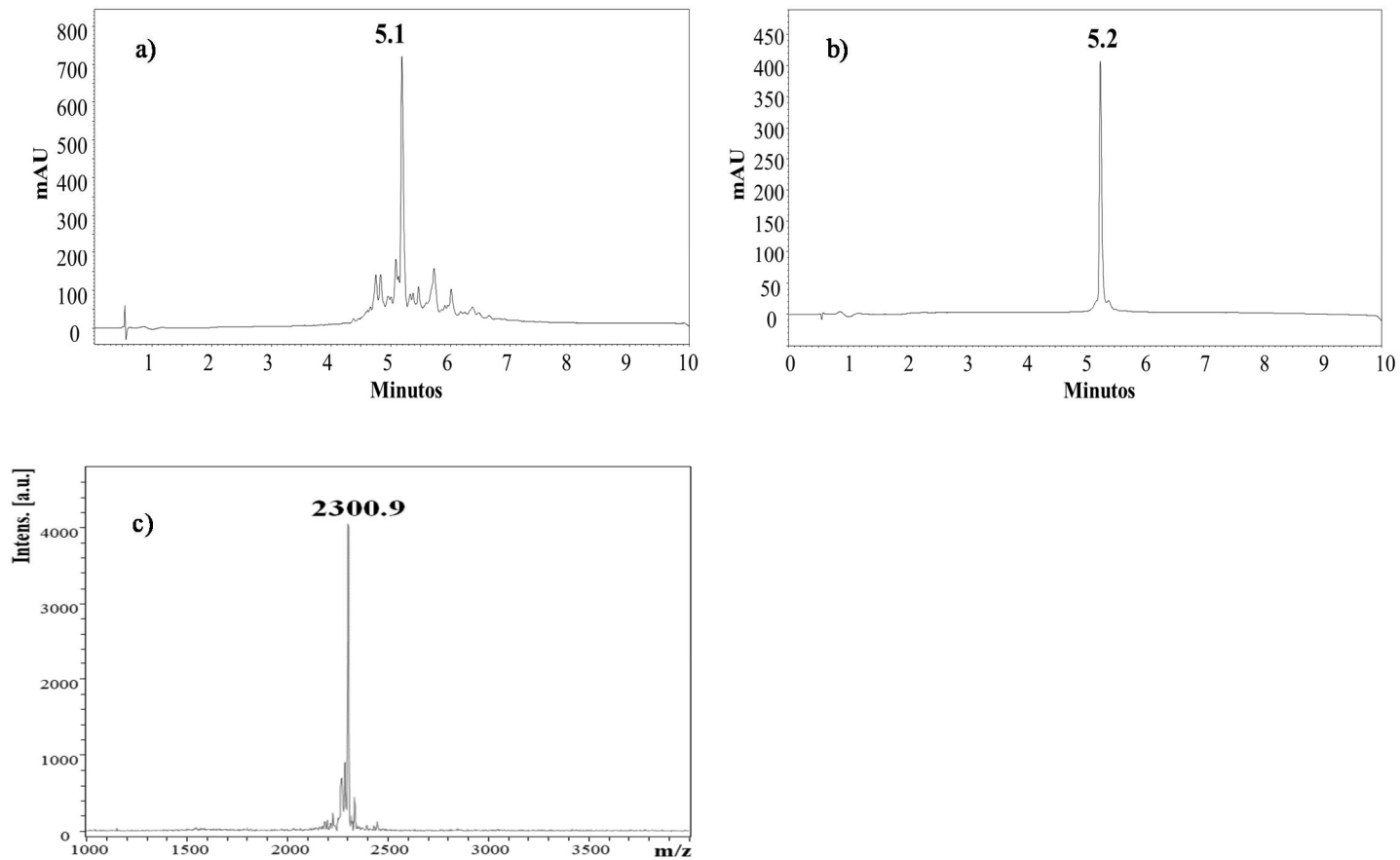
Purificación y caracterización del péptido LfcinB (20-25), a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada, d) comportamiento del proceso de síntesis.

LfcinB (20-25)₂ - (RRWQWR)₂KAhx



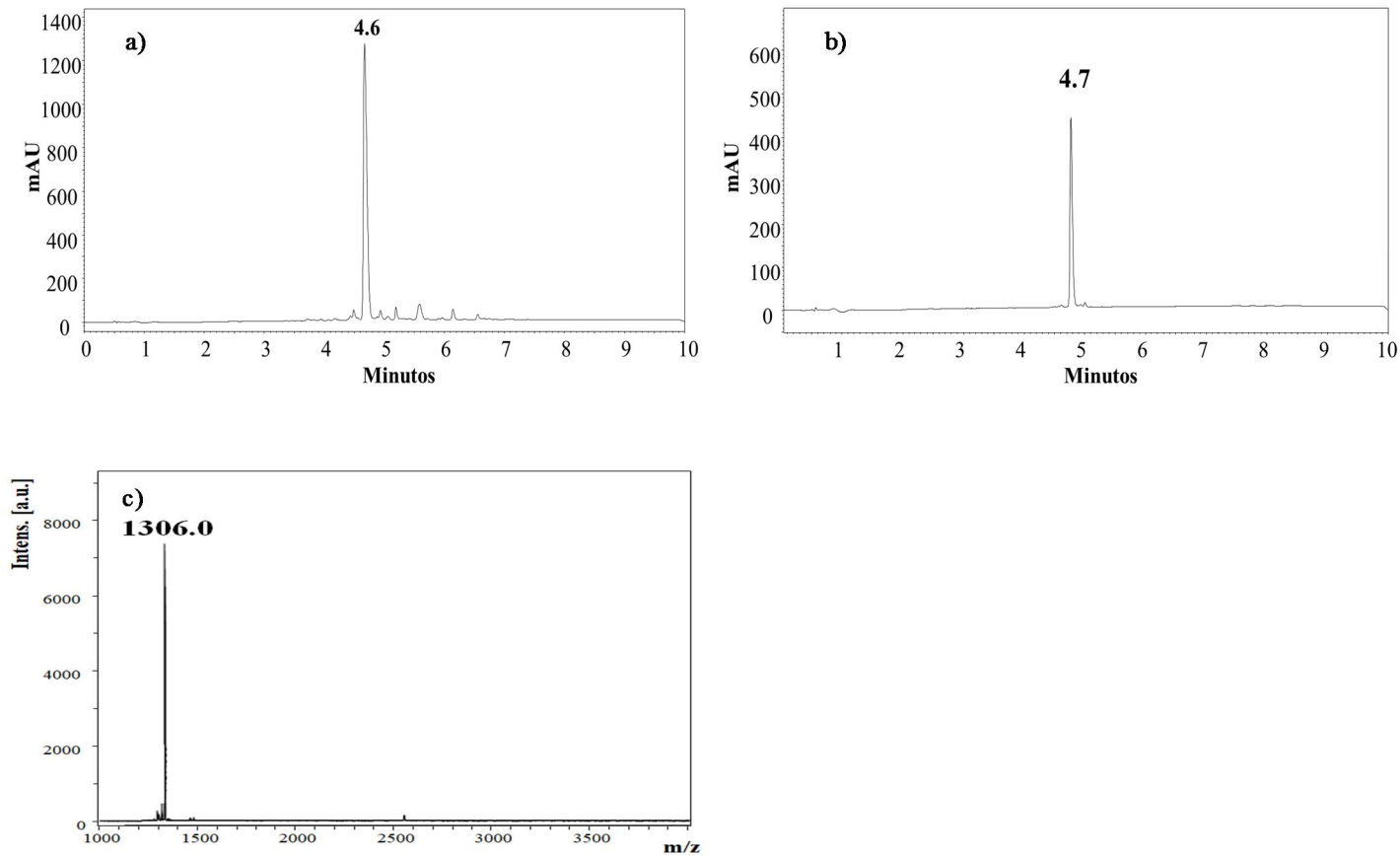
Purificación y caracterización del péptido dimérico LfcinB (20-25)₂, a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada.

LfcinB (20-25)₄ - (RRWQWR)₂KAh_xC



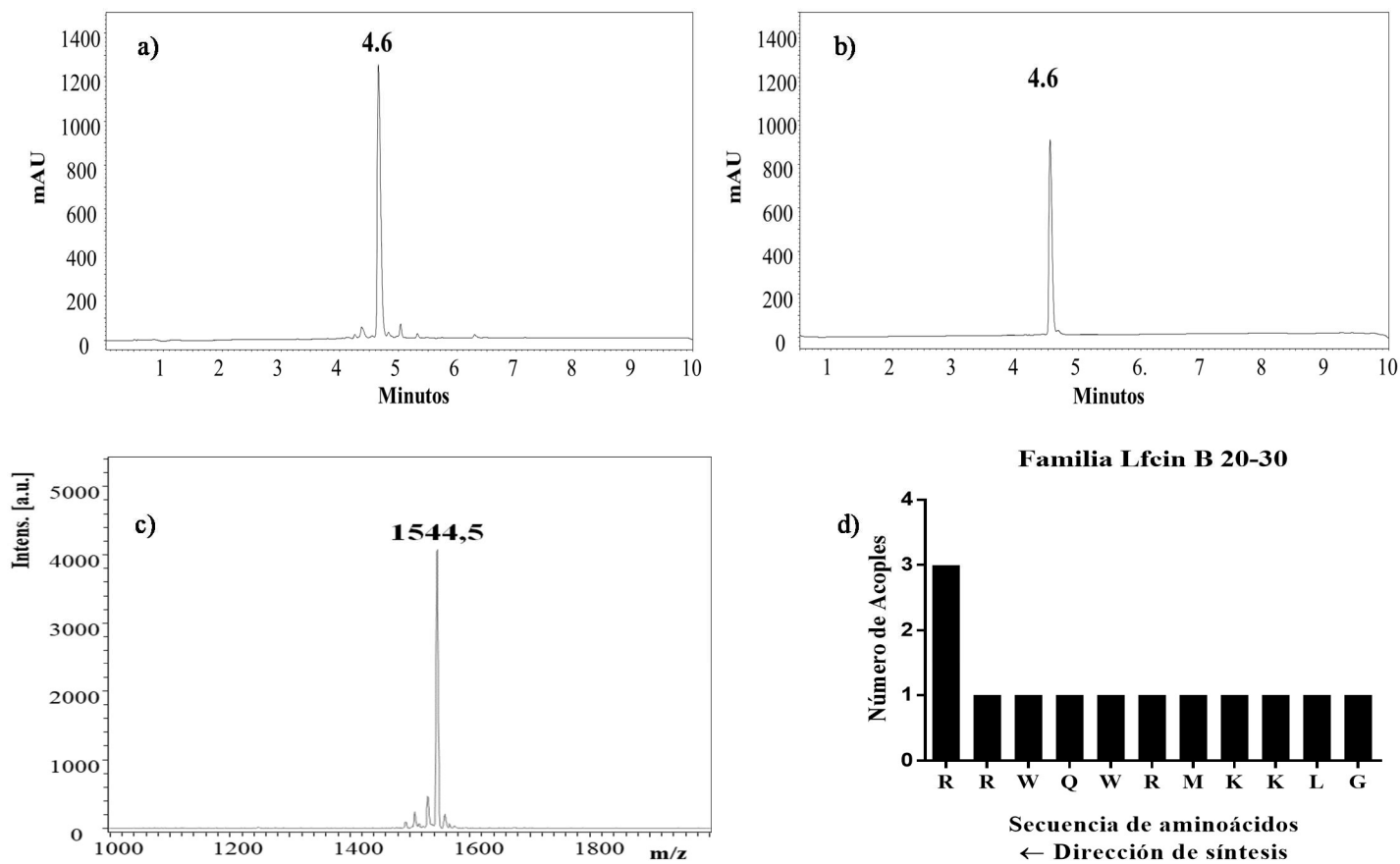
Purificación y caracterización del péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄, a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada.

LfcinB (20-25)_c - C-(RRWQWR)AhxC



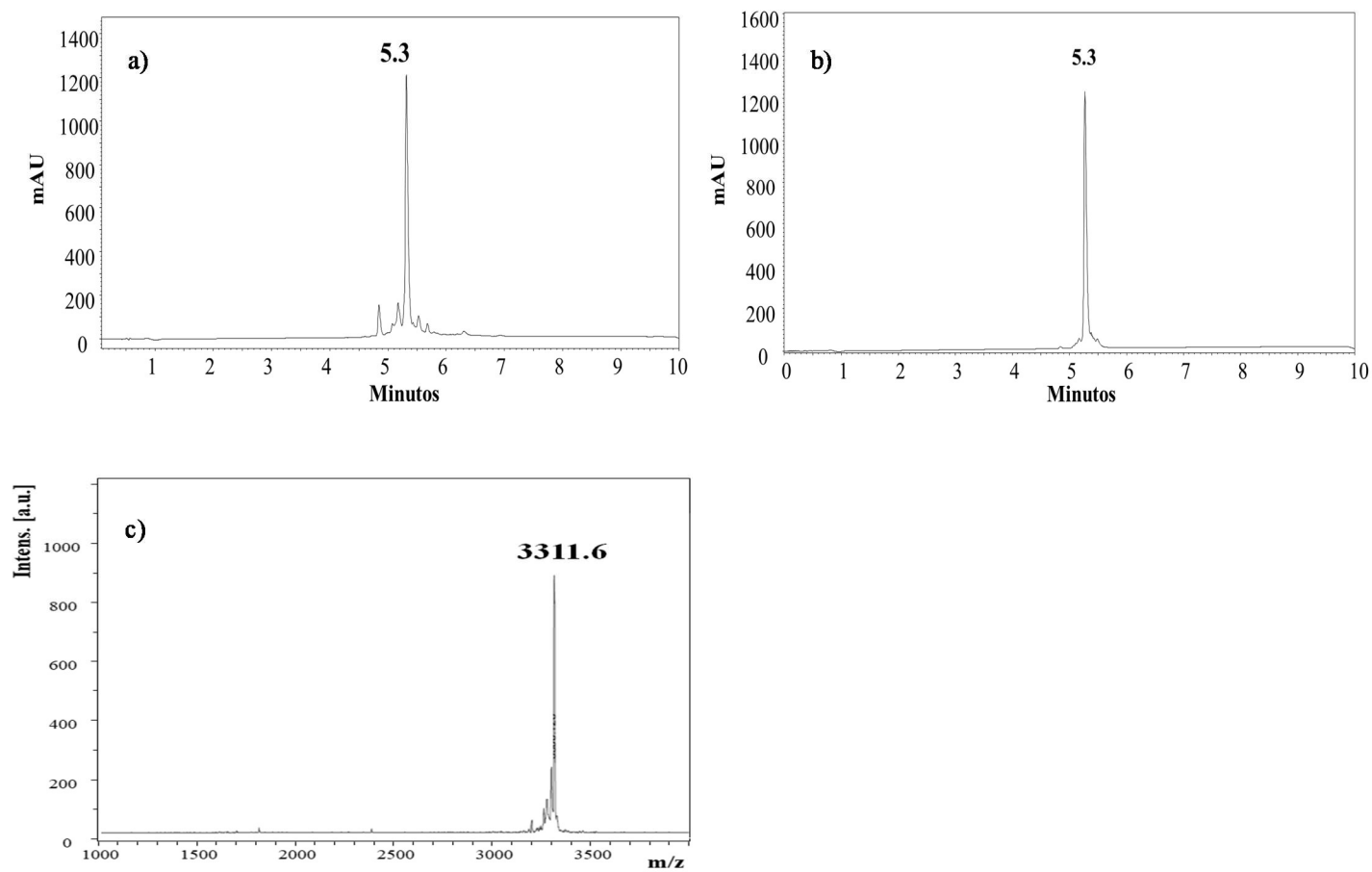
Purificación y caracterización del péptido cíclico LfcinB (20-25)_c, a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada.

LfcinB (20-30) – RRWQWRMKKLG



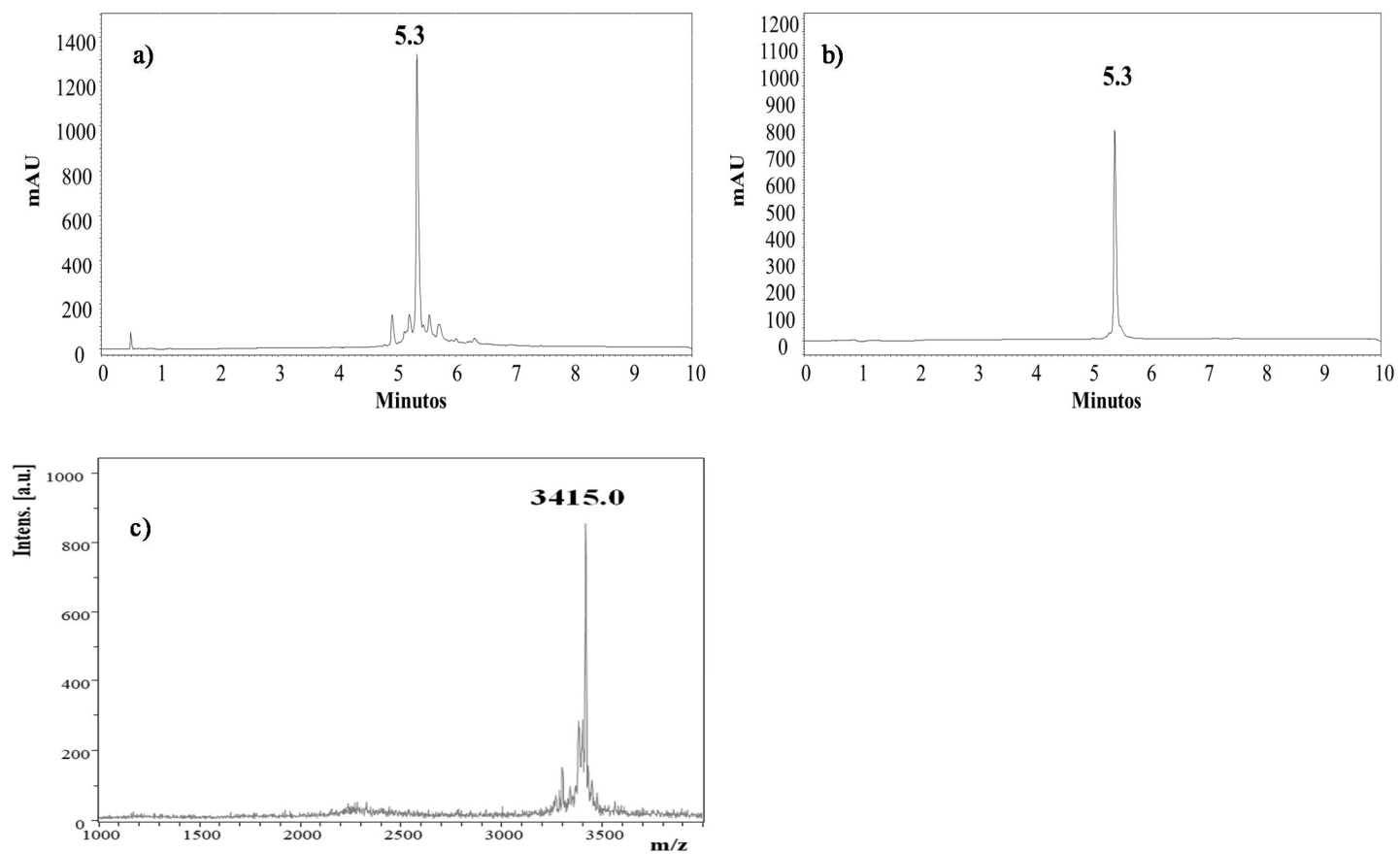
Purificación y caracterización del péptido lineal LfcinB (20-30), a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada, d) comportamiento del proceso de síntesis.

LfcinB (20-30)₂ - (RRWQWRMKKLG)₂KAhx



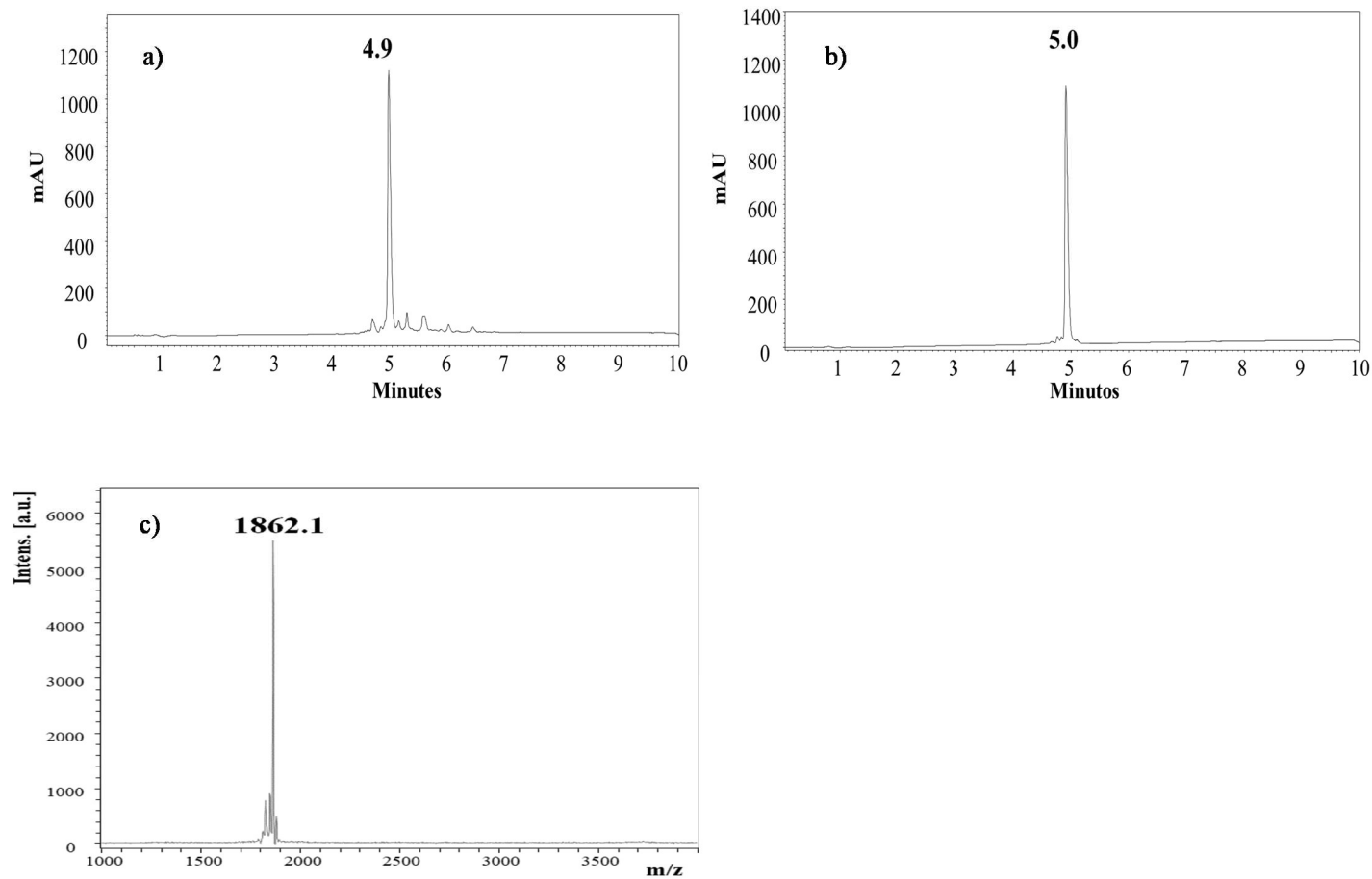
Purificación y caracterización del péptido dimérico LfcinB (20-30)₂, a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada

LfcinB (20-30)₄ - (RRWQWRMKKLG)₂KAh_xC



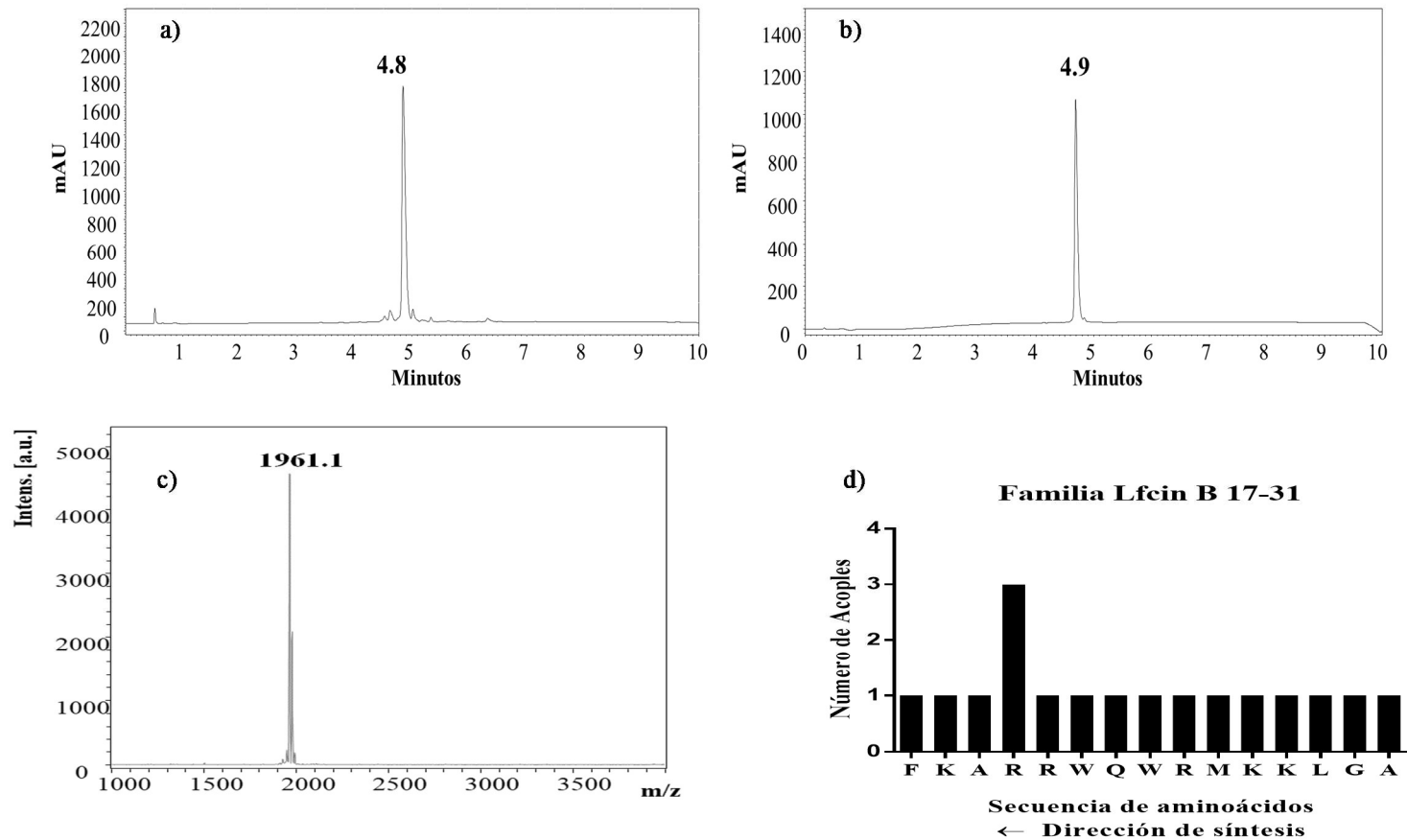
Purificación y caracterización del péptido tetramérico LfcinB (20-30)₄, a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada

LfcinB (20-30)_c - C-(RRWQWRMKKLG)AhxC



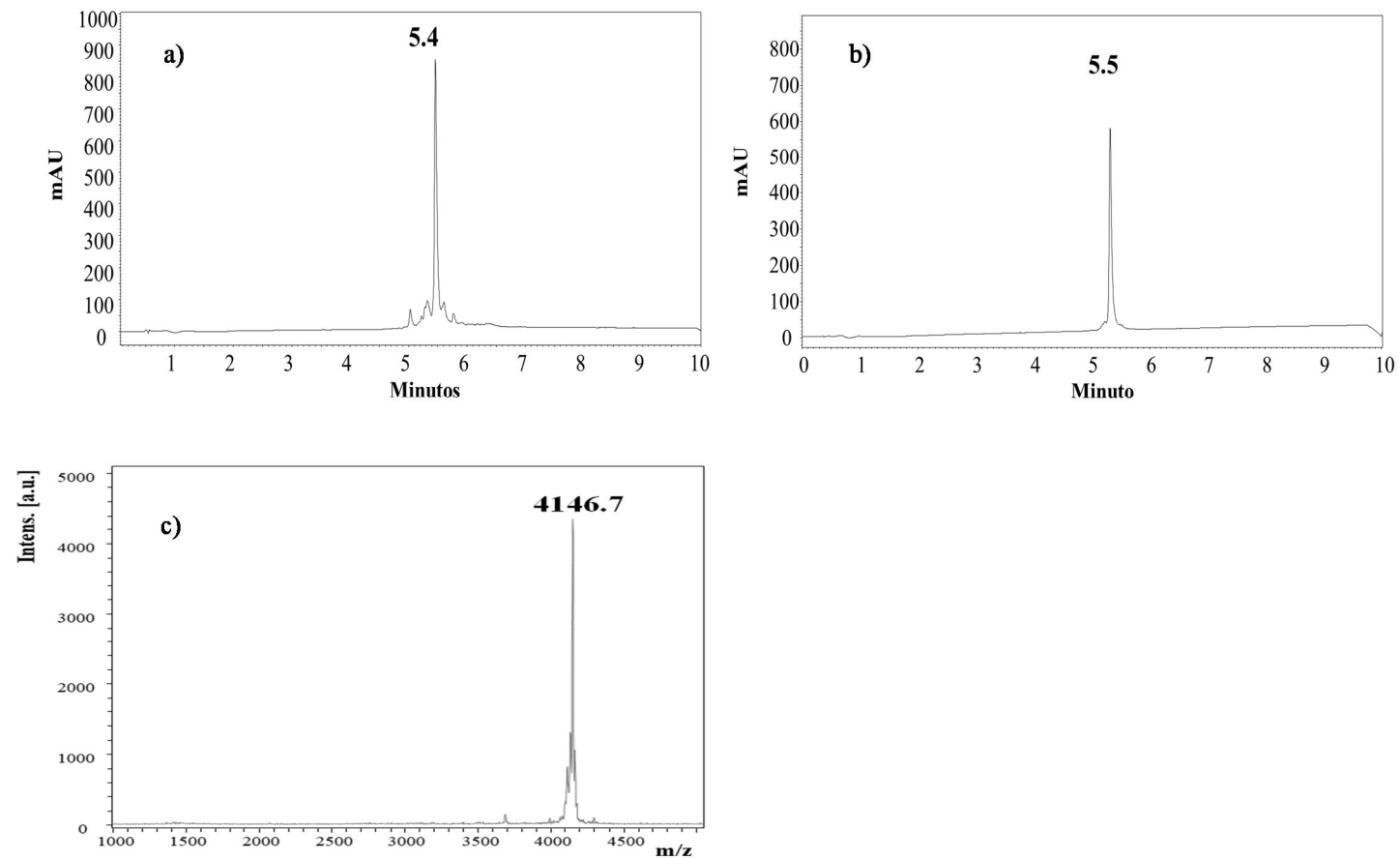
Purificación y caracterización del péptido cíclico LfcinB (20-30)_c, a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada

[Ala¹⁹]-LfcinB (17-31) – FKARRWQWRMKKLGA



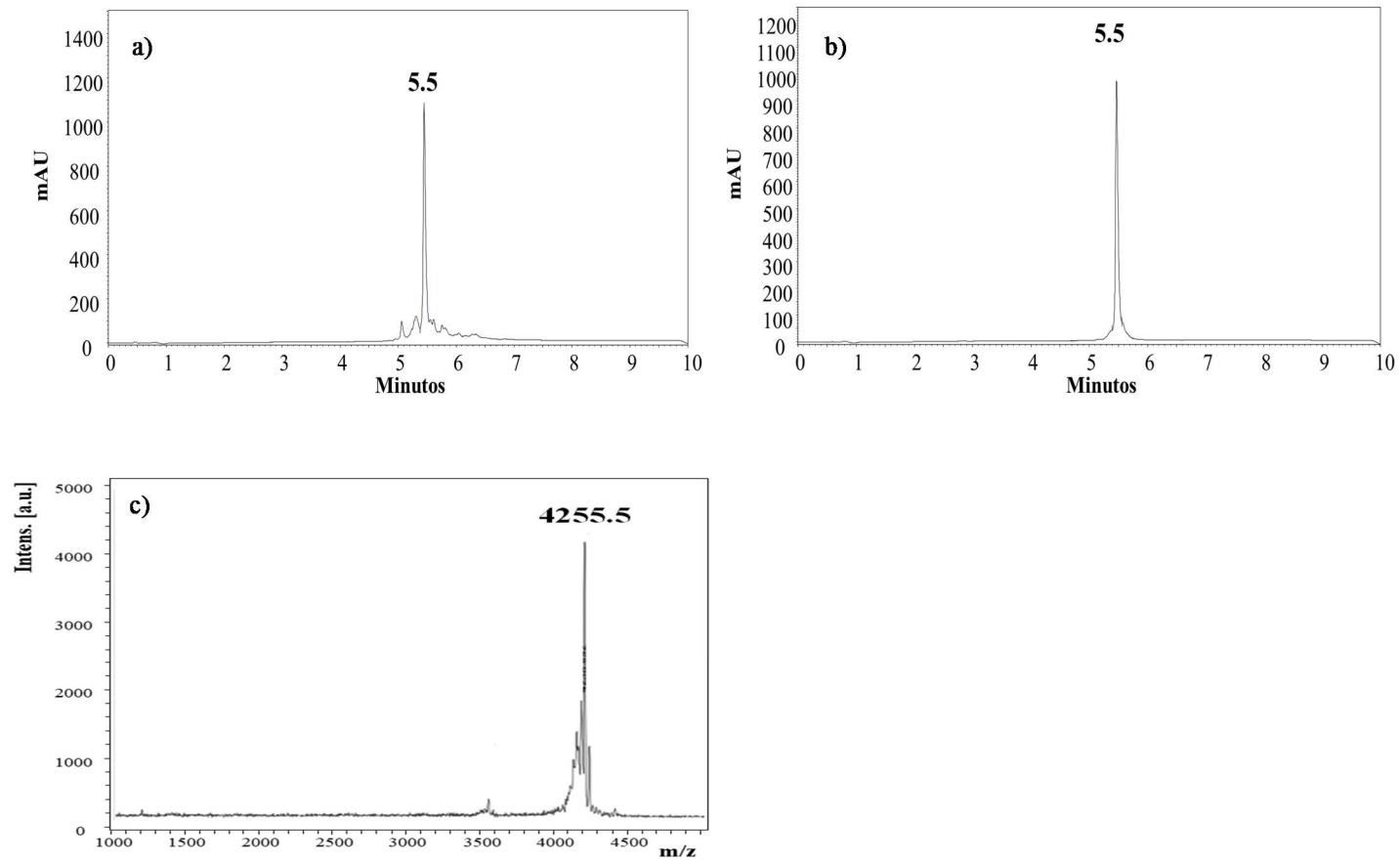
Purificación y caracterización del péptido lineal [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31), a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada, d) comportamiento del proceso de síntesis.

[Ala¹⁹]-LfcinB (17-31)₂ – (FKARRWQWRMKKLGA)₂KAhx



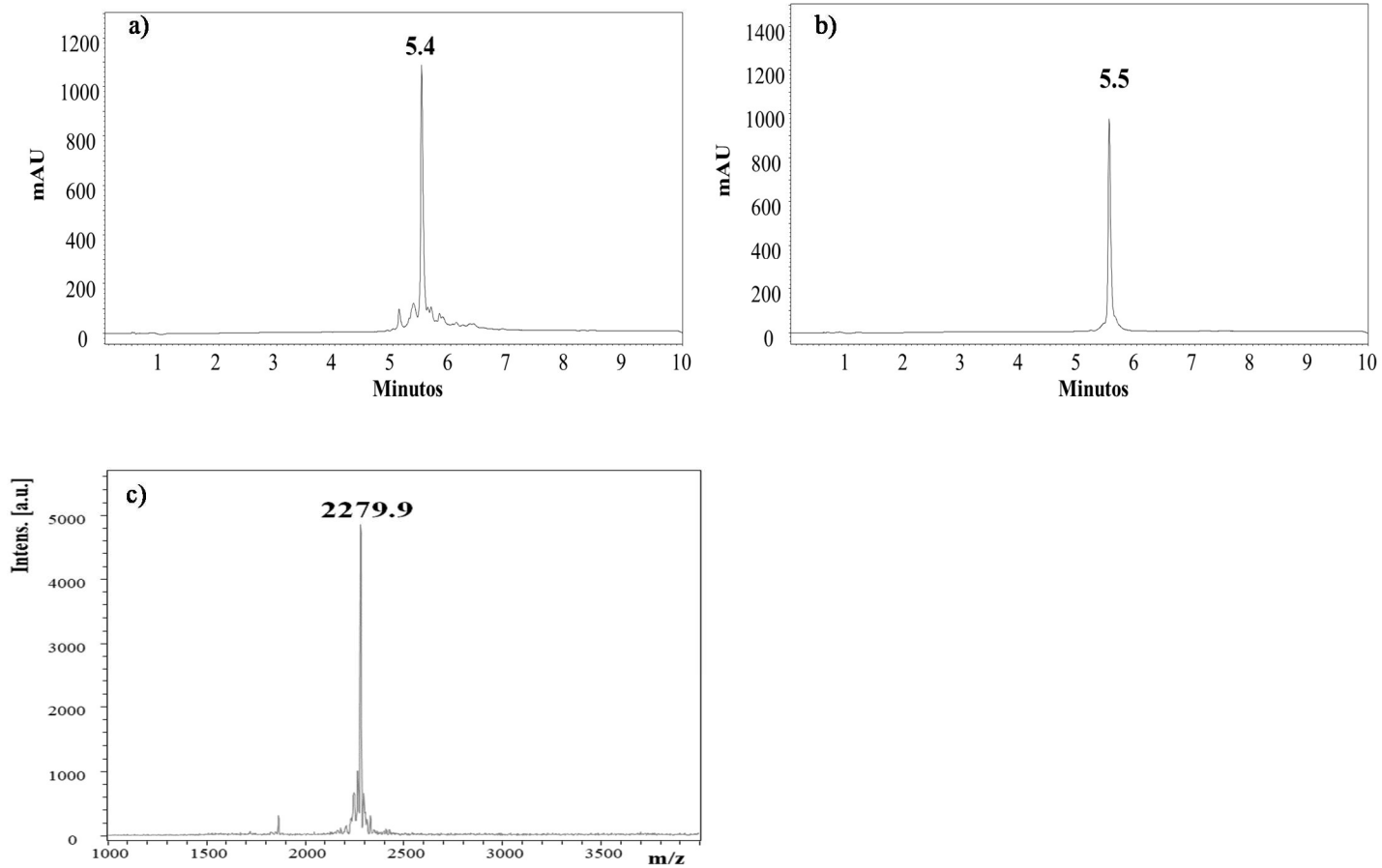
Purificación y caracterización del péptido dimérico [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31)₂, a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada.

[Ala¹⁹]-LfcinB (17-31)₄ - (FKARRWQWRMKKLG)₂KAhxC



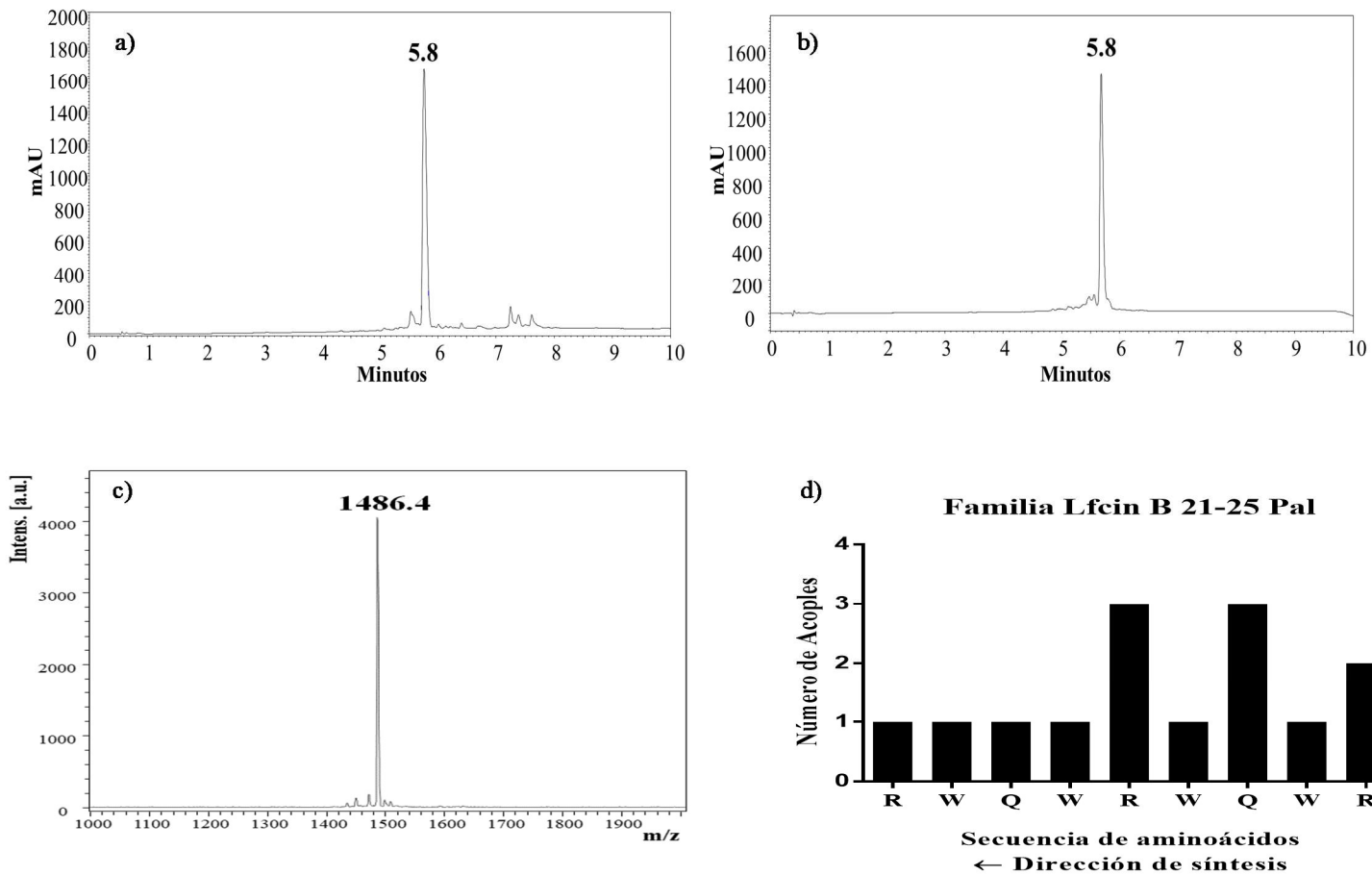
Purificación y caracterización del péptido tetramérico [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31)₄, a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada.

[Ala¹⁹]-LfcinB (17-31)_c- C-(FKARRWQWRMKKLGA)Ah_xC



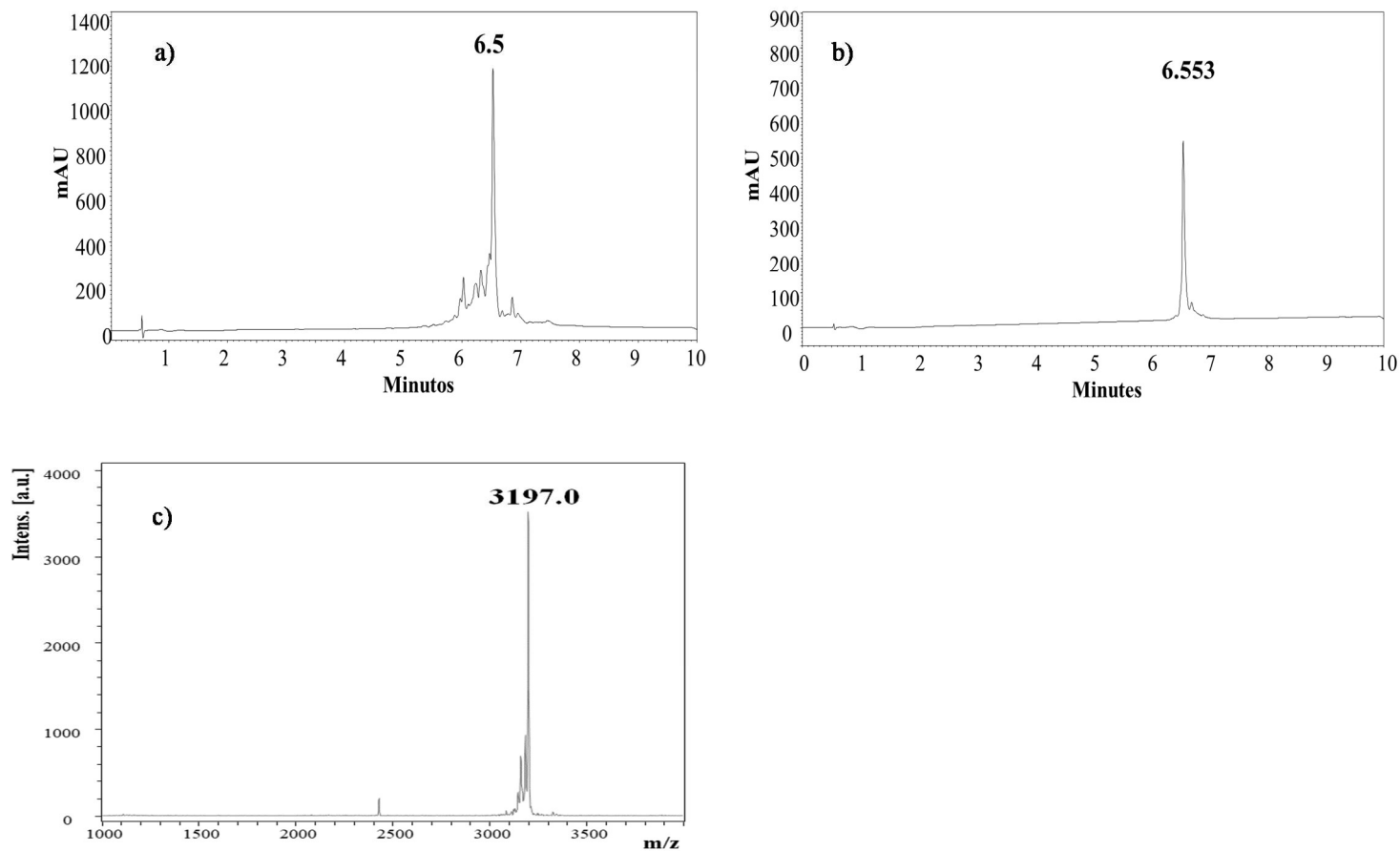
Purificación y caracterización del péptido cíclico [Ala¹⁹]-LfcinB (17-31)_c, a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada.

LfcinB (21-25)_{Pal} - RWQWRWQWR



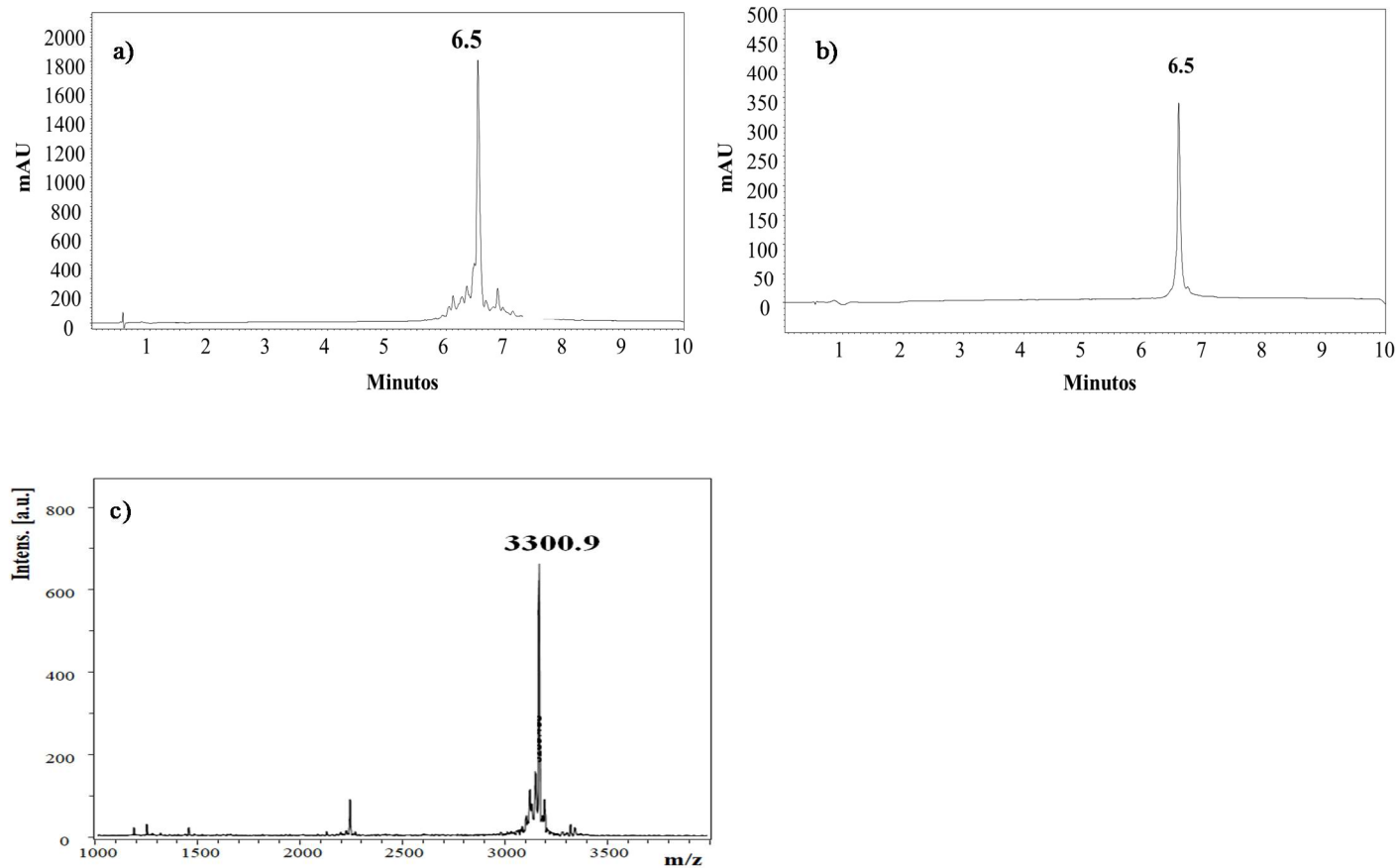
Purificación y caracterización del péptido lineal LfcinB (21-25)_{pal}, a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada, d) comportamiento del proceso de síntesis.

LfcinB (21-25)_{2Pal} - (RWQWRWQWR)₂KAhx



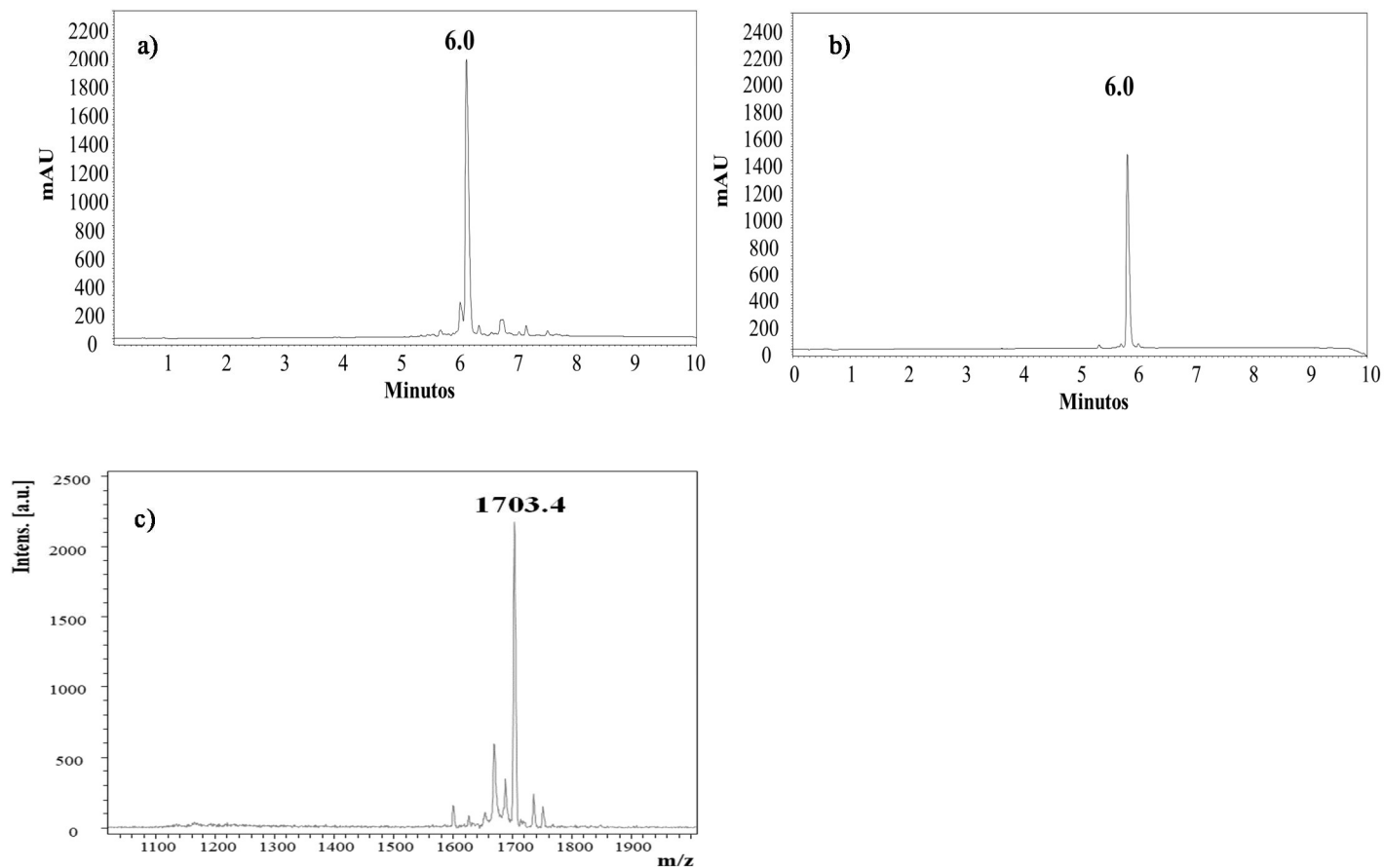
Purificación y caracterización del péptido dimérico LfcinB (21-25)_{2Pal}, a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada.

LfcinB (21-25)₄ Pal - (RWQWRWQWR)₂KAhxC



Purificación y caracterización del péptido tetramérico LfcinB (21-25)₄pal, a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada.

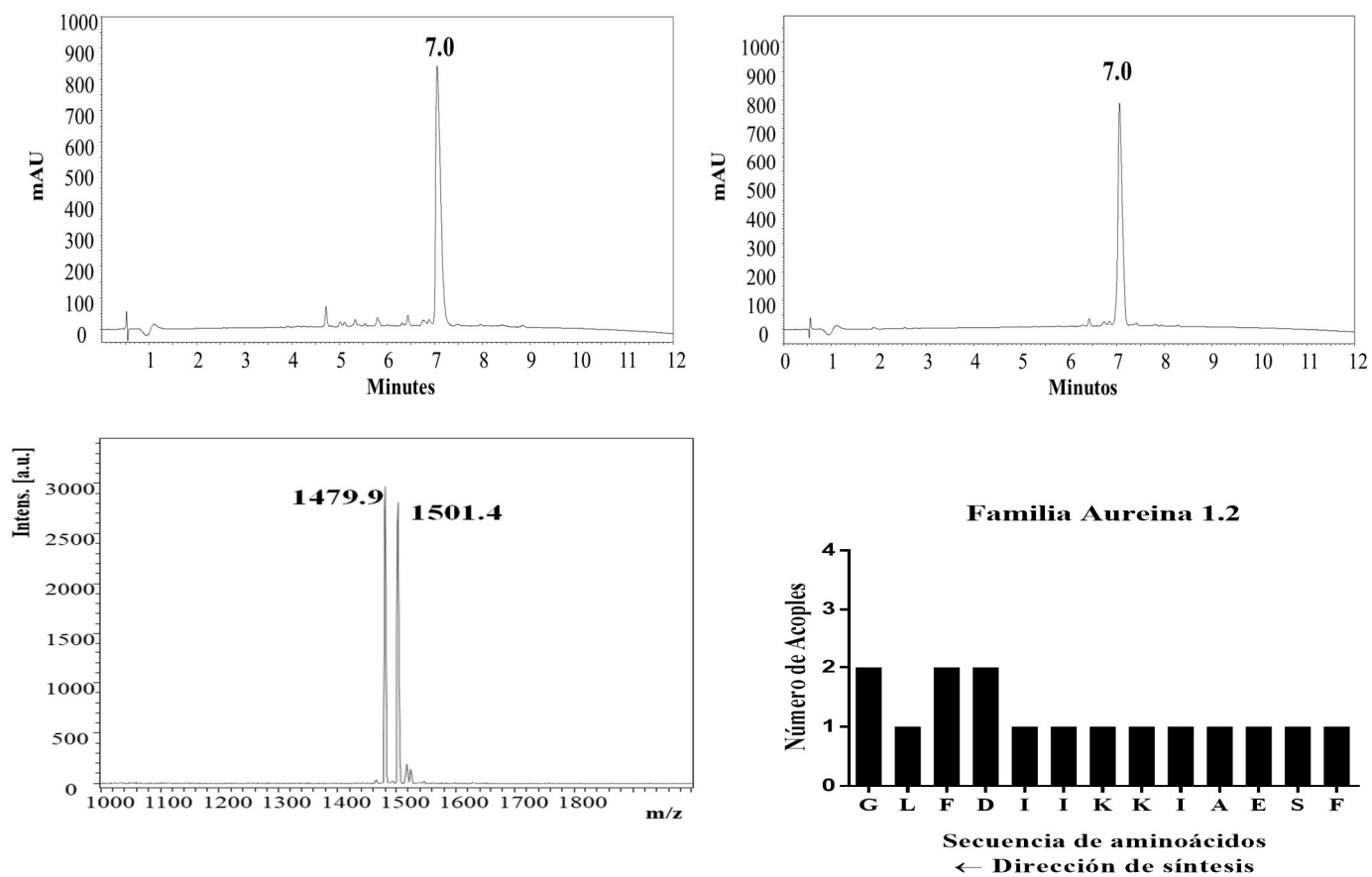
Lfcin B (21-25)₂LPal – (RWQWRWQWR)KAhxC



Purificación y caracterización del péptido dimérico lineal LfcinB (21-25)₂LPal, a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada.

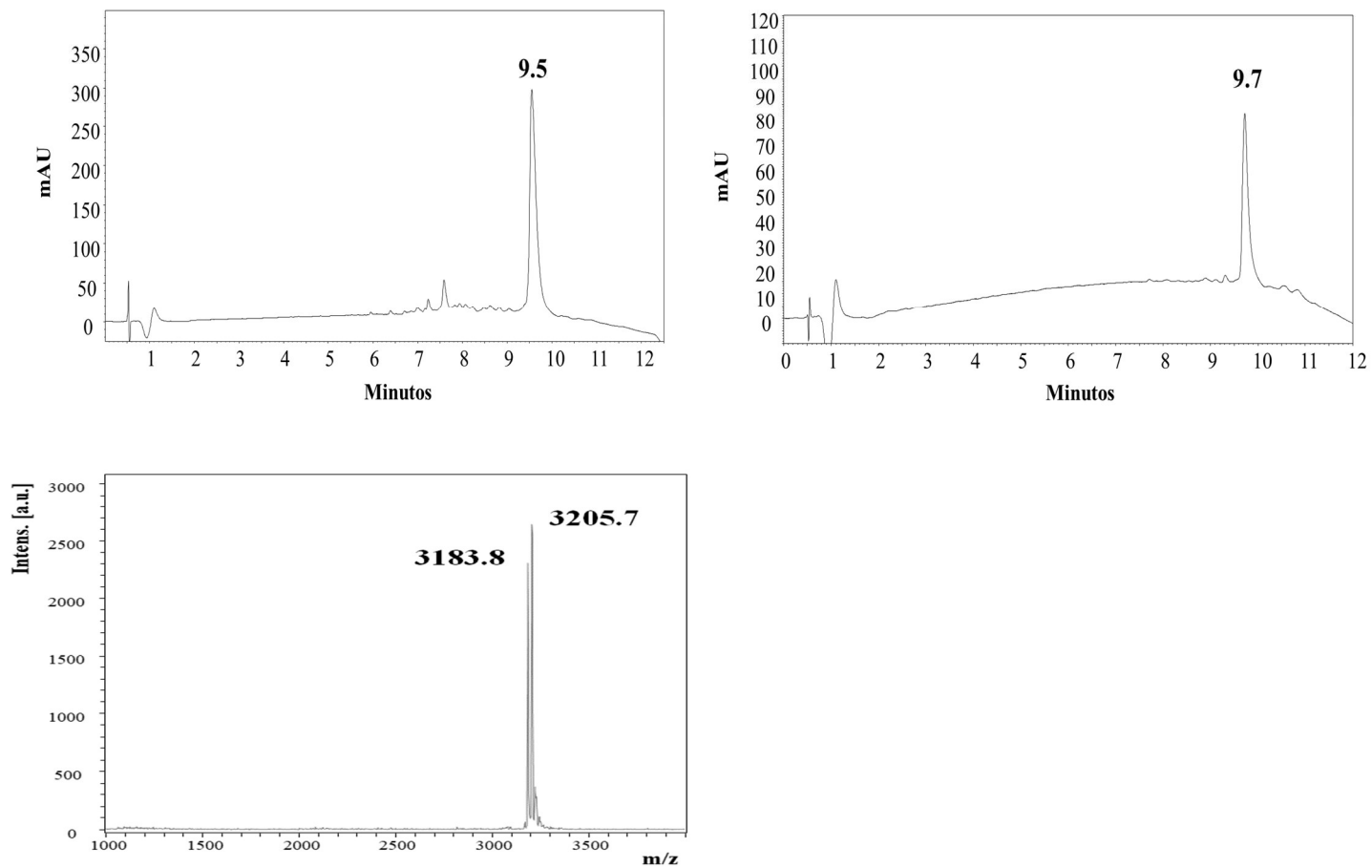
Anexo II. Purificación, Caracterización de péptidos derivados de la Aureina 1.2

Aureina 1.2 – GLFDIIKKIAESF



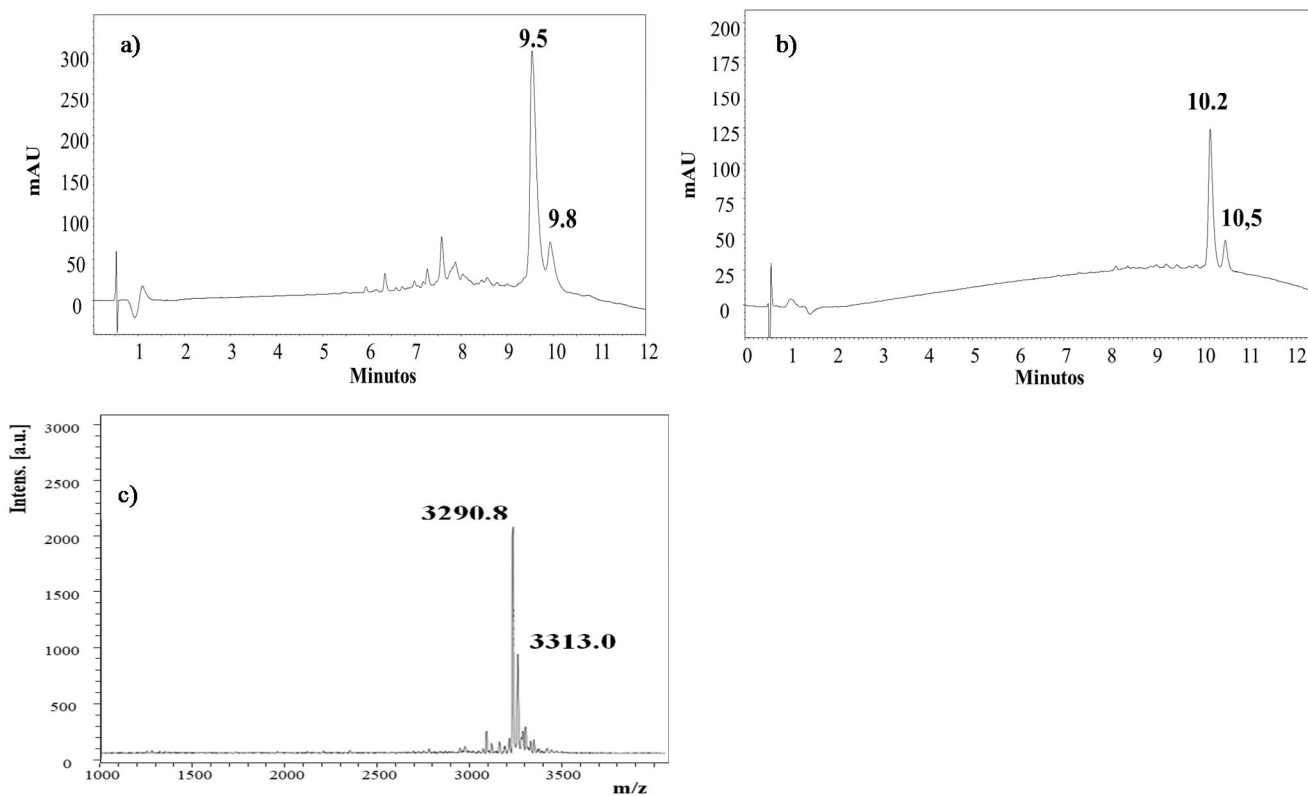
Purificación y caracterización del péptido lineal de Aureina 1.2, a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada, d) comportamiento del proceso de síntesis.

(Aureina 1.2)₂ - (GLFDIHKKIAESF)₂KAhx



Purificación y caracterización del péptido dimérico de Aureina 1.2, a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada.

(Aureina 1.2)₄ - (GLFDIIKKIAESF)₂KAh_xC



Purificación y caracterización del péptido tetamérico de Aureina 1.2, a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada.

(Aureina 1.2)_C C-(GLFDIHKKIAESF)Ah_xC

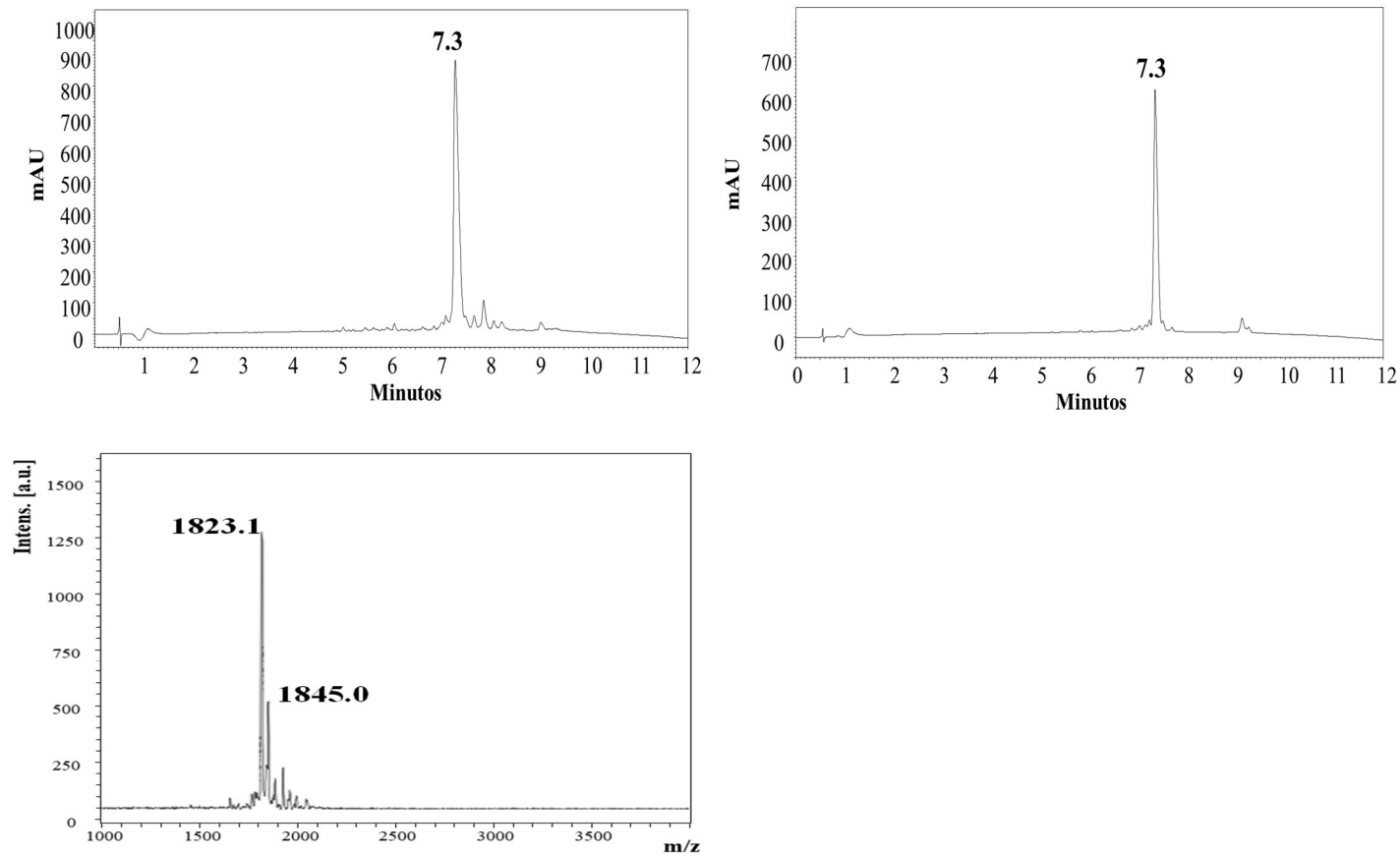
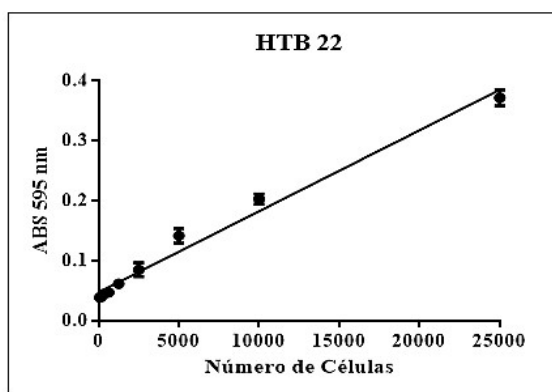
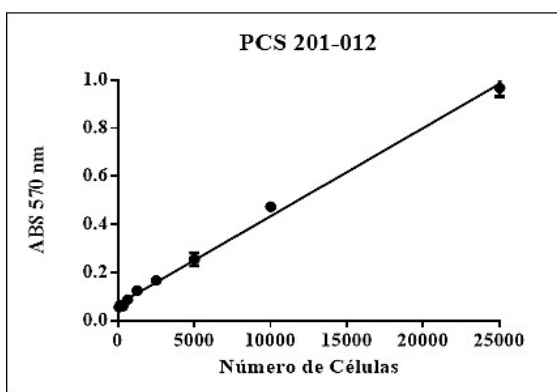
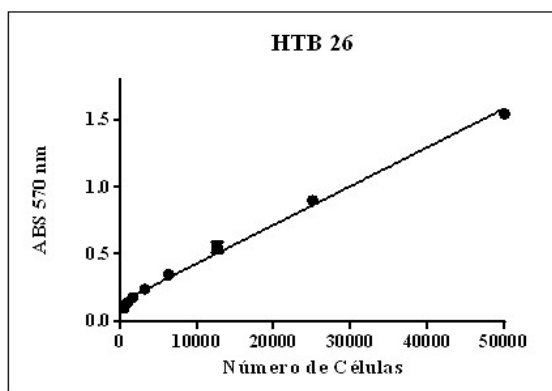
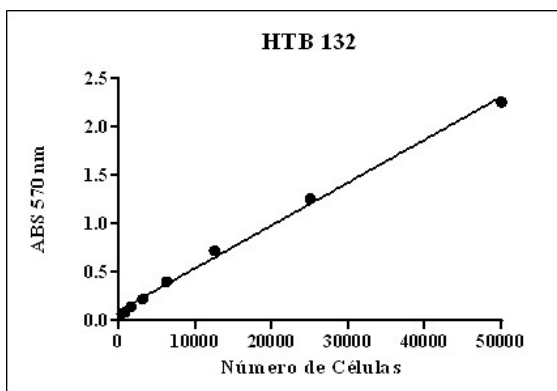


Figura 1 Purificación y caracterización del péptido cíclico de Aureina 1.2, a) Cromatograma especie cruda, b) cromatograma especie purificada, c) espectro de masas MALDI TOF de la especie purificada.

Comentarios Anexo II

La pureza cromatográfica de los péptidos de Aureina 1.2 en general fue superior al 90%, la excepción correspondió al péptido aureina en forma tetramérica (A1.2)₄ con un 65% (Anexo I, Figura 3 B y Tabla 2). En la caracterización por espectrometría de masas MALDI –TOF, los péptidos presentaron dos señales con similar intensidad para monómero y dímero, la primera correspondió a la señal del ion molecular del péptido $[M+H]^+$ y la segunda concordó con la señal correspondiente a la formación de un aducto entre el péptido y el ion sodio $[MH+23]^+$, este mismo fenómeno ocurrió con el tetrámero y el ciclo de la Aureina 1.2 siendo más intensa la señal del ion molecular respecto al del aducto con el ion sodio. La razón por la cual no se observa la masa correspondiente al tetrámero oxidado pero si a el de su precursor, radica en que en la técnica convencional MALDI-TOF los enlaces disulfuro son propensos a la degradación y ruptura, sin embargo se ha observado que realizando algunas modificaciones a las mezclas de las matrices en una relación adecuada, es posible llegar a detectar las moléculas involucradas en enlaces disulfuro [137].

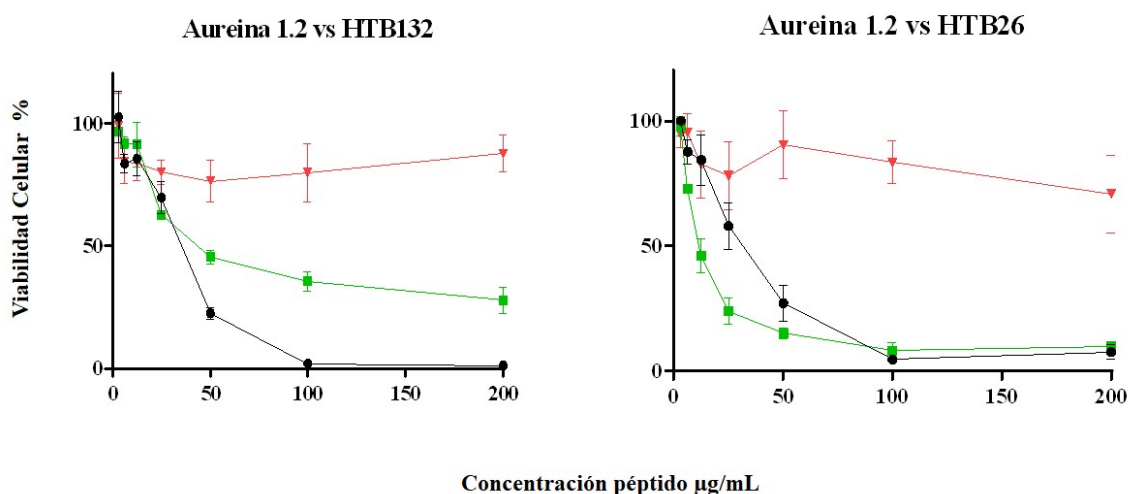
Anexo III. Curvas de calibración de las diferentes líneas celulares, ensayo por MTT



Curvas de calibración obtenidas para las diferentes líneas celulares utilizadas en este estudio HTB-132™, HTB-26™ y HBT-22™ corresponden a líneas de cáncer de mama, PCS 201-012 corresponde a la línea normal de fibroblastos \pm S.D. (n = 3).

Anexo IV. Efecto citotóxico de los péptidos derivados de la Aureina 1.2

Se evaluó el efecto citotóxico de los péptidos que contienen la secuencia de la Aureina 1.2 contra las líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama HTB-132TM y HTB-26TM. los ensayos se realizaron según lineamientos de la NCI para compuestos bioactivos[138].



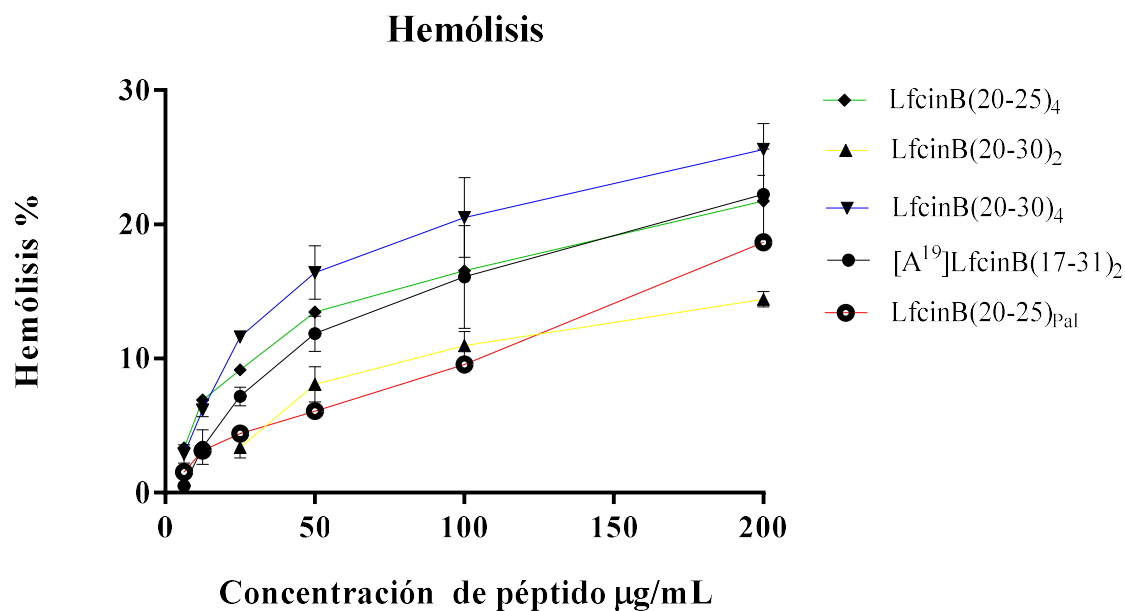
Viabilidad celular de las líneas HTB-132TM, HTB-26TM, frente a la familia de péptidos Aureina 1.2. Las barras de error corresponden a \pm S.D. (n = 3). ● Péptido monomérico; ■ péptido dimérico y ▼ péptido cíclico. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la línea celular HTB-132TM a 50µg/mL entre el péptido lineal y los demás diseños, en la línea HTB-26TM esta diferencia también se observa a 50µg/mL para el péptido cíclico y los demás péptidos, siendo el péptido dimérico el que presenta la mayor actividad (ANOVA, Post hoc Bonferroni, $p < 0.05$).

Los resultados muestran que el péptido monomérico y dimérico derivados de la Aureina 1.2 presentaron el mayor efecto citotóxico a 100 µg/mL en las dos líneas celulares evaluadas y se mantuvo hasta 200 µg/mL. El péptido dimérico derivado de la Aureina 1.2 presentó el mayor efecto citotóxico en la línea HTB-26TM. El péptido tetramérico no fue evaluado ya que la pureza cromatográfica fue tan solo del 65 %, estando por debajo del umbral preestablecido del 85% para la realización de los ensayos *in-vitro*. El péptido cíclico no presentó efecto citotóxico significativo en las dos líneas celulares. El efecto citotóxico de los péptidos se incrementó a medida que aumento la concentración, indicando que el efecto citotóxico fue dependiente de la concentración.

El efecto citotóxico de los péptidos derivados de la Aureina 1.2 contra líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama confirma que este péptido con actividad antimicrobiana también presenta actividad anticancerígena. Los resultados muestran que la viabilidad celular decrece significativamente cuando las células fueron tratadas con la Aureina 1.2 monomérica, la mínima viabilidad celular con este péptido para la línea celular HTB-132™ fue de 2% a una concentración de 100 µg/mL y el IC₅₀ correspondió a 32 µg/mL (22 µM), mientras que para la línea celular HTB-26™ la mínima viabilidad celular fue de 7% a 100µg/mL con un IC₅₀ de 29 µg/mL (20 µM). Estos resultados están de acuerdo con los estudios de actividad anticancerígena de la Aureina 1.2, realizados en el Instituto Nacional de Cáncer de E.E.U.U, donde se evaluó el péptido monomérico de la Aureina 1.2 contra 60 líneas celulares tumorales de diferentes tipos de cáncer, encontrándose las líneas celulares HTB-132™, HTB-26™ y MCF7. En este estudio se muestra que la Aureina 1.2 presentó actividad anticancerígena contra las líneas de cáncer de mama evaluadas, concordando con los valores reportados de IC₅₀ de 10⁻⁴-10⁻⁵ M (15-150 µg/mL) [48].

El péptido dimérico (Aureina 1.2)₂ presentó mayor efecto citotóxico en la línea HTB-26™ que el péptido monomérico, sugiriendo que la polivalencia de la secuencia incrementó el efecto citotóxico contra las líneas celulares evaluadas. Este comportamiento concuerda con los resultados previos donde se reporta que péptidos diméricos y tetraméricos derivados de la LfcinB presentan mayor efecto citotóxico contra células OCSS que los péptidos monoméricos[66]. Sin embargo este resultado contrasta con estudios que demuestran que la dimerización de la Aureina 1.2 disminuyó la actividad antifúngica respecto al péptido lineal [139], sin embargo hay que tener en cuenta la diferencia que existe entre las membranas de hongos y células cancerosas, ya que otros autores demuestran las ventajas que presentan ciertos péptidos antimicrobianos al ser presentados en formas polivalente[140], este contraste indica que aún hace falta investigación que abarque este campo y esclarezca con claridad el porqué de esta dualidad.

Anexo V. Curvas de hemólisis de los péptidos con mayor actividad

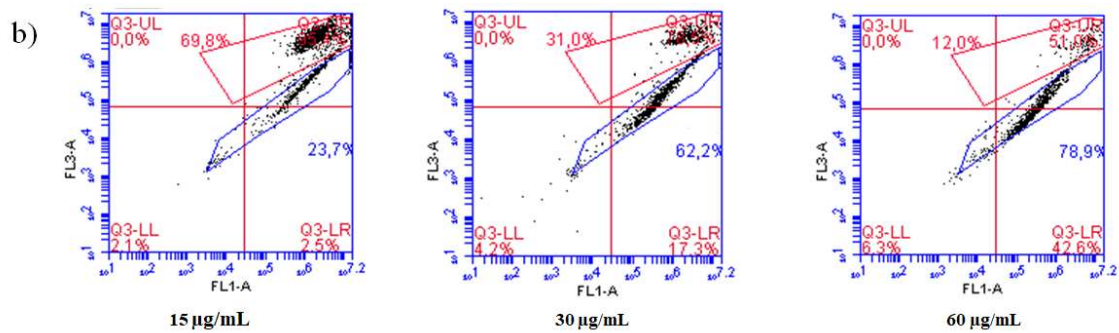


Curvas de hemólisis de los péptidos con actividad citotóxica significativa contra líneas celulares de cáncer de mama.

La actividad hemolítica fue calculada mediante el software GraphPad por interpolación de los valores IC50max y linealización por logaritmos (Tabla 5), se puede observar en la gráfica que el comportamiento es muy similar en todos los péptidos y el mayor porcentaje de hemólisis fue de un 27%. A una concentración de 200 µg/mL para el péptido LfcinB (20-30)₄

Anexo VI. Afectación de la membrana citoplasmática por el péptido LfcinB (20-25)₄

En las gráficas se puede observar como a medida que aumenta la concentración de péptido en los tratamientos a población de células doblemente marcadas IP7SYTO9 (caja de color rojo) disminuye, mientras que las células con membrana no comprometida o marcadas con únicamente SYTO 9 aumenta (cajas de color azul).



Plots representativos del efecto citotóxico evaluado por citometría de flujo con IP/ SYTO9 a diferentes concentraciones, las cajas de color azul representan a células marcadas con SYTO9 (células integra) cajas de color rojo corresponden a células doblemente marcadas con IP/SYTO9 (células con membrana comprometida).

