



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la actividad anticancerígena de péptidos derivados de lactoferricina bovina como candidatos para el tratamiento de cáncer oral

Diana Alexandra Martínez Baquero

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2019

Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la actividad anticancerígena de péptidos derivados de lactoferricina bovina como candidatos para el tratamiento de cáncer oral

Diana Alexandra Martínez Baquero

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Doctora en Ciencias Farmacéuticas

Director:

Prof. Dr. Jaiver Eduardo Rosas Pérez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2019

A mi madre

“Defiende tu derecho a pensar, porque incluso pensar de manera errónea es mejor que no pensar”

Hipatia de Alejandría

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, *alma máter* de mi formación académica profesional. Al profesor Dr. Jaiver Rosas, director de este proyecto de tesis, quien con sus invaluable enseñanzas aportó a mi crecimiento académico y personal. Al Departamento de Farmacia por la disponibilidad de las instalaciones y los equipos de uso común necesarios durante la ejecución de este proyecto. A los profesores Dra. Zully Rivera y Dr. Javier García por ser los mentores en la síntesis de péptidos durante mi formación de pre y posgrado. A la investigadora Dra. Sandra Vega por sus enseñanzas durante el trabajo con cultivos celulares, cultivos bacterianos y técnicas para la evaluación de la actividad biológica. A la Dra. Paola Barato M.V. por su invaluable participación en la ejecución de los ensayos *in vivo*. A la Dra. Fanny Guzmán y su grupo de investigación en síntesis de péptidos de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso por sus incalculables enseñanzas en el área de síntesis de péptidos durante la pasantía. A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) por la asesoría y disponibilidad de equipos y reactivos para llevar a cabo los diferentes ensayos bioquímicos. A mi compañera Estefanía Marín por su apoyo durante la ejecución de diferentes ensayos y participación activa dentro del grupo de investigación.

Al Programa Nacional de Ciencia y Tecnología de la salud de COLCIENCIAS, convocatoria 657-2014, por la financiación del proyecto: Diseño, síntesis química y caracterización de péptidos derivados de lactoferricina y evaluación de su actividad anticancerígena. Fase II - 110165843141 contrato 678-2014. A la Fundación Ceiba y su programa de becas Rodolfo Llinás para la promoción de la formación avanzada y el espíritu científico en Bogotá.

Resumen

El cáncer oral es reconocido por tener bajos porcentajes de supervivencia, si se compara con los cánceres localizados en otros órganos. El difícil acceso de los pacientes a un profesional de la salud especializado, conlleva a diagnósticos en etapas avanzadas de la enfermedad. En el presente trabajo se propuso el diseño, la síntesis y la evaluación de péptidos derivados de lactoferricina bovina (LfcinB) en el desarrollo de tratamientos anticancerígenos de CECO. *Metodología:* Se sintetizaron 14 péptidos derivados de LfcinB mediante SPPS, estrategia Fmoc/tBu, la caracterización y purificación se realizó mediante RP-HPLC y MALDI-TOF MS. La evaluación del efecto citotóxico *in vitro* frente a líneas celulares de CECO humanas (ATCC: FaDu y SCC9) y queratinocitos normales (ATCC HEK001) se determinó mediante la reducción enzimática de resazurina. Para determinar las características de la interacción péptido-célula, se analizaron las imágenes por microscopía electrónica (SEM) y la internalización del péptido mediante citometría de flujo. El péptido con mayor efecto citotóxico selectivo, se evaluó en el modelo animal de CECO inducido químicamente con DMBA. *Resultados:* Ninguno de los péptidos lineales evaluados redujo efectivamente la viabilidad celular de las líneas tumorogénicas; sin embargo, las formas polivalentes diseñadas a partir de la secuencia RRWQWR afectaron la viabilidad celular. El tetrámero LfcinB[20-25]₄ presentó una CI_{50} de $7,3 \pm 0,26 \mu M$ frente a la línea celular más sensible, FaDu, afectando de forma proporcional la viabilidad celular de los queratinocitos normales (baja selectividad). El dímero LfcinB[20-25]₂ es internalizado por las células FaDu y causa lesiones importantes en la morfología de la membrana celular. Dicho péptido inhibió de manera significativa el crecimiento de tumores en el modelo de CECO en hámster, comparado con el crecimiento de los tumores tratados con SSN ($p=0,067$), medio de disolución de los péptidos. *Conclusiones:* el dímero LfcinB[20-25]₂ tiene un efecto citotóxico y antiproliferativo causando daños en la membrana celular dada la internalización en células de CECO

Palabras clave: Cáncer oral, lactoferricina bovina, péptidos sintéticos, CECO.

Abstract

Oral cancer is recognized to have one of the poorest prognoses, compared to this disease in other organs. Patients with difficult access to specialized health care are likely to be diagnosed too late. In the looking for the improvement of the treatments for oral cancer, this work was aimed to design, synthesize and evaluate different synthetic bovine lactoferricin (bLfcin) peptides as potential anticancer treatment. *Methods:* 14 bLfcin derived peptides were synthesized using SPPS Fmoc/tBu strategy. Characterization was made by RP-HPLC and MALDI-TOF MS. The *in vitro* evaluation of cytotoxic effect against human OSCC cell lines (ATCC: FaDu and SCC9) and normal keratinocytes (ATCC HEK001) was attempted by resazurin methods. To determine the main features of the peptide-cell interaction, electronic microscopy (SEM) and flow cytometry were assayed. Finally, the peptide which showed the most selective cytotoxic effect *in vitro*, was evaluated for antitumoral effect on an DMBA-induced hamster buccal pouch carcinoma. *Results:* None of the linear peptides showed cytotoxic activity against the cell lines evaluated; nevertheless, polyvalent forms designed from the core RRWQWR had the ability to reduce cell viability. Tetrameric peptide LfcinB[20-25]₄ had an IC₅₀ of 7,3 ± 0,26 µM for FaDu cells (most sensible to peptides' cytotoxicity) but this peptide also diminished the viability of normal keratinocytes (low selectivity). Dimer LfcinB[20-25]₂ was chosen to furthest investigation. It is internalized by FaDu cells and causes several lesions on its membrane. Finally, this dimer significantly inhibited the tumor growth on the *in vivo* model, compared to those tumors with no treatment (p=0,067). *Conclusions:* dimer LfcinB[20-25]₂ exerts cytotoxic and anti-proliferative effects causing several damage and internalization in oral carcinogenic cells.

Keywords: Oral cancer, synthetic peptides, bovine lactoferricin, OSCC.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Abstract	X
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVI
Introducción	1
Objetivos	5
1. Diseño, síntesis y caracterización de péptidos	7
1.1 Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)	12
1.1.1 Remoción del grupo protector Fmoc	12
1.1.2 Activación del Fmoc-aminoácido y acople.....	13
1.1.3 Reacción de monitoreo (test de Kaiser)	13
1.1.4 Escisión del péptido de la resina y desprotección de cadenas laterales	14
1.1.5 Formación de puente disulfuro	16
1.2 Caracterización de péptidos.....	16
1.2.1 RP-HPLC	17
1.2.2 Caracterización por MALDI-TOF MS	19
2. Determinación de la actividad citotóxica en líneas celulares humanas de CECO	21
2.1 Líneas celulares derivadas de CECO humano.....	22
2.1.1 Descongelación.....	23
2.1.2 Subcultivo	24
2.1.3 Criopreservación	25
2.2 Implementación del ensayo de viabilidad celular con resazurina	25
2.3 Evaluación de la actividad citotóxica.....	28
2.4 Permeabilidad celular - Citometría de flujo.....	35
2.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	37
3. Implementación de modelo de carcinoma oral inducido en Hámster	39
3.1 Inducción del carcinoma (CECO).....	41
3.2 Eutanasia y autopsia exploratoria	43

3.3	Análisis histopatológico	44
3.4	Inducción de CECO en hámster inmunosuprimido	48
4.	Evaluación de la actividad anticancerígena de LfcinB[20-25]₂ en modelo animal	55
5.	Conclusiones y recomendaciones	65
5.1	Conclusiones.....	65
5.2	Recomendaciones.....	66
A.	Anexo: Caracterización de péptidos derivados de LfcinB.....	67
B.	Anexo: Participación en eventos y producción académica.....	75
	Bibliografía	76

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Péptidos polivalentes derivados de Lactoferricina bovina (LfcinB)	11
Figura 1-1-4: Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) – Estrategia Fmoc/tBu	15
Figura 1-1-5: Monitoreo por HPLC de la formación del puente disulfuro	16
Figura 1-2-1: Cromatograma del péptido LfcinB[17-25] crudo y purificado	18
Figura 2-1: Microfotografías de las líneas celulares en cultivo	23
Figura 2-2: Mantenimiento y expansión de cultivo celular	23
Figura 2-2-1: Reducción enzimática de resazurina	26
Figura 2-2-2: Diseño de placa de 96 pozos para la determinación de las variables implicadas en el ensayo de viabilidad celular con resazurina	27
Figura 2-3-1: Mapa para la adición de solución de péptidos	29
Figura 2-3-2: Actividad citotóxica de los péptidos lineales derivados de LfcinB[17-31]	30
Figura 2-3-3: Microfotografías de línea celular FaDu después de 2 h de tratamiento con los péptidos derivados de LfcinB[17-31]	31
Figura 2-3-4: % viabilidad celular después del tratamiento por 2 h con péptidos polivalentes derivados de LfcinB[20-25]	32
Figura 2-3-5: Actividad citotóxica de los péptidos polivalentes a 2, 6 y 24 h de tratamiento	34

	Pág.
Figura 2-4-1: Permeabilidad celular – Citometría de flujo	36
Figura 2-5-1: SEM de células tumorales FaDu	38
Figura 3-1-1: Peso de los animales hasta las 12 semanas de exposición al DMBA	42
Figura 3-2-1: Esquema propuesto para el sacrificio de los animales expuestos DMBA	43
Figura 3-3-1: Mucosa del abazón expuesto a DMBA (12 semanas)	44
Figura 3-3-2: Tumor exofítico en individuo expuesto a DMBA-DEX (16 semanas)	47
Figura 3-4-1: Peso de los animales hasta 15 semanas de exposición a DMBA-DEX	48
Figura 3-4-2: Progresión macroscópica y microscópica de las lesiones por exposición a DMBA-DEX	51
Figura 3-4-3: Desarrollo de perlas de queratina, lesión indicadora de carcinoma	52
Figura 4-1: Peso de los animales que desarrollaron CECO con tratamiento	57
Figura 4-2: Imágenes del abazón tratado y no tratado de cada uno de los animales que desarrollaron CECO, los cuales fueron sometidos al efecto del péptido y la SSN	58
Figura 4-3: Razón de cambio del volumen de tumor para cada tratamiento	60
Figura 4-4: Evaluación histológica de los tumores tratados con LfcinB[20-25] ₂ , LfcinB[20-25] ₂ en micropartículas de PLGA y SSN	62

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Diseño de péptidos monoméricos derivados de Lactoferricina bovina (LfcinB).	10
Tabla 1-2-1: Caracterización por RP-HPLC de los péptidos sintetizados	18
Tabla 2-2-1: Condiciones determinadas para la evaluación citotóxica con RSZ	25
Tabla 2-3-1: CI_{50} para los péptidos polivalentes diseñados a partir de RRWQWR	31

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad	Definición
<i>DC</i>	Densidad celular	$\frac{\# \text{ cels.}}{mL}$	Ec. 2-1-1
<i>%RC</i>	% Rendimiento crudo	%	Ec. 1-1-4
<i>RCt</i>	Razón de cambio de vol. de tumor	-	Ec. 4-1
<i>V</i>	Volumen del tumor	mm ³	Ver 3.1
<i>% VC_s</i>	% Viabilidad celular	%	Ec. 2-3-1

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI
α	Nivel de significancia	-
λ	Longitud de onda	nm

Subíndices

Subíndice	Término
Pal	Secuencia palíndroma
n	Elemento infinito n

Superíndices

Superíndice	Término
n	Exponente, potencia

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>A</i>	Ala-Alanina
<i>a.a</i>	Aminoácido
<i>ACN</i>	Acetonitrilo
<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>ATCC</i>	American Type Culture Collection
<i>C</i>	Cys-Cisteína
<i>CECO</i>	Carcinoma escamocelular de la cavidad oral

Abreviatura	Término
<i>CI50</i>	Concentración inhibitoria 50
<i>CMI</i>	Concentración mínima inhibitoria
<i>DCC</i>	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
<i>DCM</i>	Diclorometano
<i>DEX</i>	Dexametasona
<i>DIEA</i>	Diisopropiletilamina
<i>DMBA</i>	7,12-Dimetilbenzilantraceno
<i>DMEM</i>	Dulbecco modified Eagle's medium
<i>DMF</i>	Dimetilformamida
<i>DMSO</i>	Dimetilsulfóxido
<i>DOXO</i>	Doxorrubicina
<i>EDT</i>	Etanoditiol
<i>EDTA</i>	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>F</i>	Phe-Fenilalanina
<i>FMNH</i>	Flavin mononucleótido
<i>Fmoc</i>	9-Fluorenilmetiloxycarbonilo
<i>G</i>	Gly-Glicina
<i>G.P.</i>	Grupo protector
<i>H</i>	His-Histidina
<i>hEGF</i>	Factor de crecimiento epidermal humano
<i>HEPES</i>	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
<i>HOBt</i>	1-Hidroxibenzotriazol
<i>HPLC</i>	Cromatografía líquida de alta eficiencia (high proficiency liquid chromatography)
<i>I</i>	Ile-Isoleucina
<i>IPA</i>	Alcohol isopropílico
<i>K</i>	Lys-Lisina
<i>KGM</i>	Medio de crecimiento para queratinocitos (keratinocyte growth medium)
<i>L</i>	Leu-Leucina
<i>Lfcin</i>	Lactoferricina
<i>Lfn</i>	Lactoferrina
<i>M</i>	Met-Metionina
<i>MALDI</i>	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
<i>MAP</i>	Mitogen-activated protein
<i>MTT</i>	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<i>NADH</i>	dinucleótido de nicotinamida y adenina
<i>NADPH</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<i>NNN</i>	Nitrosornicotina
<i>PAM</i>	Péptidos antimicrobianos
<i>pbf</i>	2,2,4,6,7-Pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
<i>PBS</i>	Solución de buffer fosfato
<i>PLGA</i>	Ácido poli(lactic-co-glicólico)
<i>PM</i>	Peso molecular
<i>Q</i>	Gln-Glutamina
<i>R</i>	Arg-Arginina
<i>ROS</i>	Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)
<i>RP</i>	Fase reversa (reversed phase)
<i>RPMI</i>	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
<i>RSZ</i>	Resazurina

Abreviatura Término

<i>S</i>	Ser-Serina
<i>SEM</i>	Microscopía electrónica de barrido (scanning electron microscopy)
<i>S.E.M.</i>	Error estándar de la media (standard error of the mean)
<i>SFB</i>	Suero fetal bovino
<i>SPE</i>	Extracción en fase sólida (solid phase extraction)
<i>SPPS</i>	Síntesis en fase sólida de péptidos (solid phase peptide synthesis)
<i>SSN</i>	Solución salina normal NaCl 0,9%
<i>T</i>	Thr-Treonina
<i>TBTU</i>	O-Benzotriazol-1-yl-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato
<i>tBu</i>	t-Butilo
<i>TFA</i>	Ácido trifluoroacético
<i>TFE</i>	Tetrafluoroetileno
<i>TIPS</i>	Triisopropilsilano
<i>TOF</i>	Tiempo de vuelo (time of flight)
<i>USP</i>	United States Pharmacopeia
<i>V</i>	Val-Valina
<i>W</i>	Trp-Triptófano

Introducción

El cáncer de la cavidad oral aporta el 2,1% del total de casos de cáncer que se presentan a nivel mundial cada año, y a pesar de que no es uno de los tipos de cáncer más predominantes, la tasa de supervivencia es baja (1,2) debido a que en grados avanzados, el carcinoma oral puede invadir los nódulos linfáticos de cabeza y cuello, desencadenando en metástasis hacia órganos vitales como los pulmones o el cerebro (3). El acceso de la población al sistema de salud, así como la experticia de los profesionales, juegan un papel muy importante para que la detección del carcinoma se realice en etapas tempranas (4–6). Es por esto, que en Colombia la tasa de supervivencia del 30% se considera baja, si se compara con países con alto desarrollo económico y sistemas de salud robustos, donde la tasa de sobrevivencia se estima alrededor de 50% (7). La detección y el tratamiento oportuno de las lesiones cancerígenas pueden aumentar los índices de sobrevivencia.

El tratamiento del carcinoma escamocelular de la cavidad oral (CECO) requiere de la participación de un grupo interdisciplinario que evalúe las características histológicas de la lesión, la severidad de cada caso, el potencial invasivo de las células carcinogénicas, las características del área afectada, entre otros factores que determinen el tratamiento a seguir (5,8–11). En la mayoría de casos, la resección de la región afectada (12) y el control de las células remanentes mediante radioterapia, corresponden al esquema de tratamiento en este tipo de cáncer (13). Sin embargo, la cirugía tiene implicaciones estéticas que afectan el bienestar psicológico de cada paciente; además de ello, funciones como el habla o la deglución se ven seriamente afectadas. Así mismo, la xerostomía que se presenta como efecto adverso a la radioterapia, aumenta las tasas de mortalidad y también produce deserción al tratamiento oncológico; incluso las infecciones oportunistas, generalmente causadas por *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp*, y *Candida spp*, afectan severamente el estado inmunológico del paciente (14,15). Las combinaciones de radioterapia y quimioterapia han resultado ser efectivas especialmente cuando el objetivo terapéutico es paliativo. Los agentes quimioterapéuticos usados para el tratamiento de

lesiones en cabeza y cuello son principalmente el 5-fluorouracilo y el cisplatino (13,16). Sin embargo, esta estrategia afecta la replicación del ADN de la lámina basal de los tejidos conectivos, lo cual desencadena en mucositis severa con exposición de los vasos sanguíneos y del tejido epitelial, además de ello la condición inmunodeficiente del paciente es un factor de alto riesgo para las infecciones oportunistas severas. Se estima que el 40% de los pacientes sometidos a quimioterapia contraen la mucositis como efecto adverso, pero en los casos de alto riesgo como es el tratamiento de tumores de cabeza y cuello, la probabilidad de mucositis aumenta al 60% (17). Recientemente, el cetuximab, anticuerpo monoclonal inhibidor del factor de crecimiento epidermal, ha sido incluido en las terapias de pacientes con carcinoma recurrente o metástasis, aumentándose la tasa de supervivencia. No obstante, se han presentado mayores incidencias de *rash*, prurito, reacciones dermatológicas a la infusión, neutropenia e hipomagnesemia en los pacientes que recibieron terapia co-adyuvante con cetuximab (18).

Las moléculas peptídicas han sido ampliamente evaluadas como alternativa para el tratamiento del cáncer. Dada su versatilidad, pueden actuar como tratamientos citotóxicos, tratamientos inmunogénicos gracias a la identificación de antígenos específicos de diferentes tumores (19), “*carriers*” de moléculas con actividad citotóxica conocida sumado a la ventaja de ofrecer especificidad en el sistema de entrega, vacunas que eviten el desarrollo recurrente de neoplasias, entre otros (20–22). Los péptidos corresponden a la unión de dos o más aminoácidos mediante enlaces peptídicos, los cuales corresponden a enlaces tipo amida; dichas secuencias no superan los 100 residuos de a.a. Su relativo pequeño tamaño molecular, la posibilidad de obtener diferentes secuencias mediante síntesis química, la posibilidad de algunos péptidos de atravesar membranas y barreras biológicas llegando a tejidos de difícil acceso, la baja posibilidad de presentar interacciones medicamentosas, una menor inmunogenicidad en comparación a los anticuerpos monoclonales y las proteínas de gran tamaño y la baja acumulación en riñones, hígado u otros órganos involucrados en el metabolismo, hacen que los péptidos sean de gran interés como agentes anticancerígenos. A la fecha, péptidos como el leuprolide, histrelina, goserelina, dactinomicina, entre otros, son utilizados en la práctica clínica para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (20,23,24). Para el tratamiento de cáncer oral algunas de estas moléculas han sido evaluadas, por ejemplo el tetrapéptido VWCS redujo la viabilidad de la línea celular KB (ATCC CCL-17) mediante apoptosis por activación de las caspasas 3 y 7 (25). De otra parte, péptidos antimicrobianos (PAM) como la pardaxina,

el péptido BmKn2 obtenido del veneno de escorpión y péptidos derivados de la catelicidina hCAP18, han demostrado tener una acción citotóxica frente a líneas celulares derivadas de cáncer oral e incluso actividad antiproliferativa en la carcinogénesis inducida por aplicación de DMBA en el abazón de hámster sirio (26–29). Dentro de los PAM se destaca el estudio de la lactoferrina y sus péptidos derivados; ya que al ser una defensina presente naturalmente en fluidos como la leche, además con acción conocida frente a bacterias y virus, su acción citotóxica es de interés para el tratamiento del cáncer (30). La lactoferrina (Lfn) es una glicoproteína de 80kDa de la familia de las transferrinas. El fragmento obtenido de su hidrólisis con pepsina, la lactoferricina (Lfcin), proveniente del extremo N-terminal ejerce defensa contra bacterias y virus (31,32). Diferentes mecanismos de acción han sido atribuidos a la lactoferricina y sus derivados. Hasta el momento se han propuesto mecanismos que involucran la apoptosis por activación de diferentes caspasas, la disrupción de la membrana celular y mitocondrial e incluso la acción quimiopreventiva por estimulación inmunológica (33). Para el tratamiento del cáncer oral, la lactoferrina ha sido evaluada en líneas celulares HSC, evidenciándose su potencial para reducir la proliferación de las células cancerígenas, induciendo la activación del gen p53 involucrado en el ciclo celular y la apoptosis (34), también para la lactoferricina bovina ha sido reportada la inducción de apoptosis y la activación de las cinasas MAP (mitogen-activated protein) (35). Trabajos previos del grupo se han enfocado en la evaluación de la actividad antibacteriana de los péptidos derivados de la secuencia $^{17}\text{FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF}^{41}$ derivada de la LfcB (36–41). En cuanto a la actividad citotóxica también se han evaluado dichos péptidos, encontrando un potencial efecto citotóxico en células de cáncer de mama (42). Así mismo, se han realizado trabajos con líneas celulares de carcinoma oral humano SCC27 y SCC15 y en modelo de carcinoma oral en hámster, con resultados promisorios en el uso de estos péptidos (43,44).

Continuando con el proceso investigativo desarrollado en el grupo, en el presente trabajo se evaluó la actividad anticancerígena de péptidos lineales derivados de la lactoferricina bovina, excluyendo de la secuencia tanto en el extremo C-terminal como en el extremo N-terminal uno a uno los aminoácidos sin afectar el motivo RRWQWR. Así mismo, teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas que se han descrito para mejorar la acción antiproliferativa de los péptidos (45), también se sintetizaron formas diméricas y tetraméricas basadas en la secuencia RRWQWR, presuntamente responsable de la actividad antibacteriana y citotóxica (46–48). La síntesis de los péptidos se realizó en fase

sólida utilizando la estrategia ortogonal Fmoc/tBu, este tipo de síntesis permite tener versatilidad en las secuencias peptídicas, buenos rendimientos y altos porcentajes de pureza (49). Se evaluó la actividad citotóxica de estos péptidos frente a líneas celulares derivadas de carcinoma oral humano y también se evaluó la selectividad comparando los resultados frente a líneas celulares de queratinocitos normales. El péptido que presentó actividad citotóxica selectiva fue evaluado en el tratamiento de carcinoma escamocelular inducido en la mucosa (específicamente al interior del abazón) de la cavidad oral de hámster sirio, teniendo en cuenta que la implementación del modelo derivó en la evaluación de los factores asociados a la carcinogénesis en animales, las fases de desarrollo de este proceso y las limitaciones mismas del modelo animal. La carcinogénesis inducida químicamente en el hámster hasta obtener tumores macroscópicamente evidentes se logró mediante un tratamiento no convencional para el modelo, el cual consistió en la modulación con corticoides de la respuesta inmune del animal hacia el agente carcinogénico. Todo esto permitió obtener resultados no solamente relacionados con la actividad antiproliferativa del péptido, sino también realizar aportes importantes en el área de los modelos animales para su uso en la evaluación de agentes quimiopreventivos y tratamientos curativos, así como la evaluación del proceso de cancerización por exposición a agentes carcinogénicos.

Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar la actividad citotóxica selectiva en líneas celulares tumorales humanas y la actividad antiproliferativa en modelo de carcinogénesis en cavidad oral animal, de péptidos sintéticos derivados de Lactoferricina Bovina (LfinB).

1.2 Objetivos específicos

- Diseñar, sintetizar y caracterizar péptidos monoméricos derivados de la secuencia de LfinB que contienen el motivo RRWQWR.
- Determinar la actividad citotóxica *in vitro* de los péptidos monoméricos en líneas celulares de carcinoma humano y establecer su selectividad mediante la evaluación en líneas celulares no tumorales.
- Diseñar, sintetizar y caracterizar moléculas peptídicas multivalentes (dímeros y/o tetrameros) y evaluar su actividad citotóxica *in vitro*.
- Implementar el modelo de carcinogénesis en cavidad oral inducido por 7,12 – dimetilbencenantraceno en Hámster sirio (*Mesocricetus auratus*).
- Evaluar la actividad antiproliferativa *in vivo* en el modelo implementado previamente de la molécula que presentó la mayor actividad citotóxica selectiva *in vitro*.

1. Diseño, síntesis y caracterización de péptidos

Las secuencias peptídicas diseñadas y sintetizadas fueron derivadas de la lactoferrina bovina (LfcinB), un péptido de 25 residuos de aminoácidos ($^{17}\text{FKCRRWQWRMCKLGAPSITCVRRAF}^{41}$) que presenta un puente disulfuro intracatenario (Cys-19 y Cys-36) el cual le confiere estabilidad. Este péptido es obtenido a partir de la digestión con pepsina de la proteína Lactoferrina bovina (LfnB), esta proteína es secretada en fluidos naturalmente como es el caso de la leche, por lo cual está involucrada en los mecanismos de defensa innatos de los mamíferos (50). La estructura secundaria del péptido LfcinB es de tipo hoja beta en solución acuosa (51). Su carga catiónica (+8), debida a la presencia de 5 residuos de Arg y 3 de Lys, le permite actuar selectivamente sobre las células cancerígenas, las cuales presentan sobreexpresión de moléculas aniónicas como fosfaditilserina, fosfaditilcolina y mucinas O-glicosiladas (52). Además, la secuencia presenta residuos no polares (Trp y Phe) confiriéndole así un carácter anfipático que facilita su interacción con la membrana celular, facilitando la disrupción de la misma. La utilización de este péptido como agente citotóxico ha sido ampliamente estudiado y diferentes mecanismos mediante los cuales puede inducir muerte celular han sido propuestos, entre los cuales se destaca la hipótesis de que luego de la disrupción de la membrana celular y su presencia en el citosol, la LfcinB es capaz de alterar la membrana mitocondrial, generando especies reactivas de oxígeno (ROS) con la consecuente activación de endonucleasas que desencadena en la apoptosis celular (53). Sin embargo, algunos autores indican que la penetración del péptido hacia el citoplasma, constituye la desestabilización de la membrana para que ocurra una muerte celular por necrosis (47).

Resultados previos evidenciaron la actividad antibacteriana de péptidos derivados de LfcinB. Se determinó que la fracción de 15 aminoácidos $^{17}\text{FKCRRWQWRMCKLGA}^{31}$ presenta una actividad antibacteriana comparable a todo el péptido (LfcinB) completo de

25 aminoácidos (C.M.I.=25,1 μ M y C.M.I.=32,2 μ M respectivamente frente a *E. coli* y *E. faecalis*). Sin embargo, el péptido RRWQWR, que corresponde la secuencia más corta con actividad antimicrobiana reportada (54), no resultó efectivo frente a bacterias gram positivas y gram negativas (C.M.I.=101,5 μ M para *E.coli* y C.M.I.=202,9 μ M para *E. faecalis*) (36). Por otro lado, como parte del trabajo de investigación de nuestro grupo, la evaluación de la actividad antibacteriana de péptidos lineales derivados de LfcinB[17-31] evidenció que el extremo C-terminal (²⁸KLGA³¹) y el extremo N-terminal (¹⁷FKC¹⁹) no tienen influencia alguna en la C.M.I., ya que péptidos derivados con secuencias más cortas LfcinB[19-31], LfcinB[17-25], LfcinB[17-26] y LfcinB[17-27] presentaron actividad antibacteriana frente a *E. coli*; por otro lado, la cepa *S. aureus* (ATCC 25923) es resistente a la acción de dichos péptidos (38). Sin embargo, la C.M.I. para las cepas evaluadas es alta, si se compara frente a los péptidos polivalentes diseñados a partir del motivo RRWQWR. El dímero LfcinB[20-25]₂ (figura 1-1) presentó la mayor actividad antibacteriana frente a *E. coli*, *S. maltophilia* y *S. enteritidis*, estas formas polivalentes fueron diseñadas con el objetivo de aumentar la carga neta catiónica de los péptidos, así como aumentar el número de residuos hidrófobos como es el Trp. Se resalta además los resultados obtenidos con el tetrámero LfcinB[20-25]₄ el cual corresponde a la unión de dos unidades diméricas por medio de un enlace Cys-Cys (37). Los péptidos polivalentes también fueron evaluados frente a cepas bacterianas asociadas con enfermedades intrahospitalarias (*S. aureus* y *K. pneumoniae*, incluyendo cepas sensibles y meticilin-resistentes). El péptido tetramérico LfcinB[20-25]₄ presentó mayor actividad inhibitoria y microbicida comparado frente al péptido dimérico LfcinB[20-25]₂. De igual forma la secuencia palindrómica LfcinB[21-25]_{Pal} ejerció actividad antibacteriana frente a dichas cepas, y es de destacar la C.M.I. (6,25 μ M) frente a la cepa resistente de *S. aureus*, ya que es menor que la C.M.I. de los péptidos LfcinB[20-25]₄ y LfcinB[20-25]₂ (39). Resultados similares evidenciaron que la actividad antibacteriana de los péptidos polivalentes es eficaz frente a cepas bacterianas obtenidas a partir de aislados clínicos de relevancia intrahospitalaria, dichas muestras fueron obtenidas del banco de muestras de la Secretaria de Salud del Distrito de Bogotá. La mayoría de las cepas provenientes de aislados clínicos son resistentes a los antibióticos incluidos en los esquemas tradicionales de tratamiento, destacando así la necesidad de desarrollar nuevos antibióticos a partir de moléculas bio-compatibles como es el caso de los péptidos (40). En general, la variabilidad en la actividad antimicrobiana de los diferentes péptidos depende también de las características propias de cada microorganismo. El

efecto microbicida que ejercen estos péptidos es un indicador de la posible actividad citotóxica frente a células eucariotes, teniendo en cuenta la barrera que representa la pared celular de los procariotes. Además de ello, la carga neta positiva, así como la anfipaticidad de los péptidos derivados de LfcinB confieren a estas moléculas afinidad prevalente por las células cancerígenas, logrando así desarrollar tratamientos con menor número de efectos adversos.

Estos péptidos polivalentes derivados de LfcinB fueron evaluados frente a líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama. El péptido LfcinB[20-25]₄ ejerció mayor actividad citotóxica en comparación al dímero LfcinB[20-25]₂ y al monómero LfcinB[20-25]. Es de destacar que, así como se presentan diferencias en la susceptibilidad entre las cepas bacterianas, los resultados de la actividad citotóxica de un mismo péptido pueden variar dependiendo de la sensibilidad de cada línea celular. Por otro lado, no se evidenciaron diferencias significativas entre los diferentes tiempos de incubación evaluados, por lo cual se consideró que el tratamiento depende de la concentración del péptido, con una acción citotóxica inmediata (tiempo menor de incubación evaluado: 30 min) (42). Para el tratamiento de carcinoma oral, dichos péptidos también fueron evaluados en líneas celulares de CECO humano (ATCC CAL27 y SCC15). El péptido LfcinB[20-25]₄ (22,5µM) redujo la viabilidad celular a valores cercanos al 0%. Por otro lado, la viabilidad de la línea celular Het1A de queratinocitos normales no cancerígenos se redujo hasta un 60%, es decir el péptido ejerció menor actividad citotóxica frente a las células normales. La línea celular SCC15 fue más resistente a dicho tratamiento, así como al tratamiento con la molécula de referencia estaurosporina. De forma similar a como se encontró en el ensayo realizado con células de cáncer de mama, no se evidenciaron diferencias significativas entre los diferentes tiempos de tratamiento al que son sometidas las células, considerando la actividad inmediata de estos péptidos. En relación al mecanismo de acción, la rápida acción de los péptidos y la permeabilidad de la membrana sugirieron que la muerte celular se da por vía necrótica (43). Adicionalmente, la evaluación previa en modelo *in vivo* de carcinoma oral inducido en el abazón de hámster permitió identificar la acción antiproliferativa del péptido LfcinB[20-25]₄. Mediante el tratamiento con 8 dosis, el volumen y el peso de los tumores tratados con dicho péptido fue significativamente menor a los tumores tratados con el vehículo (SSN). Cabe destacar que la concentración del péptido es un factor importante para determinar el mecanismo de muerte celular, debido a que las

altas concentraciones de péptido indujeron reacciones inmunológicas con la consecuente degradación de este tipo de moléculas (44).

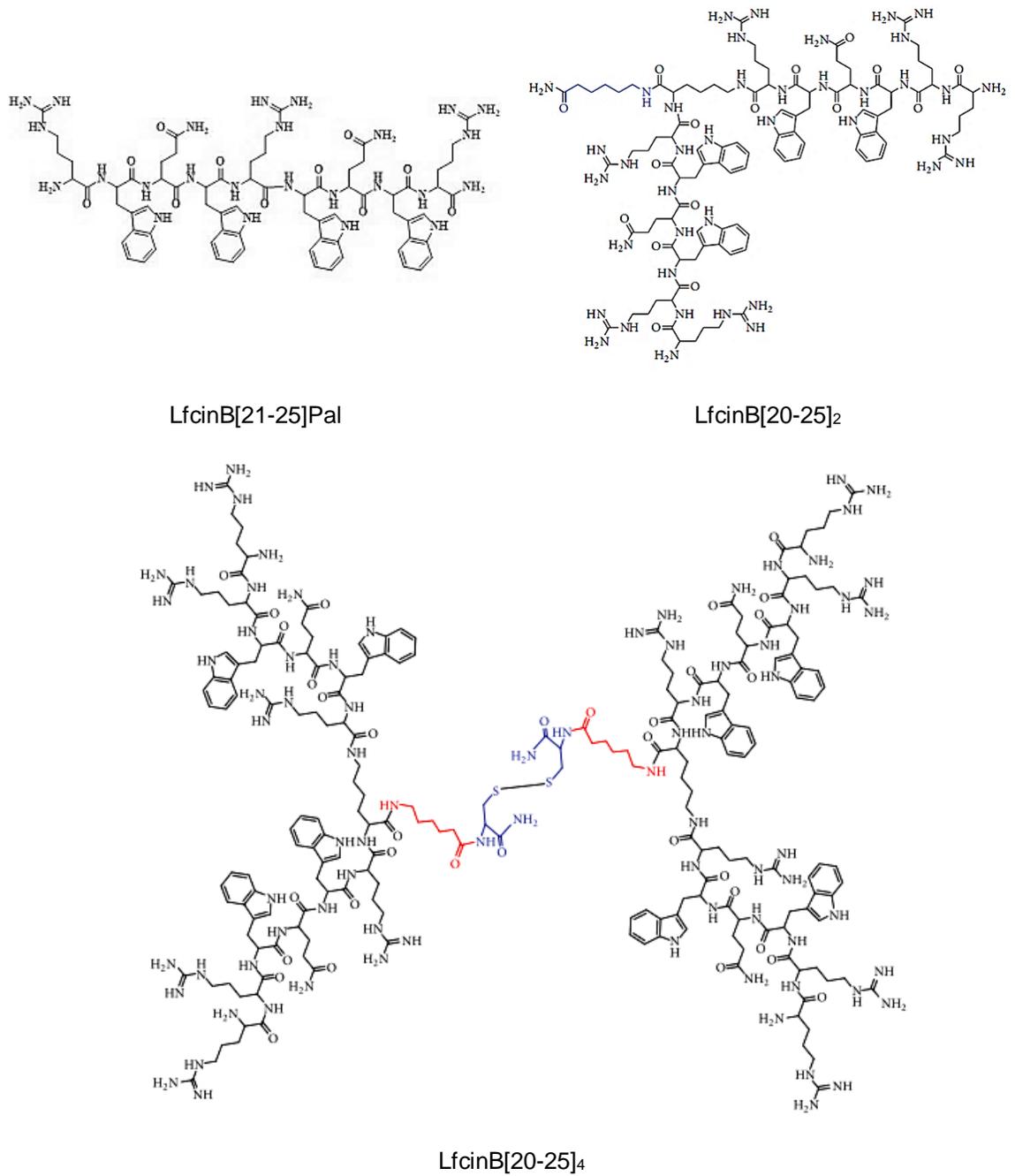
De acuerdo a los resultados previos del grupo de investigación, mediante síntesis en fase sólida (SPPS) y la estrategia ortogonal Fmoc/tBu se sintetizaron los péptidos lineales derivados de la secuencia LfcinB[17-31] excluyendo uno a uno los aminoácidos tanto del extremo N-terminal, como del extremo C-terminal (tabla 1-1). Además, se sintetizó el péptido buforina II (TRSSRAGLQFPVGRVHLLRK) como control negativo en los ensayos con líneas celulares, ya que ensayos de citotoxicidad preliminares determinaron su inocuidad incluso a altas concentraciones (200 µM).

Tabla 1-1. Diseño de péptidos monoméricos derivados de Lactoferricina bovina (LfcinB).

Péptido (código)	Secuencia
LfcinB 17-25	¹⁷ FKCRRWQWR ²⁵
LfcinB 17-26	¹⁷ FKCRRWQWRM ²⁶
LfcinB 17-27	¹⁷ FKCRRWQWRMK ²⁷
LfcinB 17-28	¹⁷ FKCRRWQWRMKK ²⁸
LfcinB 17-29	¹⁷ FKCRRWQWRMKKL ²⁹
LfcinB 17-30	¹⁷ FKCRRWQWRMKKLG ³⁰
LfcinB 17-31	¹⁷ FKCRRWQWRMKKLGA ³¹
LfcinB 18-31	¹⁸ KCRRWQWRMKKLGA ³¹
LfcinB 19-31	¹⁹ CRRWQWRMKKLGA ³¹
LfcinB 20-31	²⁰ RRWQWRMKKLGA ³¹
LfcinB 20-25	²⁰ RRWQWR ²⁵

La síntesis de estos péptidos lineales, nos permitió evaluar el efecto de la longitud de la secuencia (sin alterar el motivo RRWQWR) en la actividad citotóxica frente a líneas celulares de CECO humano. Estos resultados se co-relacionan con el estudio previo de la actividad antimicrobiana de dichas secuencias (38). Así mismo, se sintetizaron las secuencias polivalentes LfcinB[20-25]₂, LfcinB[20-25]₄, y LfcinB[20-25]_{Pal} derivadas del motivo RRWQWR (figura 1-1). Esto con el fin de ampliar los estudios de la actividad antiproliferativa de dichas moléculas a otras líneas celulares de CECO diferentes a CAL27 y SCC15, como se reportó previamente (43).

Figura 1-1. Péptidos polivalentes derivados de Lactoferricina bovina (LfcinB)



1.1 Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)

La síntesis de péptidos en fase sólida ha sido la estrategia más utilizada, ya que a diferencia de la síntesis en fase líquida no requiere de procesos de purificación entre cada uno de los acoples de los aminoácidos. Específicamente la estrategia Fmoc/tbu emplea una resina polimérica como soporte sólido, la cual está funcionalizada con un grupo amino que permite la formación del enlace peptídico con el aminoácido del extremo C-terminal de la secuencia y a partir de este, unir uno a uno todos los aminoácidos. La resina está inicialmente protegida por el grupo Fmoc, lábil a bases débiles como la piperidina, 4-metilpiperidina o piperazina. Después de un ciclo de desprotección en condiciones básicas, el aminoácido con su extremo α -amino protegido por el grupo Fmoc y el grupo carboxilo activado (formación de un éster activo mediante el uso de carbodiimidas), se une mediante enlace tipo amida a la resina. Uno a uno los aminoácidos van siendo acoplados a la secuencia siguiendo ciclos de desprotección/acople. Durante este proceso, las cadenas laterales de los a.a. que son reactivas están protegidas por grupos protectores (G.P.) como tBu, tritil, pbf, entre otros, lábiles a la acción de ácidos. Al finalizar la secuencia peptídica deseada, la escisión de la resina y la desprotección de las cadenas laterales se realiza mediante un tratamiento con TFA y algunos *scavengers* como agua, TIPS, EDT, entre otros, estos últimos forman aductos con los desechos de los grupos protectores, facilitando así la obtención del péptido puro (ver Figura 1-1-4).

A continuación, se describen cada uno de los pasos involucrados en la síntesis de los péptidos:

1.1.1 Remoción del grupo protector Fmoc

La estrategia de síntesis ortogonal permite que las reacciones de desprotección del grupo alfa-amino (α -NH₂) se realicen en condiciones básicas, mientras los grupos protectores de las cadenas laterales (lábiles a ácidos) permanecen unidos a los aminoácidos evitando reacciones colaterales y direccionando la síntesis hacia la formación del enlace peptídico. La resina, soporte sólido de la reacción, está funcionalizada con un grupo amina. Luego del hinchamiento de la resina Rink-amida (0,46meq/g) siguiendo los protocolos del fabricante, se procedió a la remoción del grupo fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) empleando 4-metilpiperidina (25% v/v) en DMF que contiene tritón 1%, en dos ciclos cada uno de 10

min a T ambiente (49). Posteriormente la resina se lavó con ciclos de DMF (4 × 1 min), IPA (4 × 1 min) y DCM (4 × 1 min) y se realizó el test de Kaiser (55).

1.1.2 Activación del Fmoc-aminoácido y acople

Para el acople de cada uno de los aminoácidos se emplearon dos estrategias de activación del grupo carboxilo. Finalizado el tiempo de reacción se realizó el test de Kaiser, si el resultado evidenciaba que no se lograba el acople completo, se procedía con la segunda estrategia, en el orden que se describen: (i): *Estrategia de éster modificado empleando N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 6-cloro-1-hidroxibenzotriazol (6-Cl-HOBt)*: Solución con 5 excesos (respecto a la sustitución equimolar y la cantidad de resina empleada) de AA:DCC:6-Cl-HOBt 1:1:1 en DMF. Se permitió la activación del aminoácido por 15 min a T ambiente. (ii): *Activación con sales de uronio*: se empleó una solución que contiene 5 excesos de AA:TBTU:6-Cl-HOBt 1:1:1 en DMF, luego se adicionaron 3 excesos de DIEA y se agitó la mezcla por 5 min a T ambiente. La solución de acople, en cualquiera de las dos estrategias de activación, se adicionó a la resina desprotegida, se agitó y se sometió a tratamiento por microondas cuatro veces (30 s c/u), entre cada tratamiento se enfrió el reactor en baño de hielo. La solución de acople se retiró mediante filtración y se realizaron los lavados respectivos: DMF (2 × 1 min), IPA (2 × 1 min) y DCM (2 × 1 min), finalmente se realizó el test de Kaiser.

1.1.3 Reacción de monitoreo (test de Kaiser)

El test de Kaiser permite identificar mediante una prueba cualitativa la presencia de grupos amino primario libres (55). Con el fin de confirmar que el ciclo de desprotección del grupo amino es efectivo o después de un ciclo de acople, en el cual el grupo amino está unido al aminoácido acoplado, se tomó una muestra de resina (cantidad menor a 1 mg) a la cual se le adicionaron la solución A y la solución B en proporción 2:1 v/v. Para la preparación de las soluciones A y B se realizaron tres mezclas: (i) 40g de fenol disueltos en 10mL de etanol absoluto; (ii) 0,65 mg de cianuro de potasio, 1,0 mL de agua y 49,0 mL de Piridina; (iii) 1,25 g de Ninhidrina en 25 mL de etanol absoluto. La solución (i) y (ii) se mezclaron lo cual corresponde a la solución A y la solución (iii) corresponde a la solución B, la cual se almacenó protegida de la luz y en refrigeración. Una vez la mezcla resina-solución se evidenció homogénea, se sometió a calentamiento a 105°C por 5 minutos. La coloración azul indica la presencia de grupos amino libres, lo cual es un indicativo positivo para la

desprotección del grupo amino; mientras que después de una reacción de acople dicho color azul indica que no se ha acoplado el aminoácido a la cadena peptídica.

Durante la mayoría de acoples de los aminoácidos de los péptidos derivados de LfcinB no se requirió del segundo ciclo de acople, lo cual indica que la estrategia utilizada con el éster modificado (DCC:6-Cl-HOBt como activador) es eficiente para las reacciones de acople. Sin embargo, dada la complejidad de los péptidos, las diferencias en la secuencia, los diferentes grupos protectores que son empleados en cada uno de los aminoácidos, se presentaron diferencias en la eficacia de los acoples, siendo el acople ²⁰RR²¹ el que requirió en la mayoría de casos del segundo ciclo de acople empleando sales de uronio (TBTU).

1.1.4 Escisión del péptido de la resina y desprotección de cadenas laterales

Finalmente, todos los aminoácidos de la cadena peptídica diseñada fueron acoplados, se removió el grupo Fmoc del último aminoácido, el cual corresponde al extremo N-terminal, se secó y pesó la resina. El desanclaje del péptido de la resina y la desprotección de las cadenas laterales se realizó mediante el tratamiento con una mezcla de “clivaje” que contiene TFA:H₂O:TIPS:EDT (92,5:2,5:2,5:2,5 % v/v). Esta solución se adicionó a la resina y se agitó por un tiempo entre 6 y 12 h, se retiró la resina por filtración y el péptido en solución se precipitó con la adición de éter etílico frío. Esta suspensión se centrifugó a 2500 rpm por 10 min y se desechó el sobrenadante. Se repitieron los lavados del precipitado con porciones nuevas de éter etílico 5 veces más. El péptido crudo fue secado a T ambiente, disuelto en agua y liofilizado. Los rendimientos de la síntesis de los péptidos crudos obtenidos variaron entre el 60% y el 95%, este porcentaje indica la cantidad de péptido crudo obtenido/la cantidad de péptido teórico (ver ecuación 1-1-4)

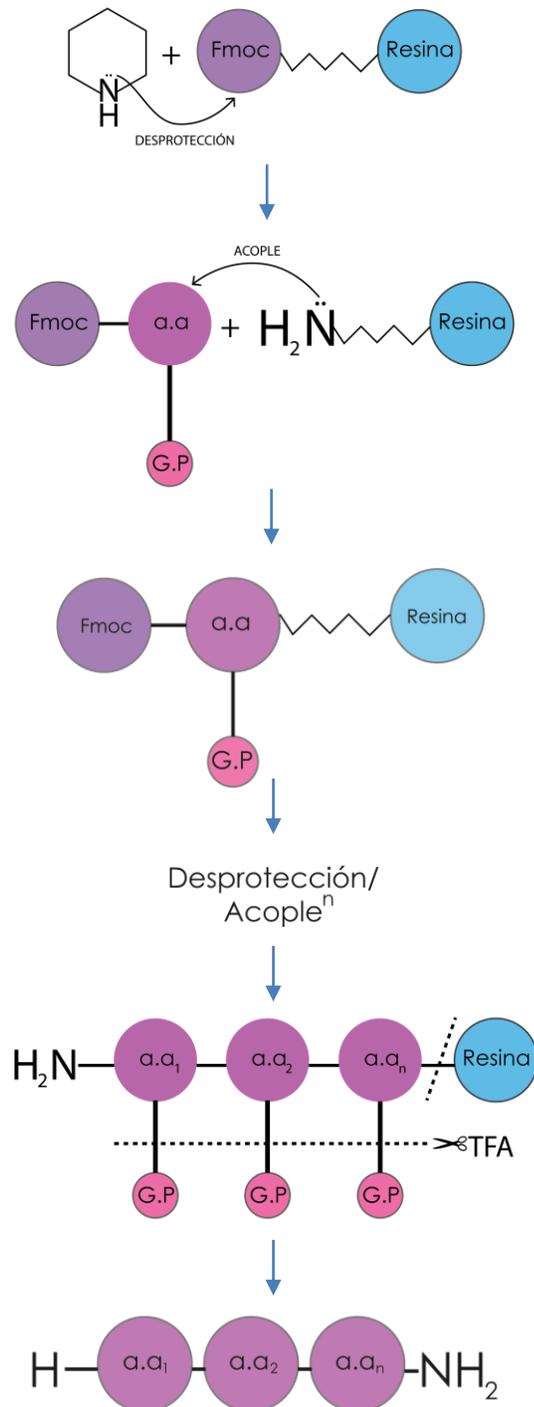
Ecuación 1-1-4: Cálculo de rendimiento de síntesis

$$\% \text{ Rendimiento crudo} = \frac{\text{Cantidad de péptido crudo obtenido (mg)}}{\text{Cantidad de péptido teórico (mg)}} * 100$$

Cantidad de péptido teórico

$$= \text{sust. de resina} \left(\frac{\text{meq}}{\text{g}} \right) * \text{cant. resina (g)} * \text{PM del péptido} \left(\frac{\text{mg}}{\text{meq}} \right)$$

Figura 1-1-4. Síntesis en fase sólida (SPPS) – Estrategia Fmoc/tBu



1.1.5 Formación de puente disulfuro

Para la obtención del péptido tetramérico se unieron dos unidades de LfcinB[20-25]₂ a cada una de las cuales se le ha acoplado un residuo de Cys en su extremo C-terminal. El grupo -SH de la cadena lateral se oxida creando un enlace S-S. El agente oxidante empleado es el DMSO al 10% en solución acuosa a pH 7,5. El monitoreo por HPLC permitió evaluar cómo la especie tetramérica va siendo más abundante a través del tiempo. De igual forma, cuando la señal de la especie dimérica desapareció, se dio por finalizada la reacción de oxidación. El péptido se liofilizó, se purificó y se caracterizó mediante HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF.

Figura 1-1-5. Monitoreo por HPLC de la formación del puente disulfuro

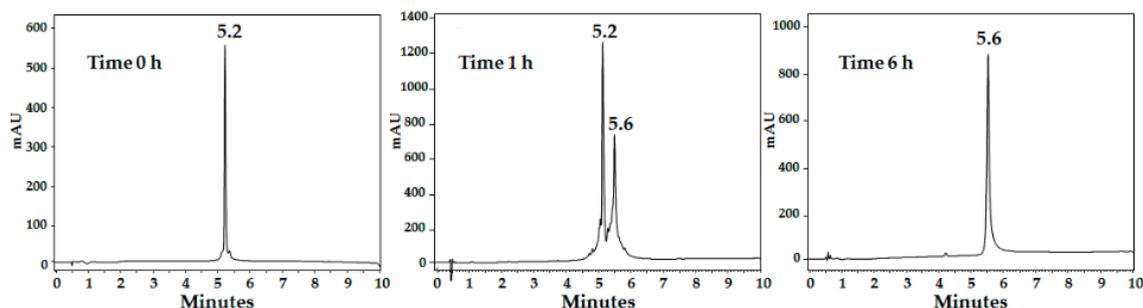


Imagen adaptada de (42). Dos unidades de la molécula LfcinB[20-25]₂-Cys se unen mediante enlace S-S. El tiempo de retención 5.6 min corresponde al tetrámero LfcinB[20-25]₄.

1.2 Caracterización de péptidos

Los péptidos crudos liofilizados se analizaron mediante cromatografía RP-HPLC para determinar el nivel de pureza obtenido después de la síntesis. Los perfiles cromatográficos de cada uno de los péptidos evidenciaron una especie principal con un porcentaje de área relativo entre el 44% y el 72%, esto requirió de la purificación en columnas funcionalizadas C-18 de uso para extracción en fase sólida (SPE), empleando diferentes porcentajes de ACN:H₂O en gradiente 0-100%. Las fracciones obtenidas después de la purificación se analizaron por RP-HPLC y se caracterizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF.

1.2.1 RP-HPLC

Para el análisis por RP-HPLC se empleó una columna monolítica Cromolith® C-18 (50 x 4,6 mm), acoplada al cromatógrafo Agilent series 1260 con detección UV a 210 nm. El método cromatográfico implementado en el laboratorio emplea 10 µL de la solución de péptido (1 mg/mL). El gradiente de elución del 5% al 70% de Solvente B (ACN con TFA 0,05%) en solvente A (agua con TFA 0,05%) en 11,5 min (tiempo total de análisis de 15 min). Flujo de la fase móvil = a 2,0 mL/min. Posteriormente a que se obtuvieron los cromatogramas de los péptidos crudos se analizaron la presencia de impurezas. Dependiendo del factor de retención en el gradiente, se evaluó el porcentaje de ACN:H₂O afín para la elución de cada péptido. Estos se purificaron empleando columnas SPE C-18 (tamaño de partícula 40-60 µm). Estas columnas son activadas utilizando metanol, lavadas con agua y el péptido en solución acuosa es cargado en la columna. Diferentes porcentajes de ACN:H₂O se adicionaron (0→100%) para obtener la fracción que contiene el péptido con un mayor nivel de pureza. Las fracciones fueron analizadas por el método implementado para el análisis HPLC y se determinó el rendimiento de la síntesis teniendo en cuenta la cantidad de péptido puro obtenido en relación a la cantidad de péptido teórico. Como ejemplo, se muestra el perfil cromatográfico del péptido crudo LfcinB[17-25] (figura 1-2-1) el cual presenta una especie mayoritaria con un área relativa de 44% en un tiempo de retención de 4,7 min. Las demás especies se constituyen como las impurezas. A partir de la resolución de cada uno de los cromatogramas de los péptidos crudos evaluados y su respectivo tiempo de retención, se determinaron los porcentajes de ACN:H₂O indicados para la purificación; luego de realizar este proceso en las columnas SPE, los cromatogramas de las fracciones puras evidenciaron especies abundantes con áreas relativas entre el 83% y el 97% (indicador de pureza). Para el caso del péptido LfcinB[17-25], la especie purificada tiene un área relativa del 88% (figura 1-2-1). Los resultados de pureza y rendimiento de síntesis se resumen en la tabla 1-2-1.

Figura 1-2-1. Cromatograma del péptido LfcinB[17-25] crudo y purificado

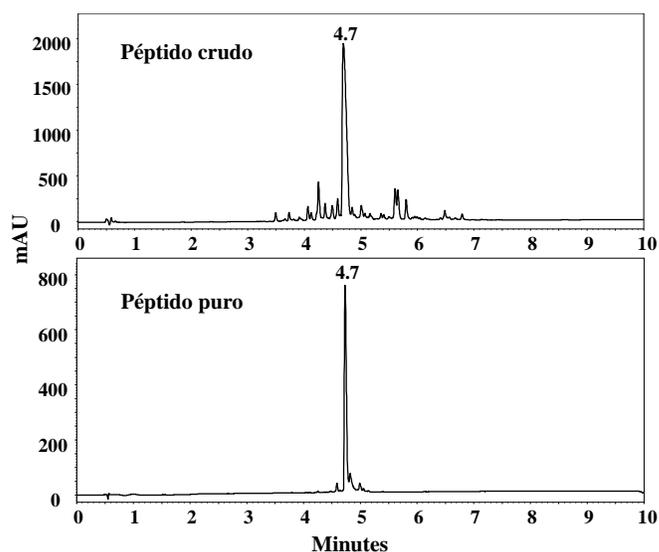


Tabla 1-2-1. Caracterización por RP-HPLC de los péptidos sintetizados

Código	Secuencia	t _R min	% área ^a	Rendimiento Puro (%) ^b
LfcinB 17-31	FKCRRWQWRMKKLGA	4,98	87	16
LfcinB 18-31	KCRRWQWRMKKLGA	4,71	92	10
LfcinB 19-31	CRRWQWRMKKLGA	4,99	96	25
LfcinB 20-31	RRWQWRMKKLGA	4,95	90	9
LfcinB 17-30	FKCRRWQWRMKKLG	4,96	83	12
LfcinB 17-29	FKCRRWQWRMKKL	5,06	91	5
LfcinB 17-28	FKCRRWQWRMKK	4,68	86	5
LfcinB 17-27	FKCRRWQWRMK	4,87	90	13
LfcinB 17-26	FKCRRWQWRM	5,17	95	7
LfcinB 17-25	FKCRRWQWR	4,73	88	11
LfcinB 20-25	RRWQWR	4,19	91	37
(LfcinB 21-25) _{Pal}	RWQWRWQWR	5,95	93	30
(LfcinB 20-25) ₂	(RRWQWR) ₂ K-Ahx	5,21	90	33

^a Porcentaje de pureza=área del pico cromatográfico (RP-HPLC) del péptido/área de otros picos en el cromatograma

^b Porcentaje de rendimiento péptido puro=cantidad de péptido puro/cantidad de péptido teórico

t_R= tiempo de retención (min)

1.2.2 Caracterización por MALDI-TOF MS

El peso molecular de los péptidos se determina mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Autoflex, Bruker®), 1 μ L de la solución stock de péptido purificado (0.5 mg/mL) con 18 μ L de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico ,1 mg/mL) son mezclados y aplicados sobre la placa porta muestra. La potencia del láser oscila entre 2700 y 3000V. En todos los casos se obtuvo una especie mayoritaria correspondiente a la relación m/z del ion $[M+H]^+$ siendo M la masa monoisotópica de la secuencia. En el anexo A se relacionan los cromatogramas del análisis de los péptidos después de la purificación, con el respectivo espectro de masas.

2. Determinación de la actividad citotóxica en líneas celulares humanas de CECO

La determinación de la viabilidad celular de diferentes líneas tumorogénicas derivadas de CECO humano, permitió identificar el potencial citotóxico de los péptidos sintetizados. Con este propósito se emplearon las siguientes líneas celulares:

- FaDu (ATCC® HTB-43™)
- SCC9 (ATCC® CRL-1629™)
- HEK001 (ATCC® CRL-2404™)

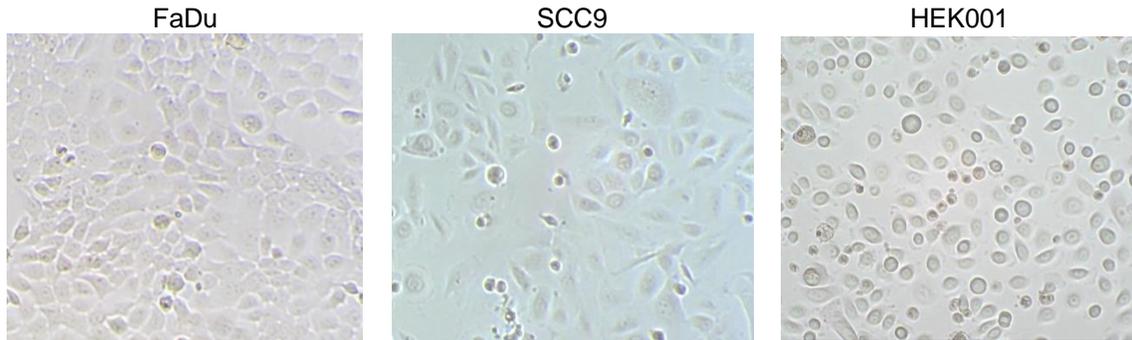
Las líneas celulares FaDu y SCC9 corresponden a modelos estandarizados y ampliamente estudiados, derivados de células escamosas cancerígenas de faringe y lengua respectivamente. A diferencia de las células HEK001 que corresponden queratinocitos normales inmortalizados no cancerígenos humanos, por lo cual esta línea celular se empleó con el fin de determinar la posible afinidad de los péptidos por las células cancerígenas. Se utilizó la capacidad de reducción enzimática de resazurina como indicador cuantitativo de la viabilidad celular. Las enzimas reductasas, el citocromo P450 y diferentes mecanismos de metabolismo activos de las células viables son capaces de reducir la resazurina en resofurina; esta última es una molécula fluorescente, consecuentemente su detección permite determinar cuantitativamente la actividad metabólica de las células viables. Para emplear dicho ensayo en la evaluación de la actividad citotóxica de las moléculas peptídicas, fue necesario determinar previamente la densidad celular, la concentración de resazurina y el tiempo de reducción de resazurina apropiado para cada línea celular. Una vez establecidas las condiciones óptimas de la técnica, se realizó un *screening* o tamizaje de la actividad citotóxica de todos los péptidos y se escogió el péptido más citotóxico y selectivo. Dicho péptido se empleó en la determinación de la permeabilidad en la membrana celular mediante citometría de flujo, con el complejo péptido biotinilado-estreptavidina para la detección de la fluorescencia. Así mismo, se tomaron microfotografías SEM para evidenciar los cambios morfológicos en la membrana celular por acción del péptido.

Las aproximaciones *in vitro* de la actividad citotóxica permitieron escoger uno de los péptidos para la evaluación de la actividad antiproliferativa en el modelo de carcinoma oral inducido por DMBA en hámster sirio (ver capítulo 4).

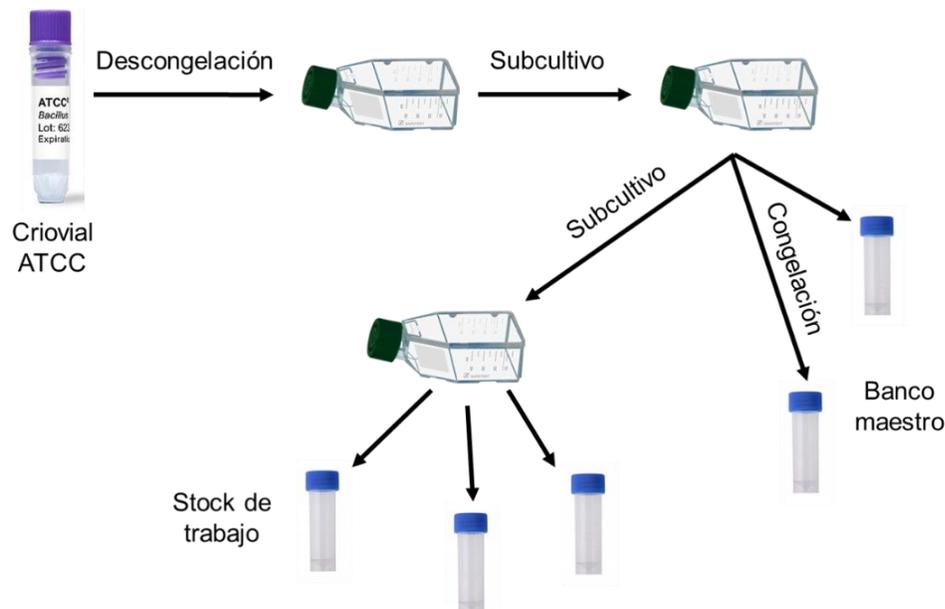
2.1 Líneas celulares derivadas de CECO humano

Las líneas celulares empleadas fueron adquiridas del ATCC haciendo estricto seguimiento del acuerdo "*Material transfer agreement*" el cual exige el estricto uso de los reactivos biológicos con fines de investigación, prohíbe el uso en seres humanos y la comercialización sin autorización.

La línea celular FaDu (ATCC® HTB-43™) se mantuvo bajo condiciones de asepsia en medio de cultivo RPMI 1640 (Biowest®) suplementado con 10% de SFB (Biowest®) y piruvato sódico 1mM (Sigma®). Estas son células adherentes que tienen morfología tipo epitelial con bordes poliédricos y núcleo definido. La línea celular SCC9 (ATCC® CRL-1629™) fue cultivada en medio de cultivo DMEM:F12 (Biowest®) suplementado con L-glutamina 2,5 mM (Biowest®), HEPES 15 mM (Sigma®) e hidrocortisona 400 ng/mL (Sigma®). Estas células adherentes tienen morfología elongada con núcleo celular definido. La línea celular HEK001 (ATCC® CRL-2404™) corresponde a queratinocitos normales inmortalizados (mediante transfección con plásmido de HPV 16) no tumorigénicos y fue cultivada en medio de cultivo Bulletkit KGM2 (Cat No.3107, Lonza®) suplementado con los factores de crecimiento: hEGF, insulina, transferrina, hidrocortisona y epinefrina de acuerdo a la información técnica del fabricante. Este medio de cultivo es libre de suero. La morfología de las células corresponde al tipo epitelial, con bordes redondos y un núcleo bastante pronunciado (figura 2-1). Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C, en una atmósfera que contiene 5% de CO₂ en incubadora estéril (Incusafe MCO-18ACL, Panasonic®) exclusiva para el cultivo de líneas celulares bajo las condiciones de esterilidad y asepsia estándar. Todas las líneas celulares se expandieron a partir del criovial enviado por la ATCC generando así el banco maestro para el laboratorio, y a partir de allí se generó un stock de trabajo sin superar los 20 pases. Esto con el fin de mantener las propiedades de pureza, morfología y fenotipia de las líneas celulares (figura 2-2).

Figura 2-1. Microfotografías de las líneas celulares en cultivo

Microfotografías de líneas celulares ATCC FaDu, SCC9 y HEK001 confluencia 70-90% en frasco de cultivo T75 cultivadas bajo condiciones estándar. Aumento 100X.

Figura 2-2. Mantenimiento y expansión de cultivo celular

2.1.1 Descongelación

El criovial con el contenido celular se retiró del congelador a -131°C (Revco) y se descongeló en baño María a 37°C en un tiempo no mayor a 3 min. En seguida, se desinfectó el criovial con solución de etanol 70% y bajo condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar (Haier® HR40) se transfirió el contenido a un tubo cónico de 50 mL, el cual contenía 9 mL del medio de cultivo sin complementar indicado para cada línea celular. La suspensión celular se centrifugó a 100xg por 5 min y se descartó el sobrenadante. El “*pellet celular*” se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo completo. De

esta suspensión se reservaron 10 μ L para la cuantificación de la viabilidad celular por triplicado. Brevemente, se mezclaron 10 μ L de la suspensión celular y 10 μ L de azul de tripan 0,5% (Sigma®) y de esta mezcla, se sembraron 10 μ L en cámara de Neubauer (Boeco). La densidad celular se calculó como lo indica la ecuación 2-1-1. La suspensión celular restante se transfirió a un frasco ventilado T25 estéril con 4 mL de medio de cultivo completo a 37°C. Todas las líneas celulares presentaron una viabilidad superior al 90% e igualmente todos los experimentos se realizaron con cultivos celulares que presentaran una viabilidad superior al 90%.

Ecuación 2-1-1: Densidad (número de células/mL) y % viabilidad celular. Método: conteo manual en cámara de Neubauer

$$\text{Densidad celular} \left(\frac{\# \text{cels.}}{\text{mL}} \right) = \frac{\# \text{ cells en el cuadrante externo} \times 2}{10^{-4} \text{ mL}}$$

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \frac{\# \text{ de células brillantes (viables)}}{\# \text{ de células totales}} \times 100$$

2.1.2 Subcultivo

Una vez la confluencia de la monocapa alcanzó valores entre 80-90% se procedió a ampliar el cultivo a un frasco T75. Para tal fin, se retiró el medio de cultivo y se enjuagaron las células con 3 mL de medio de cultivo estéril sin complementar previamente atemperado a 37°C. Se adicionó 1 mL de tripsina:EDTA (0,05%:0,02% con rojo de fenol, Biowest®) al frasco T25 y se incubaron las células por un tiempo entre 3-6 min. Bajo observación microscópica (microscopio óptico invertido BestScope®) se determinó el tiempo de incubación necesario para el desprendimiento total de la monocapa en cada una de las líneas celulares. Una vez se habían desadherido las células, se adicionaron 500 μ L de SFB más 3,5 mL de medio de cultivo sin complementar con el fin de detener la reacción enzimática de la tripsina y se homogenizó la suspensión celular. Todo el contenido del frasco se transfirió a un tubo cónico de 50 mL y se centrifugó a 100xg por 5 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el contenido celular en 1 mL de medio de cultivo completo. Se tomó la muestra de 10 μ L para determinar la viabilidad celular y el volumen restante de suspensión celular se transfirió a un frasco de cultivo adicionando el volumen

de suspensión celular necesaria para el tamaño de frasco en uso, parámetro inherente al crecimiento celular de cada línea. El medio de cultivo se reemplaza cada 2-3 días dependiendo la generación de detritos celulares y el cambio en la coloración de los medios de cultivo que contienen el indicador rojo de fenol (el amarillo indica acidez producto del metabolismo celular, lo que indica la necesidad del cambio de medio de cultivo). Los experimentos fueron realizados con cultivos celulares que presentaron una viabilidad celular mayor al 90%.

2.1.3 Criopreservación

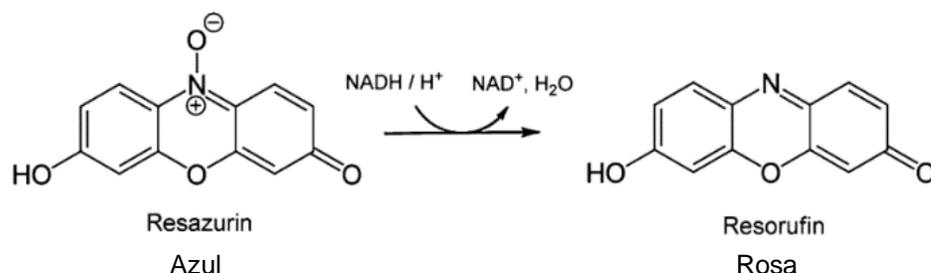
Cuando el frasco de cultivo alcanzó una confluencia de 80-90% se procedió al desprendimiento de la capa celular tal como se indicó en el numeral 2.1.2-subcultivo-. A partir de la suspensión celular final, se tomó el volumen equivalente a 1×10^6 células y se transfirió a criovial de 2 mL. El medio de criopreservación corresponde al recomendado por la ATCC: 95% de medio de cultivo completo y 5% de DMSO v/v. Para la línea celular HEK001 el medio de criopreservación contiene DMEM 70%, SFB 20% y DMSO 10%. Los crioviales homogenizados se sometieron a un descenso de temperatura en congelador -20°C por dos horas, de allí se transfirieron a un congelador a -80°C por 24 h y finalmente se almacenaron en congelador -131°C. Las alícuotas del stock de trabajo que iban a ser utilizadas en tiempos menores a tres meses permanecieron en el congelador a -80°C. La criopreservación a perpetuidad (banco maestro del laboratorio) o por tiempos prolongados se realizó en el congelador a -131°C.

2.2 Implementación del ensayo de viabilidad celular con resazurina

Se empleó la resazurina como indicador de viabilidad celular para determinar el efecto citotóxico de los péptidos. En los años 1920, este indicador inicialmente fue utilizado para determinar la calidad de leche, ya que la molécula es reducida por diferentes reductasas mitocondriales como: NADPH, FMNH, NADH y diferentes citocromos (56). Este indicador no es tóxico para las células, ya que el producto reducido, la resofurina, es expulsado del citoplasma. Además, a diferencia de la resazurina (de coloración azul), la resofurina tiene

una coloración rosa y es una molécula fluorescente, lo cual permite que la detección sea bastante sensible (57).

Figura 2-2-1. Reducción enzimática de resazurina



Para la determinación de la actividad citotóxica de los péptidos es importante tener en cuenta que las líneas celulares tienen diferentes tasas de metabolismo y acción mitocondrial, por lo cual se debe implementar el ensayo de viabilidad celular evaluando las siguientes variables: (i) densidad celular a sembrar en pozo de placa de 96, (ii) el tiempo de incubación para la reducción de la resazurina y (iii) la concentración de este indicador en el medio de cultivo. Con este fin, en una placa de 96 pozos se sembraron diferentes cantidades de células; después de un tiempo de proliferación de 18 h, se retiró el medio de cultivo y a cada pozo se le añadieron 100 μ L de una solución con diferentes concentraciones de resazurina (5%, 10% y 15% de solución de resazurina (400 μ M en PBS) en medio de cultivo sin SFB). Además de ello, se adicionaron las tres soluciones de diferente concentración en pozos sin células (pozo blanco). Para la siembra de las placas se siguió la metodología descrita para subcultivo (2.1.2.), desadheriendo las células del frasco de cultivo, obteniendo una suspensión de densidad celular conocida y mediante dilución seriada se obtuvieron las densidades celulares a sembrar por triplicado. Se midió la fluorescencia de la placa en lector de placas TECAN® Genios (λ_{exc} 519 nm - λ_{emi} 535 nm) cada hora por un tiempo total de 4 h. En la figura 2-2-2 se presenta el diseño empleado en la placa de 96 pozos para evaluar las tres variables implicadas de forma simultánea. La implementación de la metodología se realizó para cada una de las 3 líneas celulares.

Figura 2-2-2. Diseño de placa de 96 pozos para la determinación de las variables implicadas en el ensayo de viabilidad celular con resazurina

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			5% de rsz			10% de rsz			15% de rsz			
B		No cells RSZ 5%	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	
C		No cells RSZ 5%	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	4000	
D		No cells RSZ 10%	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	6000	
E		No cells RSZ 10%	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	8000	
F		No cells RSZ 15%	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	10000	
G		No cells RSZ 15%	12000	12000	12000	12000	12000	12000	12000	12000	12000	
H												

Diseño de placa de 96 pozos empleado para la determinación de las variables en el ensayo de resazurina. RSZ = resazurina. No cells = pozos sin células. Las cantidades corresponden a células/pozo. Los pozos más externos (cuadrante gris) no se emplearon durante el ensayo.

Luego de medir la fluorescencia de la placa cada hora, al valor de la intensidad de fluorescencia de cada uno de los pozos se le restó la fluorescencia del pozo blanco (pozo "no cells") al cual se le adicionó 100 μ L de las concentraciones correspondientes de resazurina en medio de cultivo no suplementado. Para cada una de las condiciones se tienen 3 pozos y a su vez todo el ensayo se realizó por triplicado con células provenientes de un frasco de cultivo diferente ($n=3*3$). Para cada línea celular se determinaron las condiciones de trabajo, lo que permite posteriormente evaluar la acción citotóxica de los péptidos. Así, se definieron las siguientes condiciones:

Tabla 2-2-1. Condiciones determinadas para la evaluación citotóxica con RSZ

Línea celular	No. De células/pozo	Tiempo de incubación (h)	Concentración de RSZ (%)
FaDu	12.000	3	10
SCC9	10.000	3	10
HEK001	14.000	2	10

Cabe también destacar que además de los resultados de fluorescencia, para determinar el número de células a sembrar en cada pozo, se observó al microscopio la confluencia después de las 18 h de proliferación. Se escogió en cada caso la densidad celular que

llegase a un 70-80% de confluencia, esto corresponde a una monocapa abundante, pero con el espacio suficiente para proliferar en caso de que el péptido no tenga acción citotóxica alguna, durante un tiempo de exposición prolongado (ejemplo, 24 h).

2.3 Evaluación de la actividad citotóxica

Se determinó la viabilidad celular, después de un tratamiento con los péptidos a diferentes concentraciones y diferentes tiempos de incubación, mediante la reducción de resazurina. Para esto, se sembró la cantidad de células determinadas durante la implementación del ensayo (12×10^3 células/pozo para FaDu, 10×10^3 células/pozo para SCC9 y 14×10^3 células/pozo para HEK001) en medio de cultivo completo y se incubaron las placas bajo condiciones de cultivo estándar (37°C , 5% de CO_2 , >90% HR). Pasado el tiempo de adherencia (18 h) se retiró el medio de cultivo y se reemplazó con 100 μL del tratamiento con cada uno de los péptidos a evaluar. Se emplearon las siguientes concentraciones de péptido (pp) disuelto en medio de cultivo sin SFB: 6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM y 100 μM . Como control negativo las células se incubaron con medio de cultivo estándar (100% de viabilidad). Como control positivo se empleó la doxorubicina (DOXO) en una concentración 50 μM , suficiente para inducir la muerte celular después de un tiempo de tratamiento de 24 h. Además de ello se midió la fluorescencia de 3 pozos sin células que contenían medio de cultivo suplementado con resazurina 10% para determinar el valor del “blanco” (figura 2-3-1). Estos pozos permitieron detectar si había contaminaciones puntuales durante el ensayo, ya que el cambio del indicador de color azul a rosa indica acción metabólica de cualquier microorganismo presente en la placa, en los instrumentos utilizados, en el ambiente o en el medio de cultivo.

Finalizado el tiempo de exposición al péptido (2, 6 y 24 h) se reemplazó el medio de cultivo que contenía el péptido por medio de cultivo suplementado con 10% de la solución de resazurina (400 μM en PBS). Las células se incubaron por el tiempo implementado para cada línea celular y finalmente se realizó la lectura de fluorescencia en el lector de placas TECAN® Genios. El porcentaje de viabilidad celular corresponde a:

Ecuación 2-3-1: Cálculo de viabilidad celular

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \frac{F_{pp} - F_{blanco}}{F_{100\% \text{ de viab.}} - F_{blanco}} \times 100$$

Figura 2-3-1. Mapa para la adición de solución de péptidos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	NO cells	NO cells	P1 C1	P1 C2	P1 C3	P1 C4	P1 C5	P3 C1	P3 C2	P3 C3	P3 C4	P3 C5
C		NO cells	P1 C1	P1 C2	P1 C3	P1 C4	P1 C5	P3 C1	P3 C2	P3 C3	P3 C4	P3 C5
D	NO tto	NO tto	P1 C1	P1 C2	P1 C3	P1 C4	P1 C5	P3 C1	P3 C2	P3 C3	P3 C4	P3 C5
E		NO tto	P2 C1	P2 C2	P2 C3	P2 C4	P2 C5	P4 C1	P4 C2	P4 C3	P4 C4	P4 C5
F	DOXO	DOXO	P2 C1	P2 C2	P2 C3	P2 C4	P2 C5	P4 C1	P4 C2	P4 C3	P4 C4	P4 C5
G		DOXO	P2 C1	P2 C2	P2 C3	P2 C4	P2 C5	P4 C1	P4 C2	P4 C3	P4 C4	P4 C5
H												

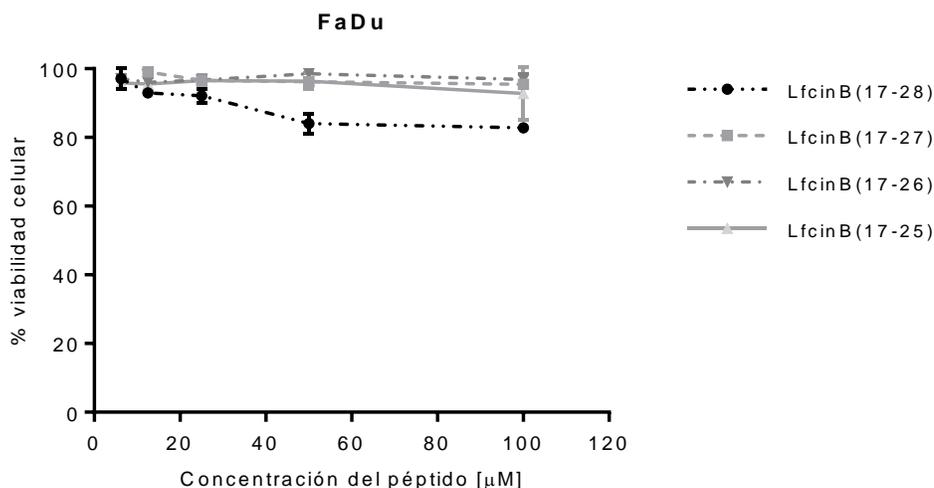
Mapa para la adición de tratamientos. DOXO=doxorubicina 50µM, control positivo. NO tto=células sin tratamiento, control negativo. NO cells= RSZ 10% en medio de cultivo, blanco. P=péptido (se evaluaron 4 péptidos por caja), C=concentración (se evaluaron 5 concentraciones por cada péptido).

Se analizó la relación entre la viabilidad celular y la concentración de los diferentes péptidos, para el cálculo de la CI₅₀ en cada uno de los tiempos de tratamiento evaluados. El análisis se realizó mediante el uso del software GraphPad Prism 7® por ajuste de curva sigmoidea. La comparación entre los grupos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, seguido del test de Dunnet para comparaciones múltiples frente a un grupo de referencia.

El objetivo del diseño de los péptidos lineales fue evaluar la actividad citotóxica de las secuencias derivadas de LfcinB[17-31] eliminando uno a uno los aminoácidos del extremo C-terminal y del extremo N-terminal para identificar la mínima secuencia que conservara la actividad citotóxica, manteniendo integro el motivo RRWQWR. Sin embargo, ninguna de estas secuencias, evaluadas con concentración de hasta 100 µM, presentó actividad citotóxica que disminuyera el valor de la viabilidad celular evaluada con el método de resazurina por debajo del 80%. Por otro lado, la línea celular FaDu evidenció cambios morfológicos y des-adherencia de algunas células tras el tratamiento con algunos de los péptidos lineales, lo cual no corresponde a una interrupción considerable en la función

celular ya que la viabilidad celular presenta valores cercanos al 100% (ver gráfica 2-3-1). Los péptidos que ocasionaron signos de muerte celular en las células FaDu corresponden a las secuencias que se les eliminó parte del extremo C-terminal de LfcinB[17-31], mientras que las células tratadas con los péptidos con eliminaciones en el extremo N-terminal no evidenciaron signos de citotoxicidad, esto indica que el extremo N-terminal es esencial para la actividad citotóxica del péptido LfcinB[17-31]. A pesar de que la viabilidad celular no disminuyó considerablemente cuando se evaluó el bienestar metabólico mediante la reducción de resazurina, los cambios morfológicos evidencian signos de muerte celular: desadherencia con esferización de la célula y rompimiento de la membrana, con la consecuente expulsión del material citoplasmático y la elevada generación de detritus (figura 2-3-2). Las células SCC9 y HEK001 son resistentes a la acción de los péptidos lineales.

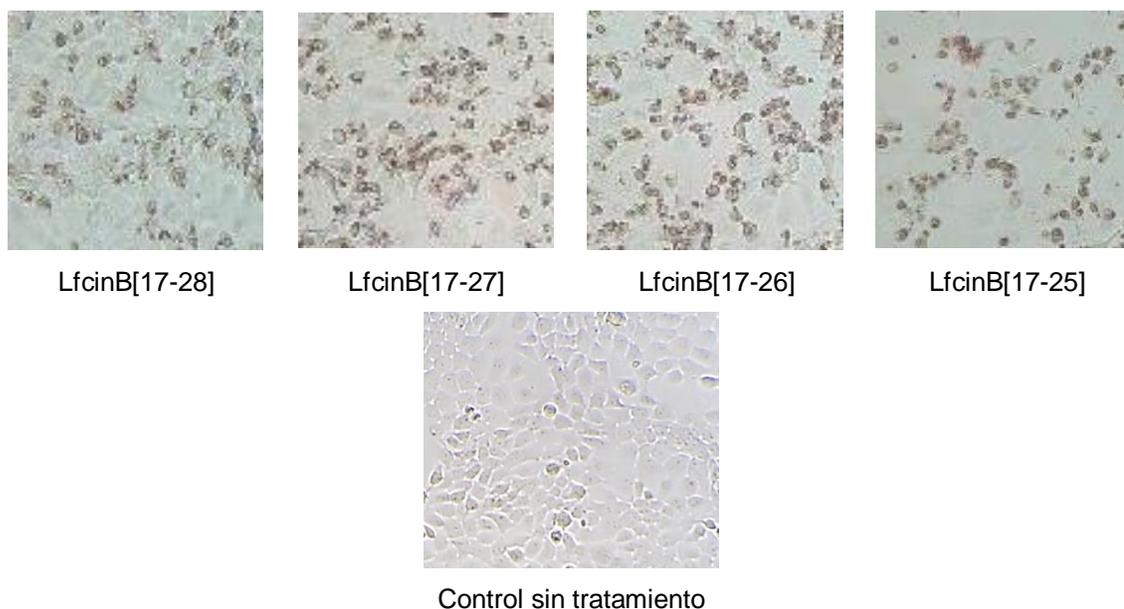
Figura 2-3-2. Actividad citotóxica de los péptidos lineales derivados de LfcinB[17-31]



Resultados similares fueron reportados por Solarte (2016) (58), donde la viabilidad celular no se afectó en más del 20% teniendo en cuenta que el método de determinación del efecto citotóxico empleado por el autor es el metabolismo de MTT. Otros son los resultados reportados por Eliassen LT et al (2006) (59) en relación a LfcinB, quien indica que el puente disulfuro intracatenario le confiere estabilidad al péptido. Con un efecto citotóxico considerable ($CI_{50}=15,5 \mu\text{M}$) en células de neuroblastoma, el péptido LfcinB obtenido por digestión con pepsina a partir de la proteína LfnB, es considerado citotóxico. Los resultados

aquí reportados son de gran interés para el desarrollo de péptidos a partir de la secuencia en mención, ya que se pueden obtener secuencias más cortas con efecto citotóxico similar, lo cual reduce tiempo y costos en la síntesis. El diseño de péptidos citotóxicos derivados de LfcinB puede estar orientado a optimizar diferentes características como la carga neta, la posición de los aminoácidos básicos y aromáticos, la formación de dímeros y tetrámeros.

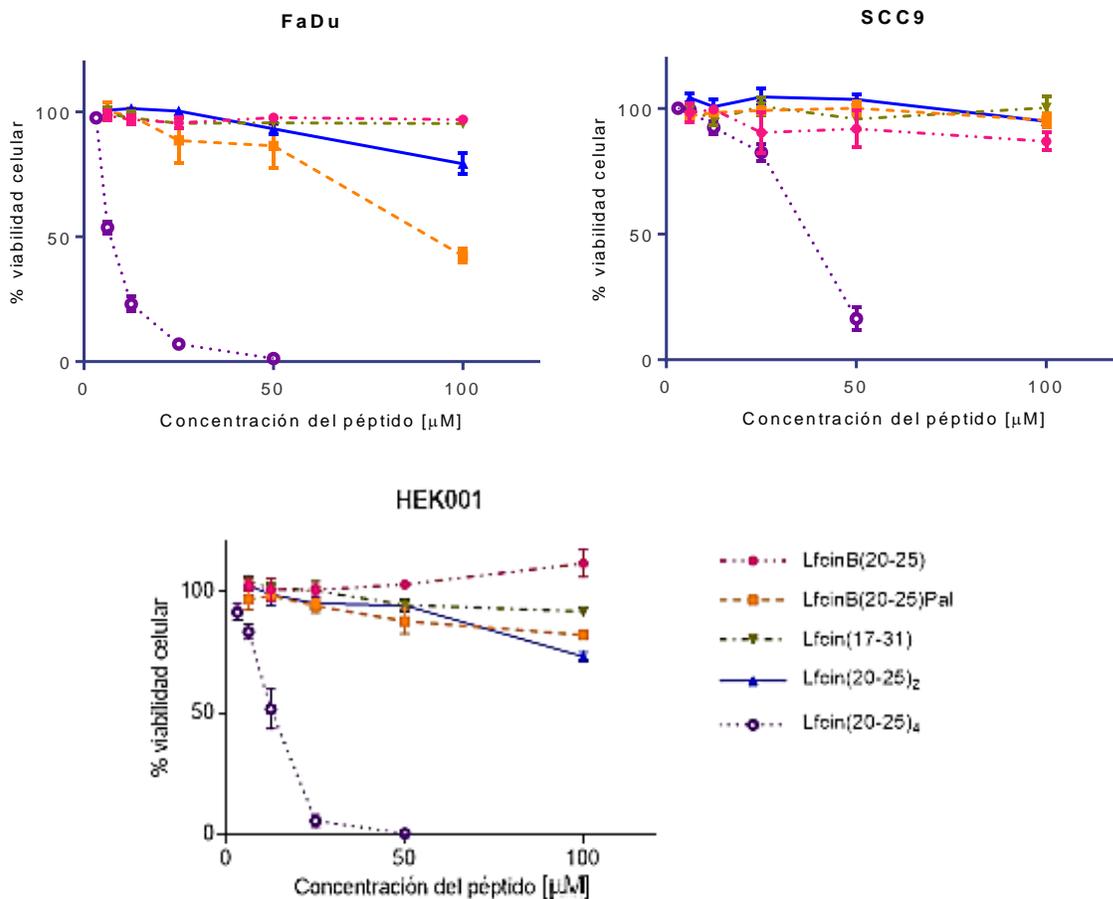
Figura 2-3-3. Microfotografías de línea celular FaDu después de 2 h de tratamiento con los péptidos derivados de LfcinB[17-31] (aumento 100X)



Con el fin de evaluar el efecto de la polivalencia en el efecto citotóxico de los péptidos derivados de LfcinB, se diseñaron diferentes formas de presentación del motivo RRWQWR. El aumento de la carga neta positiva y la hidrofobicidad, con un mayor número de residuos de Arg y Trp, producto de la duplicidad del motivo RRWQWR en el dímero y el tetrámero, les confieren a las formas polivalentes diseñadas un efecto citotóxico considerablemente mayor al obtenido con los péptidos lineales (gráfica 2-3-2). La viabilidad de la línea celular FaDu se reduce a valores cercanos al 0% después de dos horas de tratamiento con el péptido LfcinB[20-25]₄ 50 μ M, a su vez la forma dimérica LfcinB[20-25]₂ 100 μ M reduce la viabilidad al 79% y la forma palíndroma LfcinB[21-24]_{Pal} (RWQWQWR) 100 μ M reduce la viabilidad hasta el 42%, teniendo en cuenta el efecto casi inmediato (30 min) reportados por Vargas Y et al (2017) y Solarte et al (2015) (42,43). La línea celular SCC9 es resistente a la acción de los péptidos LfcinB[21-24]_{Pal} y LfcinB[20-25]₂, con estos

tratamientos la viabilidad celular se mantiene alrededor del 95%. Sin embargo, el péptido LfcinB[20-25]₄ 50 μ M presenta efecto citotóxico frente a esta línea celular, reduciendo la viabilidad hasta 16,3%. Finalmente la línea celular HEK001 derivada de queratinocitos normales no tumorigénicos, es sensible a la acción del péptido tetramérico, el cual reduce la viabilidad hasta 5,7% con una concentración 25 μ M, el péptido LfcinB[20-25]₂ también reduce la viabilidad en menor medida hasta 73,3%.

Figura 2-3-4. Porcentaje de viabilidad celular después del tratamiento por 2 h con péptidos polivalentes derivados de LfcinB[20-25]



A partir de la curva dosis-respuesta se calculó la CI_{50} después de 2 h de tratamiento para cada uno de los péptidos en las líneas celulares evaluadas (tabla 2-3-1). La potencia del péptido tetramérico es significativamente mayor ($p=0,0001$) comparado frente a la secuencia RRWQWR. Este péptido tiene notable acción citotóxica frente a las tres líneas

celulares evaluadas, además presentó una CI_{50} de $7,3 \pm 0,26 \mu\text{M}$ para la línea tumoral FaDu, mientras que para la línea de queratinocitos normales HEK001 la CI_{50} aumenta a $12,06 \pm 0,68 \mu\text{M}$. La línea tumoral SCC9 es más resistente a la acción de dicho péptido y su CI_{50} asciende a $34,9 \pm 1,18 \mu\text{M}$. El péptido LfcinB[20-25]₂ también presenta actividad citotóxica frente a las líneas celulares FaDu y HEK001, si se compara frente al motivo mínimo su acción citotóxica no es significativamente diferente para las células FaDu ($p=0,533$) ni para las células HEK001 ($p=0,1250$) sin embargo, como se verá más adelante este péptido es permeable y genera cambios morfológicos en la membrana celular asociados con muerte celular, por ende no se descartó su acción citotóxica. Es importante también notar que la acción del péptido LfcinB[20-25]₄ es altamente citotóxica incluso en las células normales no tumorigénicas. Otro péptido que presenta resultados interesantes es Lfcin[21-25]_{Pal}, que corresponde a la secuencia palíndroma RWQWRQWR, esta tiene una carga catiónica +3 y tres residuos de Trp que le confieren mayor hidrofobicidad y una posible mejor interacción con la membrana celular. Su actividad citotóxica en línea celular FaDu es significativamente mayor frente al motivo mínimo ($p=0,0001$), por otro lado, la línea celular SCC9 es resistente a su acción. A diferencia del péptido LfcinB[20-25]₂, la secuencia palíndroma es menos citotóxica para los queratinocitos normales.

Tabla 2-3-1. CI_{50} para los péptidos polivalentes diseñados a partir de RRWQWR.

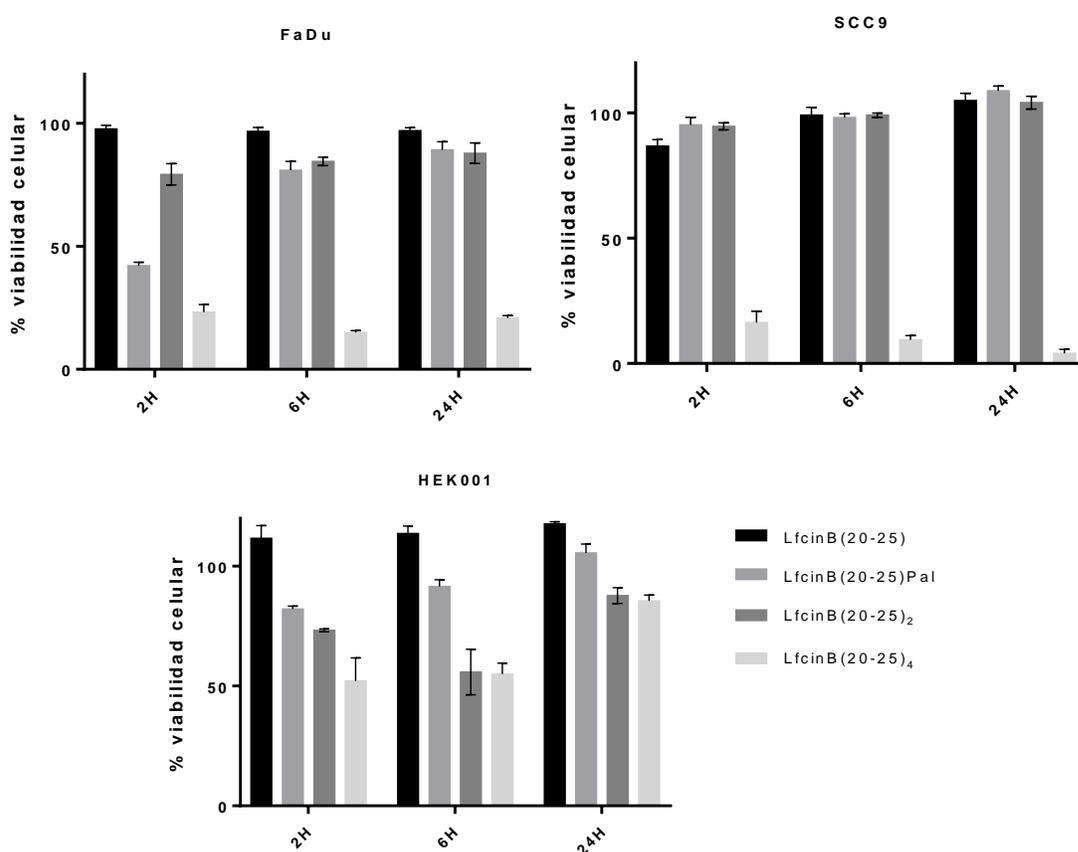
Péptido \ Línea celular	CI_{50} (promedio \pm S.E.M. μM)		
	FaDu	SCC9	HEK001
LfcinB[17-31]	>200	>200	>200
LfcinB[20-25]	>200	>200	>200
LfcinB[21-25] _{Pal}	$90,5 \pm 7,4^*$	>200	>200
LfcinB[20-25] ₂	$185,3 \pm 34,8$	>200	$157,9 \pm 26,9$
LfcinB[20-25] ₄	$7,3 \pm 0,26^*$	$34,9 \pm 1,18^*$	$12,06 \pm 0,68^*$

*Significativamente diferente a LfcinB[20-25]. Test de Dunnet.

En relación al tiempo de tratamiento el péptido LfcinB[20-25]₄ disminuye la viabilidad celular a partir del tiempo más corto evaluado (2 h) a una concentración $12,5 \mu\text{M}$ para las líneas celulares FaDu y HEK001 y una concentración $50 \mu\text{M}$ para SCC9, teniendo en cuenta que esta última es más resistente a la acción de los péptidos sintetizados (figura 2-3-3). Después de 6 y 24 h de tratamiento, la acción del péptido tetramérico es tal que disminuye la viabilidad celular en función del tiempo, es decir toda la monocapa es alterada

por la acción del péptido e incluso las células sobrevivientes a la acción del péptido entran en proceso de muerte celular. Solamente los queratinocitos normales recuperan su viabilidad celular en función del tiempo. Diferente es el caso del péptido LfcinB[20-25]_{Pal} 100 μ M, el cual disminuye la viabilidad celular en un tiempo corto de tratamiento, después de 6 y 24 h el péptido como reactivo limitante se consume y las células sobrevivientes proliferan aumentando la viabilidad celular. La acción en función del tiempo del péptido LfcinB[20-25]₂ en la línea celular HEK001 no es clara, adicionalmente se evaluaron otros parámetros de la interacción entre este péptido y los queratinocitos normales para determinar la posible selectividad de este péptido.

Figura 2-3-5: Actividad citotóxica de los péptidos polivalentes a 2, 6 y 24 h de tratamiento (200 μ M).



Diferentes estrategias para aumentar el potencial citotóxico de los péptidos derivados de LfcinB han sido propuestas. Por ejemplo, la sustitución de los residuos de Trp-6 o de Trp-8 con residuos de cadenas aromáticas más voluminosas (tri-tert-butil-triptófano) aumentó

la citotoxicidad de la secuencia LfcinB[17-31] frente a líneas celulares de melanoma y carcinoma mamario y colorectal (60). Existen también dos zonas dentro de la secuencia de la LfcinB con diferente densidad de carga catiónica. El intercambio de las Arg de la zona con menor carga catiónica hacia la zona donde se ubican la mayoría de aminoácidos básicos (Arg y Lys), en la estructura helicoidal propuesta por Onishi J et al (2008) (61), aumentó la actividad citotóxica frente a líneas celulares de leucemia HL-60, lo cual indica que no solamente la carga neta de los péptidos juega un papel importante en su potencial citotóxico, sino también la disposición de los residuos básicos en la estructura secundaria del péptido. Como ha sido descrito por Yang N et al (2002) (62), la secuencia LfcinB y sus péptidos lineales derivados tienen una conformación de tipo *random-coil* cuando se evalúa en buffer de fosfatos, esta estructura se conserva incluso en la presencia de TFE (37). Existen diferencias en la estructura secundaria de los péptidos polivalentes diseñados (tetramero, dímero y palíndromo) lo cual indica que la aproximación realizada en el diseño de estructuras polivalentes afecta además la estructura secundaria de los péptidos.

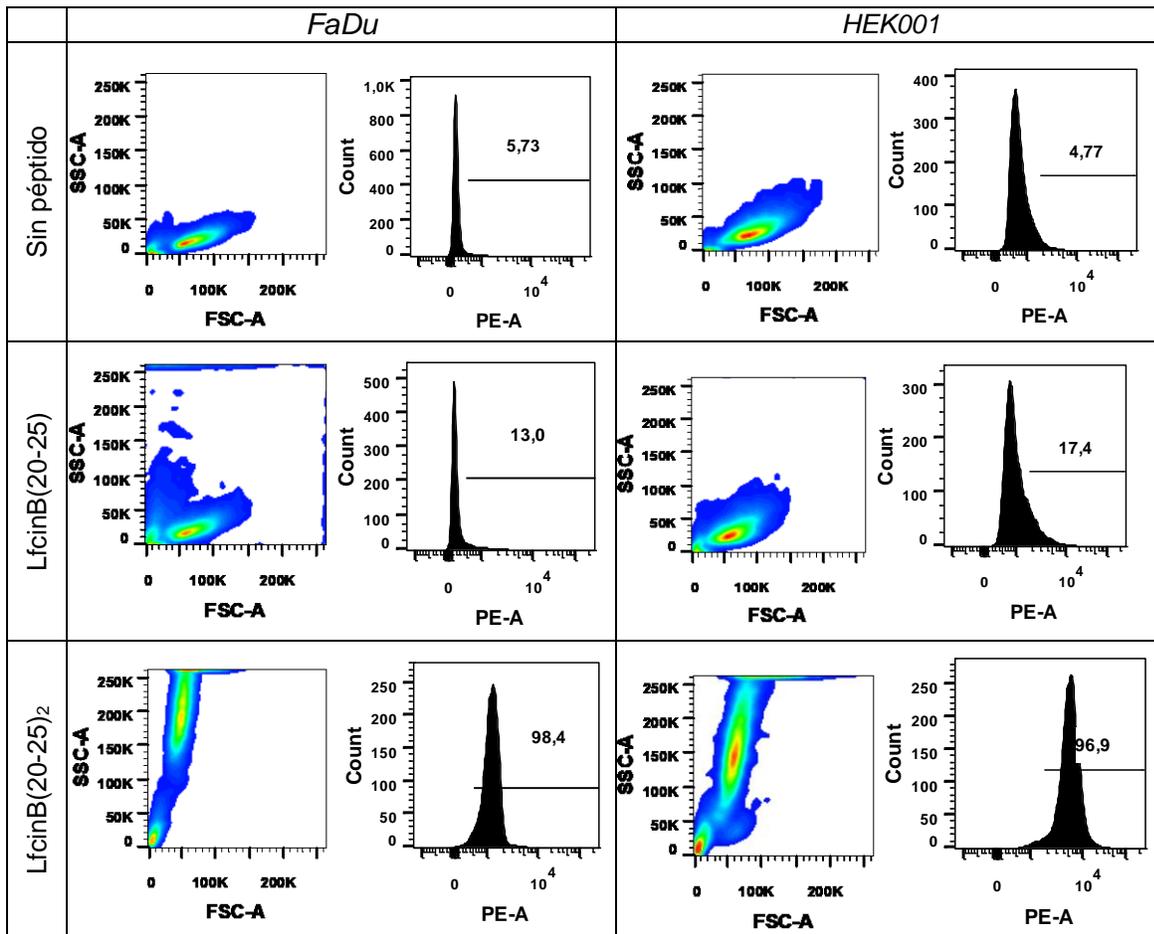
El diseño de los péptidos polivalentes ha permitido obtener resultados promisorios a lo largo del trabajo del grupo de investigación (45). La forma tetramérica exhibe la mayor acción citotóxica frente a líneas celulares de carcinoma oral (43,44) y líneas de carcinoma mamario (42). Sin embargo, la actividad hemolítica (39) y la poca selectividad hacia las células escamosas cancerígenas, condujeron a la evaluación de la interacción del dímero LfcinB[20-25]₂ con las células y la posible acción antiproliferativa en el modelo animal.

2.4 Permeabilidad celular - Citometría de flujo

La disrupción de la membrana celular y la internalización de los péptidos se evaluó mediante citometría de flujo sometiendo las células al tratamiento con el dímero LfcinB[20-25]₂ biotinilado, el cual genera un complejo fluorométrico con la proteína estreptavidina para la detección en el citómetro. Siguiendo la metodología descrita para subcultivo (ver 2-1-2) se obtuvo una suspensión celular $2,0 \times 10^5$ células/mL en medio de cultivo sin complementar para cada una de las líneas evaluadas: HEK001 y FaDu. A esta suspensión celular se adicionó la solución del dímero LfcinB[20-25]₂ biotinilado en PBS, con el fin de obtener una concentración final 100 μ M. Se incluyeron en el análisis las células sin tratamiento, además de las células tratadas con el monómero LfcinB[20-25] biotinilado 100 μ M. En caja de 96 pozos fondo redondo no adherente se transfirieron 100 μ L de la

suspensión celular. Después de un tiempo de tratamiento de 2 h, las células se centrifugan a 100xg por 5 min y se desecha el sobrenadante, se realizan dos lavados con PBS: Se adicionó 100 μ L de solución de estreptavidina 1:1600 en PBS y se incubó la placa a 4°C por 30 min, finalizado este tiempo se hicieron los lavados respectivos con PBS. Se resuspendieron las células en 100 μ L de PBS y se analizaron en el citómetro de flujo FACS Canto II BD®.

Figura 2-4-1. Permeabilidad celular - Citometría de flujo



Análisis de células FaDu y HEK001 después del tratamiento con péptidos biotinilados conjugados con estreptavidina (1:1600 en PBS). SSC: side scattered channel. FSC: forward scattered channel. PE-A: absorción de ficoeritrina (intensidad predeterminada del láser utilizada para la detección del complejo biotina/estreptavidina).

La fluorescencia de las células evaluadas después del tratamiento con el dímero LfcinB[20-25]₂ evidencia la permeabilidad del péptido y la posible disrupción de la membrana que se

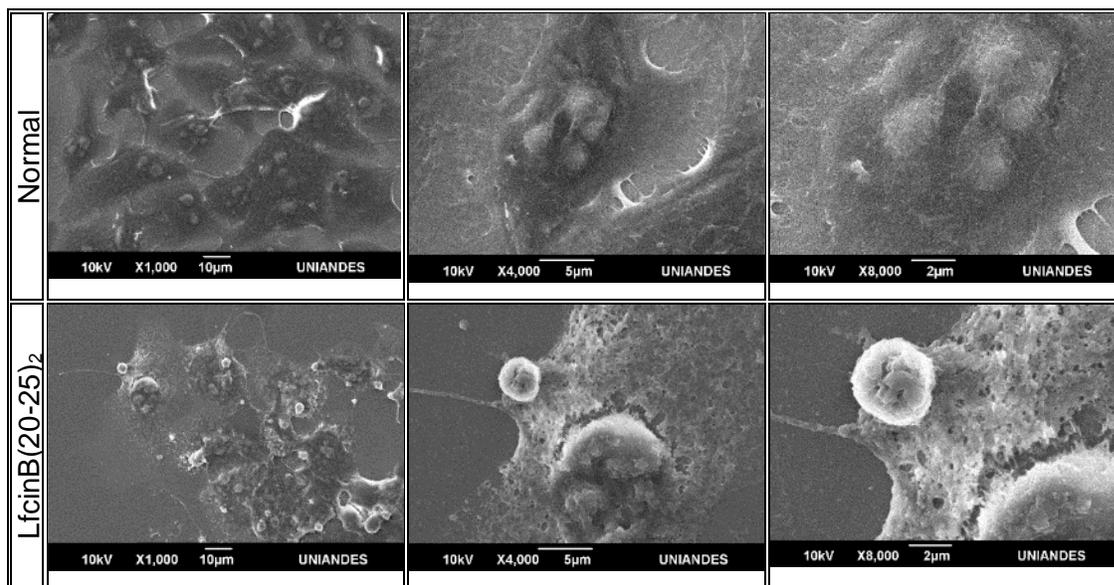
genera por su acción citotóxica, ya que después de retirar el exceso de estreptavidina, el complejo que se forma con el péptido biotinilado permanece al interior de la célula y es detectado mediante citometría. Así mismo, si se compara con las células tratadas con el péptido monómero Lfcin[20-25], este último no tiene la capacidad de internalizarse en la célula y ser detectado mediante fluorescencia, destacando la importancia del desarrollo de moléculas polivalentes diseñadas a partir del motivo RRWQWR en mención. Por otro lado, es importante notar la diferencia de la morfología de las poblaciones celulares, ya que el índice SSC-A es más alto para las células tratadas con el dímero, lo que puede implicar la granularidad y la pérdida de la morfología normal de las células por acción del péptido. No se evidenciaron diferencias en el tratamiento de células FaDu y HEK001, el péptido es internalizado en ambas líneas celulares sin evidenciar selectividad alguna, así mismo se afectó la morfología de ambas líneas celulares, resultado evidenciado por los cambios en los valores de SSC-A.

2.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Con el fin de evaluar los cambios morfológicos en la membrana celular de las células tumorales FaDu, se evaluó la integridad de la membrana mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). El cultivo de $1,0 \times 10^4$ células/pozo en una caja de 6 pozos se realizó sobre laminilla de vidrio previamente tratada y esterilizada. Después de que las células alcanzaron una confluencia aproximada 50-60%, se realizó el tratamiento de las células con el dímero LfcinB(20-25)₂ 100 μ M por dos horas. Finalizado el tiempo de tratamiento, se retiró el medio de cultivo con el péptido y se lavó tres veces con PBS. Las células fueron fijadas con solución de glutaraldehído 3% en PBS bajo agitación constante por 2 h a T ambiente. Los lavados posteriores se realizaron con agua deionizada, filtrada y estéril. Se adiciono solución de tetróxido de osmio 0,5% y se permitió la tinción protegido de la luz por un tiempo de 45 min. Posterior a los lavados con agua correspondientes, se deshidrataron las muestras empleando un gradiente de alcohol:agua (75, 95 y 100%) . También se empleó el secado por fluido supercrítico (CO₂) en el equipo SAMDRI®-795 con el fin de conservar la estructura tridimensional de la muestra. El recubrimiento con oro se realizó empleando el equipo metalizador Desk IV ® con nanopartículas de 100 Å. Finalmente, las laminillas fijadas, deshidratadas y recubiertas se analizaron en el microscopio JEOL, modelo JSM 6490-LV.

El daño causado por la acción del péptido LfcinB[20-25]₂ en la membrana celular es evidente por los poros que se forman en las extensiones citoplasmáticas de la célula, se observa la diferencia entre la apariencia tersa y continua de las células sin tratamiento y la porosidad de la membrana de las células tratadas con el péptido. Además, se observa el proceso de des-adherencia de la monocapa con protuberancias y esferización del contenido celular, signos que evidencian la muerte celular.

Figura 2-5-1. SEM de células tumorales FaDu



La interacción de los péptidos polivalentes con las células permite determinar la acción citotóxica de los péptidos, haciendo énfasis en el daño estructural de la membrana celular, acorde a la teoría más difundida del mecanismo de acción por necrosis de los péptidos derivados de LfcinB. Esto incurre en la importancia del diseño orientado a mejorar la interacción con la membrana, sustituyendo aminoácidos para mejorar la carga catiónica del péptido y la hidrofobicidad, además las estructuras diméricas y tetraméricas aquí presentadas son de gran interés para superar algunas limitaciones relacionadas con el tiempo de vida media del péptido y su estabilidad.

3. Implementación de modelo de carcinoma oral inducido en Hámster

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro*, se determinó que el dímero LfcinB[20-25]₂ es citotóxico para las líneas celulares tumorogénicas SCC9 y FaDu, además que la citotoxicidad no es tan alta frente las células normales HEK001, así como es menos hemolítico que su homólogo el tetrámero Lfcin[20-25]₄ (39). Se escogió el dímero para la evaluación de su posible actividad anticancerígena frente al carcinoma de células escamosas de la cavidad oral en hámster sirio. El carcinoma es inducido químicamente por aplicación tópica del hidrocarburo poliaromático 7,12-dimetilbencenantraceno (DMBA). Con este propósito fue necesario implementar el modelo mediante ensayos piloto, en los cuales se determinó la variabilidad del modelo, los cuidados necesarios con los animales, se evaluó si la concentración y la frecuencia de aplicación del carcinogénico generaban las neoplasias macroscópicas necesarias para el tratamiento, entre otros factores inherentes al trabajo con este modelo animal.

La inducción del carcinoma se genera por la aplicación tópica de un hidrocarburo reconocido como cancerígeno. En los inicios del modelo con el Dr. Salley en 1954 (63), se emplearon tres compuestos carcinogénicos: DMBA, metilcolantreno y benzopireno en una concentración de 0,5%. Posteriores estudios conllevaron a la estandarización del modelo (64), actualmente las condiciones más generalizadas son el uso de DMBA 0,5% en aceite mineral, aplicado en el abazón del hámster empleando pincel pelo de Marta, tres veces por semana (65). El carcinoma se desarrolla por un proceso oxidativo que inicia con la unión del DMBA al receptor *Ah* ubicado en la membrana de queratinocitos. El aducto formado es internalizado para la oxidación por citocromo P450 y generación de un epóxido-diol. dicha forma reactiva genera aductos en el ADN tales como el 8-hidroxi-2-deoxiguanina (8-OhdG), el cual está asociado con las transversiones G>T en los genes supresores de tumores como el p53 (66). El modelo permite recrear el proceso de cancerización tal y como ocurre

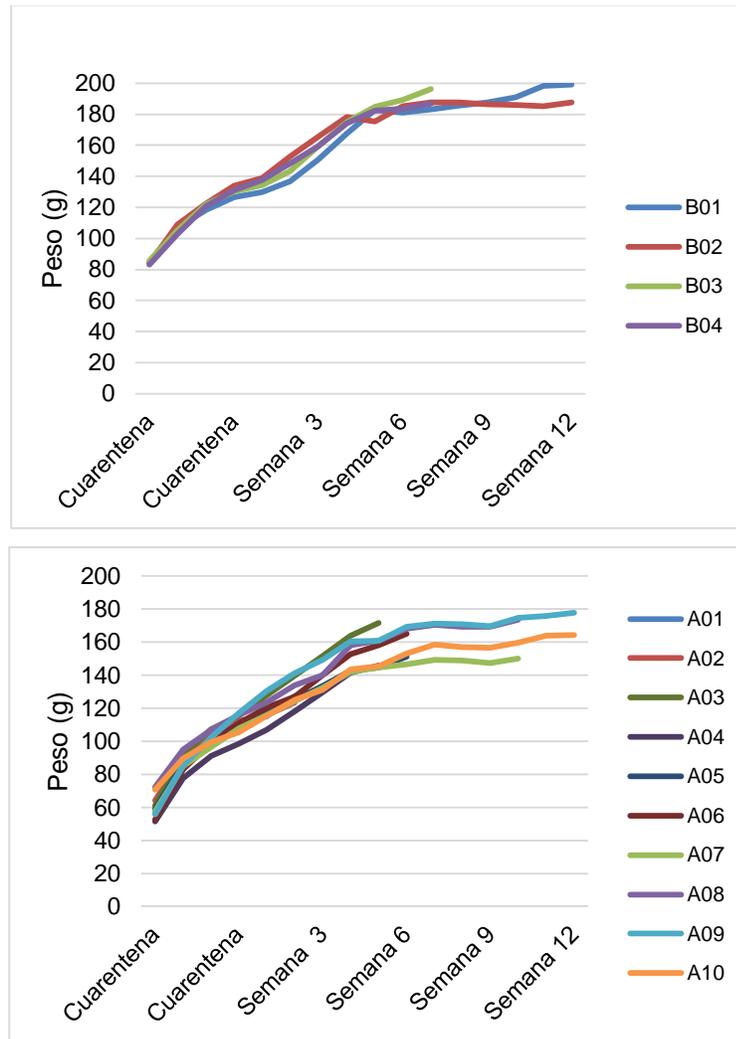
en el ser humano. En primera medida los hidrocarburos empleados son reconocidos agentes cancerígenos que hacen parte de la composición del humo de tabaco. La exposición continua a estos compuestos genera lesiones pre-cancerosas o papilomas y finalmente cuando se desarrolla el carcinoma los marcadores bioquímicos y las alteraciones genéticas son comparables entre el modelo con hámster sirio y en el paciente que contrae esta enfermedad (67). El abazón, donde se desarrollan las lesiones, permite la eversión de esta cavidad para una mejor observación macroscópica y una aplicación del DMBA sin anestesia, además esta zona presenta características epiteliales similares a la mucosa oral humana. A pesar de las ventajas que presenta este modelo de carcinogénesis, es necesario tener en cuenta que a comparación de otros modelos como son los modelos xenógrafos con líneas celulares, el tiempo de inducción del carcinoma es prolongado, requiriendo entre 12-16 semanas para la aparición de neoplasias y carcinoma *in situ*, además son pocos los casos en los que se presenta metástasis hacia nódulos linfáticos, como sí ocurre frecuentemente en estados avanzados de la enfermedad en el ser humano (68). Sin embargo, este modelo permite evaluar las fases del desarrollo del carcinoma ya que el DMBA es un agente inductor y proliferador de células cancerígenas. Durante las primeras semanas de exposición al carcinogénico, ocurre la inflamación del tejido con desmoplasia y fibrosis a nivel microscópico, además es evidente la reacción inmunomoduladora con la infiltración linfoplasmocitaria. Después de la aparición de algunas lesiones pre-malignas, es posible identificar una serie de eventos como lo son hiperplasia, hiperqueratosis, displasia, carcinoma *in situ*, carcinoma infiltrante, con la consecuente evidencia macroscópica de las neoplasias. Estas lesiones no corresponden estrictamente a un tiempo determinado de exposición; por ejemplo, en una misma muestra de un abazón pueden coexistir las diferentes lesiones. (69). Con el fin de determinar la progresión de las lesiones en el proceso de cancerización por aplicación de DMBA en el abazón de hámster sirio y con el fin de implementar un modelo que permitiese la evaluación de la actividad anticancerígena del dímero LfcinB[20-25]₂, se evaluaron las características clínicas e histopatológicas durante la carcinogénesis inducida químicamente en la cavidad oral de hámster sirio. Todos los experimentos con animales se realizaron bajo la aprobación del comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia como aval del macroproyecto “Diseño, síntesis química y caracterización de péptidos derivados de lactoferricina y evaluación de su actividad anticancerígena. Fase II”. Además, se siguió la normativa colombiana para el uso de animales en experimentos de laboratorio (ley 84 de

1989) y las directrices del manual “*Guiding Principles for the Use of Laboratory Animals*” (70).

3.1 Inducción del carcinoma (CECO)

14 hámsteres (*Mesocricetus auratus*), machos, destetados (4 semanas de edad), fueron adquiridos del Instituto Nacional de Salud. Se alojaron dos animales por cada jaula de polipropileno del microaislador (RAIR OneCage®) con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, temperatura promedio de 22°C, provistos de agua y comida estéril (LabDiet 5010®) *ad libitum*. Previa a la inducción del carcinoma, se destinó un tiempo de adaptación de dos semanas para la familiarización del animal con el ambiente y con la manipulación por parte de los investigadores, también durante este tiempo se obtuvieron muestras de sangre y materia fecal para corroborar el status de salud y salubridad de los animales. Durante todos los experimentos ninguno de los animales presentó parásitos o valores anormales de parámetros sanguíneos.

Luego de cuatro semanas de adaptación, cuando los animales tenían 8 semanas de edad y un peso promedio de 100 g, aleatoriamente se distribuyeron los animales en siete grupos, esto con el fin de realizar un sacrificio de cada pareja de experimentación cada tres semanas a partir del inicio de la exposición al DMBA (gráfica 3-1-1). Las 5 parejas del grupo A, (n=10) fueron expuestas al carcinogénico, mientras que las dos parejas restantes, grupo B, (n=4) fueron utilizadas como control. A los animales del grupo A los días lunes, miércoles y viernes a primera hora de la mañana se les aplicó la solución de DMBA (Sigma®) 0,5% disuelto en aceite mineral grado USP. Para esto se empleó pincel pelo de marta, el cual se sumergió en la solución y esta se impregnó tres veces en el abazón derecho evertido del hámster. Después de la aplicación de DMBA se privó a los animales del alimento y el agua por dos horas para evitar la ingesta o dilución del agente carcinogénico. En el caso de los animales del grupo B bajo las mismas condiciones se les aplicó aceite mineral grado USP como control negativo a la exposición. Se llevó un registro detallado de las observaciones macroscópicas, de cambios de comportamiento de los animales o cualquier anomalía en su integridad física. Para la evaluación clínica se contó con el apoyo de profesional médico veterinario calificado, además semanalmente se registró el peso de los animales. Los tumores se midieron empleando un calibrador electrónico, el volumen se definió por la ecuación: $V=0,52*(\text{largo})*(\text{ancho})^2$ (71).

Figura 3-1-1. Peso de los animales hasta las 12 semanas de exposición al DMBA

Grupo B. control sin exposición a DMBA. Grupo A: expuesto a DMBA.

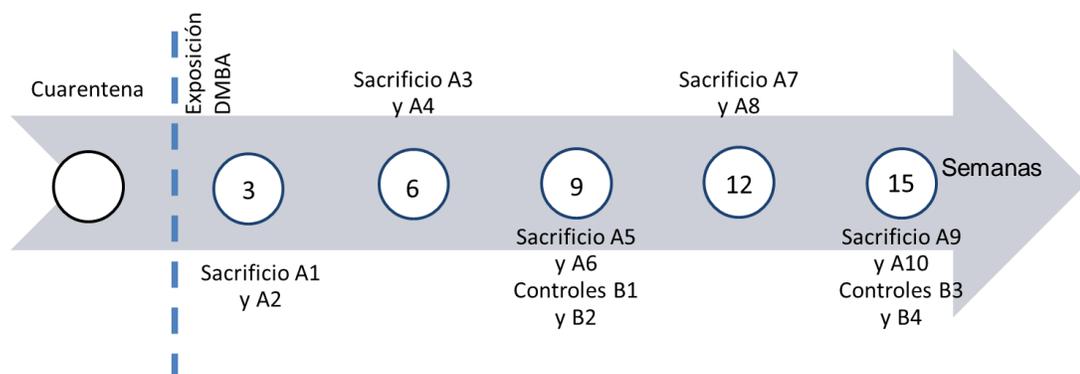
Tres veces por semana durante 12 semanas se aplicó solución de DMBA 0,5% en aceite mineral utilizando pincel pelo de marta realizando la eversión del abazón derecho de cada uno de los animales del grupo A. Al abazón derecho de cada uno de los animales del grupo B se le aplicó aceite mineral libre de DMBA empleando un pincel diferente. Se observa que la curva de crecimiento es constante para todos los animales, incluso aquellos tratados con el carcinogénico. Alrededor de la sexta semana de exposición (14 semanas de edad) los animales alcanzan un peso estable que se mantiene durante el tiempo restante de experimentación. Hasta la semana 12 de exposición al carcinogénico no se evidenciaron lesiones macroscópicas (tumores), fue evidenciada la inflamación y el enrojecimiento del

tejido desde las 2 primeras semanas de exposición. El análisis histopatológico hasta este punto tampoco evidenció cambios morfológicos importantes; sin embargo, como se verá más adelante (3.3 análisis histopatológico), a causa de la masiva infiltración linfocítica se decide iniciar un tratamiento de inmunosupresión con la pareja de animales que a la semana 12 no habían sido sacrificados (animales A09 y A10).

3.2 Eutanasia y autopsia exploratoria

Con el fin de evaluar la progresión de las lesiones a nivel microscópico se programó la eutanasia de cada pareja de animales del grupo A (animales expuestos al DMBA) cada tres semanas desde el inicio de la carcinogénesis (figura 3-2-1). El sacrificio de los animales del grupo B (grupo control) se programó a las 9 y a las 15 semanas de exposición al carcinogénico. La eutanasia se realizó mediante la administración intraperitoneal de 0,5 mL de Euthanex® (pentobarbital – difenilhidantoína). La autopsia exploratoria fue realizada por el personal veterinario calificado. Se obtuvieron muestras de los dos abazones de cada animal (derecho=abazón expuesto a DMBA, izquierdo=abazón contralateral), de la lengua, además de órganos vitales: cerebro, corazón, pulmones, hígado, estómago, intestino grueso, intestino delgado, glándulas adrenales y riñón.

Figura 3-2-1. Esquema propuesto para el sacrificio de los animales expuestos a DMBA



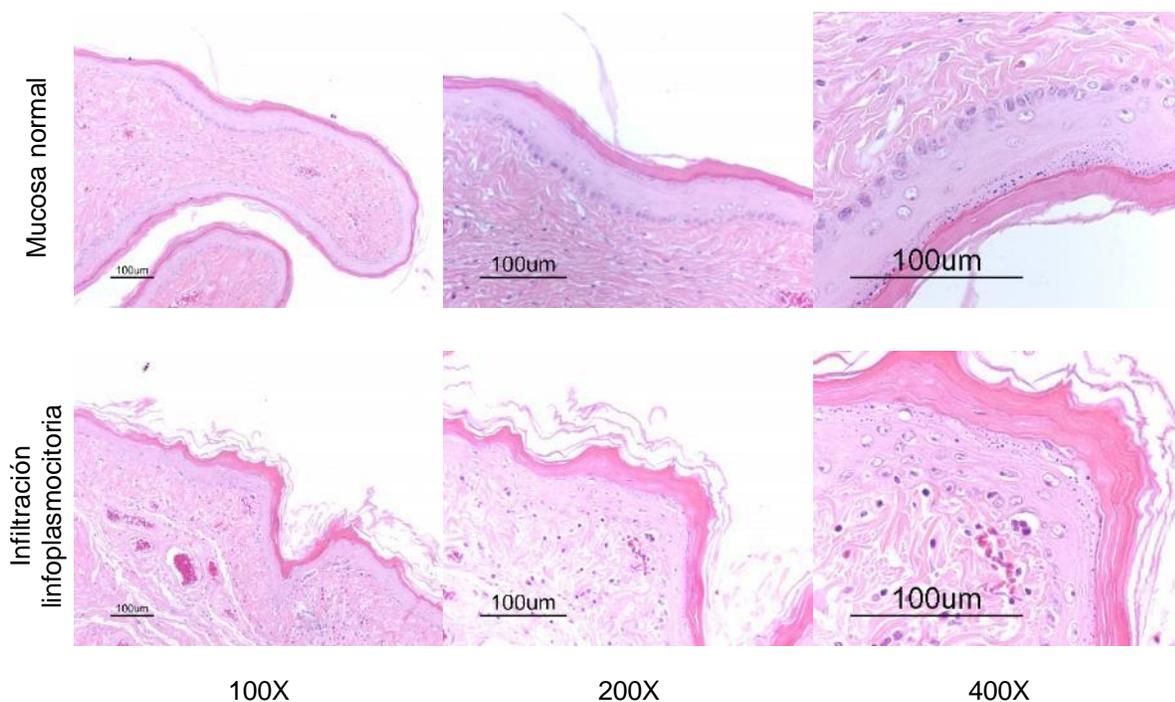
Los sacrificios de los animales se llevaron a cabo dentro del cronograma propuesto hasta la semana 12; sin embargo, para la semana 14 no se evidenciaron signos macroscópicos de lesiones neoplásicas, además con los resultados de histopatología de los 2 animales

se evidenció una marcada infiltración linfocítica en la mucosa de los animales sacrificados para la semana 12 (figura 3-3-1).

3.3 Análisis histopatológico

Las muestras obtenidas en cada una de las autopsias se fijaron en solución bufferada de formaldehído al 3,7% (10% de la presentación comercial al 37%). Embebidas en parafina, se realizó el respectivo corte transversal del tejido y la tinción con hematoxilina y eosina (H&E). La observación y el análisis a ciegas de las muestras se realizó por parte de dos patólogos veterinarios. Una visualización al microscopio 400x permitió visualizar las capas de la epidermis de la mucosa diferenciadas.

Figura 3-3-1. Mucosa del abazón control y expuesto a DMBA (12 semanas)

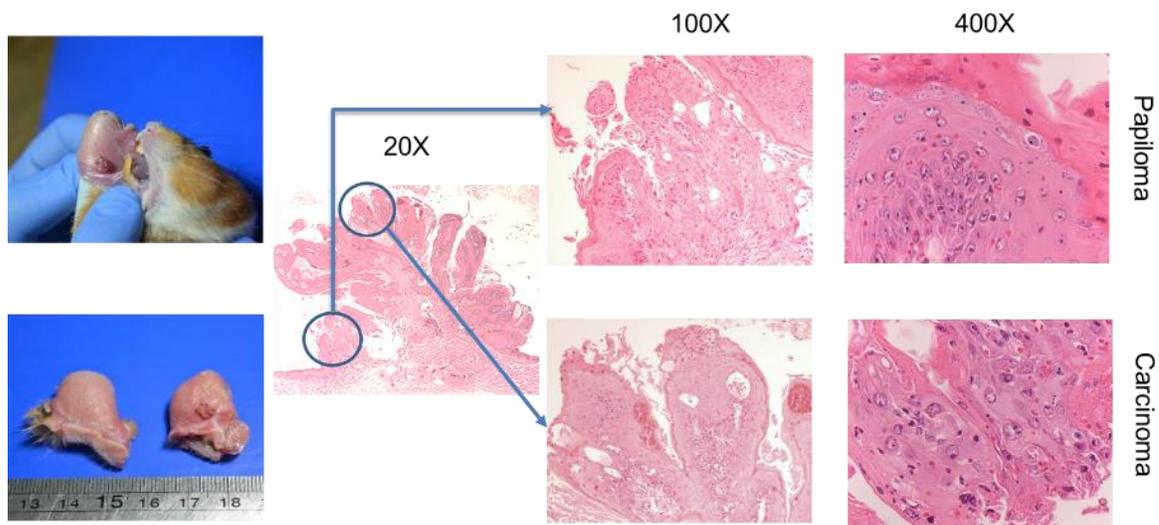


Después de 12 semanas de exposición al DMBA, se evidenció una infiltración linfocítica desde la submucosa hacia la capa epitelial, como se observa en la figura 3-3-1. La lámina basal de células redondeadas es discontinua con la presencia de algunas células displásicas que se disponen hacia la capa epitelial distal, además de una región

hiperqueratinizada (más externa) que se muestra en la microfotografía. La mucosa normal tiene una lámina basal bien diferenciada, con células poliédricas, con núcleo definido, seguidas por el epitelio y la capa más externa de estrato corneo queratinizado, el cual es más delgado en comparación con el tejido que presenta infiltración linfoplasmocitaria. La infiltración linfocítica propia de la respuesta inmune del animal frente al carcinogénico interfiere en el desarrollo de las lesiones de CECO. Considerando que el microambiente de las células en las lesiones pre-cancerígenas puede variar conforme este tipo de hiperplasia se transforme en un nicho de células no diferenciadas, se puede modificar el desarrollo de la enfermedad con la intervención de inmunomoduladores. Las células CD4+ infiltran principalmente hacia la *lámina propria* de las leucoplacas, entre tanto se ubican en el tejido intersticial de los nichos del carcinoma. A medida que el grado de severidad (capacidad infiltrativa) de la leucoplaca aumente, es mayor la concentración de este tipo de linfocitos T hasta que los niveles son más altos en el carcinoma propiamente definido. Las células CD4+ asociadas a la proteína reguladora de la transcripción FoxP3 (también conocidas como células Treg) tienen una acción inmunosupresora, la cual inhibe la acción de citoquinas como el IFN- γ supresor de la angiogénesis y activador de los macrófagos antitumorales M1 (72). La infiltración de las células CD4+ además está facilitada por las citoquinas anti-inflamatorias IL-10, IL-4 y TGF β 1, las cuales promueven un microambiente inmunosupresor, protegiendo las células cancerígenas del sistema inmune (73). Los corticoides, como es el caso de la dexametasona (DEX), cortisol halogenado con flúor lo cual aumenta su vida media en un 50%, actúan en el receptor de corticosteroides desestabilizando el complejo formado con las “heat shock protein 90” y permitiendo la interacción con la maquinaria de la transcripción de diferentes hormonas, receptores y proteínas. Dentro de sus efectos farmacológicos más utilizados se encuentra el efecto inmunomodulador anti-inflamatorio, es decir, se afecta la expresión génica para la transcripción de diferentes citoquinas (IFN- γ), produce cambios en el balance de las expresiones Th1/Th2 que asociadas a células CD4+ actúan como macrófagos de células cancerígenas y aumenta la transcripción de IL-4, esta última inhibe la acción de IFN- γ además está implicada en el proceso de cancerización de las lesiones pre-malignas (74). El uso de dexametasona en el modelo animal puede promover el ambiente anti-inflamatorio necesario en el microambiente de las lesiones hasta el momento en desarrollo, por lo cual se decidió usar este corticoide para superar la barrera de la respuesta inmune de los animales frente a la acción cancerígena del DMBA.

Bajo la asesoría de la médico veterinaria patóloga se procedió a la inmunosupresión de los animales con la administración de dexametasona (DEX) 1mg/Kg de peso vía subcutánea en la escápula del hámster, una vez al día, durante siete días. Adicionalmente, se continuó la aplicación del carcinogénico de forma habitual. Debido al cambio de comportamiento de los animales, luego del tratamiento de inmunosupresión mostrando agresividad durante la manipulación, vocalización a causa del dolor en el área afectada y sangrado durante la aplicación del carcinogénico, especialmente para el caso del animal A09, se decidió hacer el sacrificio de este individuo al cabo de dos semanas de aplicación del carcinogénico, después del tratamiento con DEX (16 semanas de exposición a DMBA en total). Las lesiones macroscópicas evidencian la presencia de un carcinoma exofítico con volumen de 14,3mm³, de apariencia rugosa y cianótica (figura 3-3-2). Se tomaron las muestras respectivas de órganos internos y abazón control para el análisis histológico de la muestra (figura 3-3-3).

Finalizadas 5 semanas de aplicación del carcinogénico posteriores al tratamiento con DEX, no se evidenciaron signos de lesiones cancerígenas macroscópicamente evidentes, por lo cual se procedió al sacrificio de los animales restantes (A10, B01 y B02). La eversión del abazón del animal expuesto al DMBA A10 no se pudo realizar debido a la agresividad que presentaban ante la manipulación del tejido afectado, por lo cual solamente hasta la autopsia exploratoria se logró evidenciar una eritroplaca en el abazón expuesto al carcinogénico. Las características histológicas de la eritroplaca son similares a las descritas para el papiloma concomitante con el CECO en el abazón del individuo descrito a continuación.

Figura 3-3-2. Tumor exófito en individuo expuesto a DMBA-DEX (16 semanas)

La exposición continua a carcinogénicos del epitelio en las diferentes cavidades del cuerpo puede generar la cancerización por campos (*“field cancerization”*), descrita inicialmente por Slaughter y cols. (75). El tumor exófito tiene una amplia extensión de carcinoma con células no diferenciadas, alto recuento mitótico (11/10campos 400X), necrosis y neo-vascularización (ver arriba figura 3-3-2). Al mismo tiempo hacia la base del tumor se encontró una extensión de la lesión con hiperplasia e hiper-queratinización, fibrosis, con infiltración de células redondeadas desde la base hacia el epitelio más distal. Acorde a la teoría de la cancerización por campos, el origen del CECO puede ser multifocal en extensión transversal a través del epitelio, más que el crecimiento en profundidad de un tumor, como ocurre en otro tipo de carcinomas. La evidencia clínica soporta esta teoría, encontrando una correlación fuerte entre la masticación de nuez de areca (gutka-forma tradicional del consumo de tabaco en el sudeste asiático) y la probabilidad de la aparición de tumores multifocales primarios (76). Es por esto que el modelo de carcinogénesis inducida químicamente en hámster sirio es un modelo ideal para evaluar no solamente la actividad de agentes quimiopreventivos y/o antineoplásicos, sino que también permite conocer las características de la enfermedad y su desarrollo. Con el fin de optimizar el modelo y obtener tumores macroscópicamente evidentes, los cuales se puedan medir durante la evaluación de la actividad antineoplásica del dímero LfcinB[20-25]₂, se decidió realizar un segundo ensayo de implementación del modelo, siguiendo la misma metodología hasta aquí propuesta. Adicional a la exposición al carcinogénico DMBA, se incluyó el tratamiento con DEX desde el inicio del ensayo, mediante la administración del

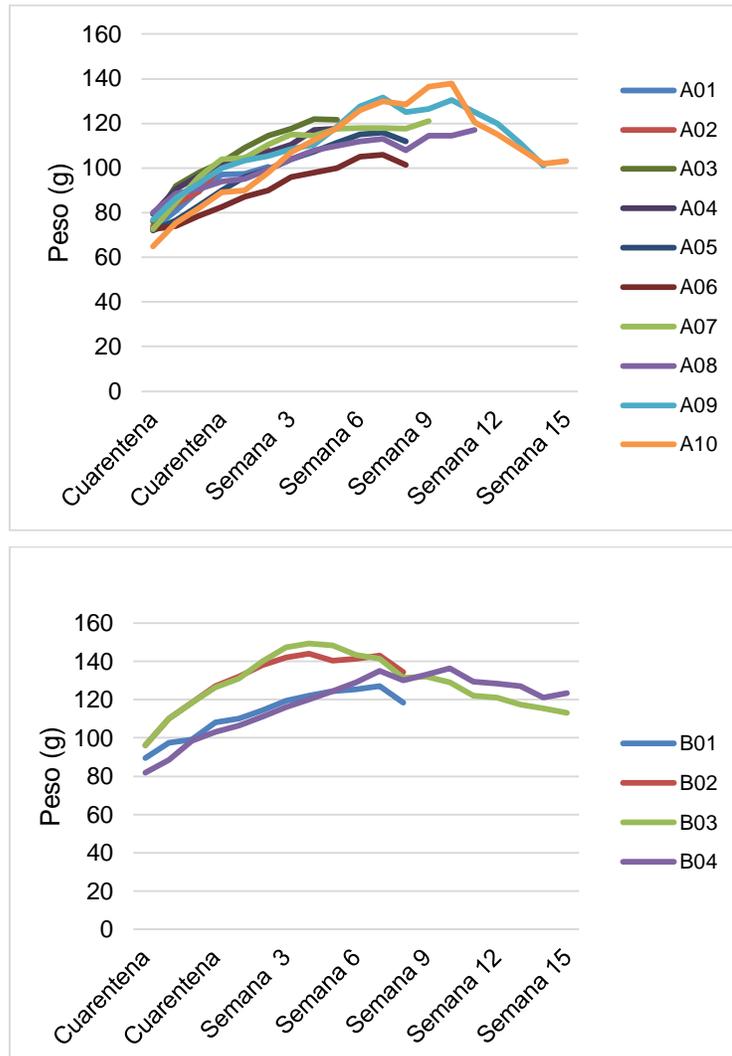
corticoide una vez al día, por siete días, cada tres semanas durante todo el tiempo de experimentación.

3.4 Inducción de CECO en hámster inmunosuprimido

14 hámsteres sirio provenientes del Instituto Nacional de Salud fueron adquiridos para realizar un segundo ensayo para la inducción de CECO por aplicación del carcinogénico DMBA: en este ensayo se propuso un esquema de tratamiento con el corticoide dexametasona, el cual consistió en la administración de 1mg/kg de peso diario, por siete días, cada tres semanas, durante todo el tiempo de exposición al DMBA. La metodología empleada corresponde a los puntos 3.1-3.3.

Durante el tiempo de adaptación (dos semanas) los animales se habituaron al ambiente, a la temperatura, los ciclos de luz/oscuridad y en general a la manipulación constante por parte de los investigadores. El análisis de las muestras hematológicas y coprológicas no evidenciaron anormalidades en el status sanitario y de salud de los animales. Finalizado el tiempo de cuarentena, de forma simultánea, se administró el esquema de tratamiento de DEX y la exposición al DMBA. Se registró el peso de los animales semanalmente (gráfica 3-4-1) y de igual forma se contó con el apoyo del personal médico veterinario para la evaluación clínica.

Figura 3-4-1. Peso de los animales hasta las 15 semanas de exposición a DMBA-DEX



Grupo B. control sin exposición a DMBA. Grupo A: expuesto a DMBA.

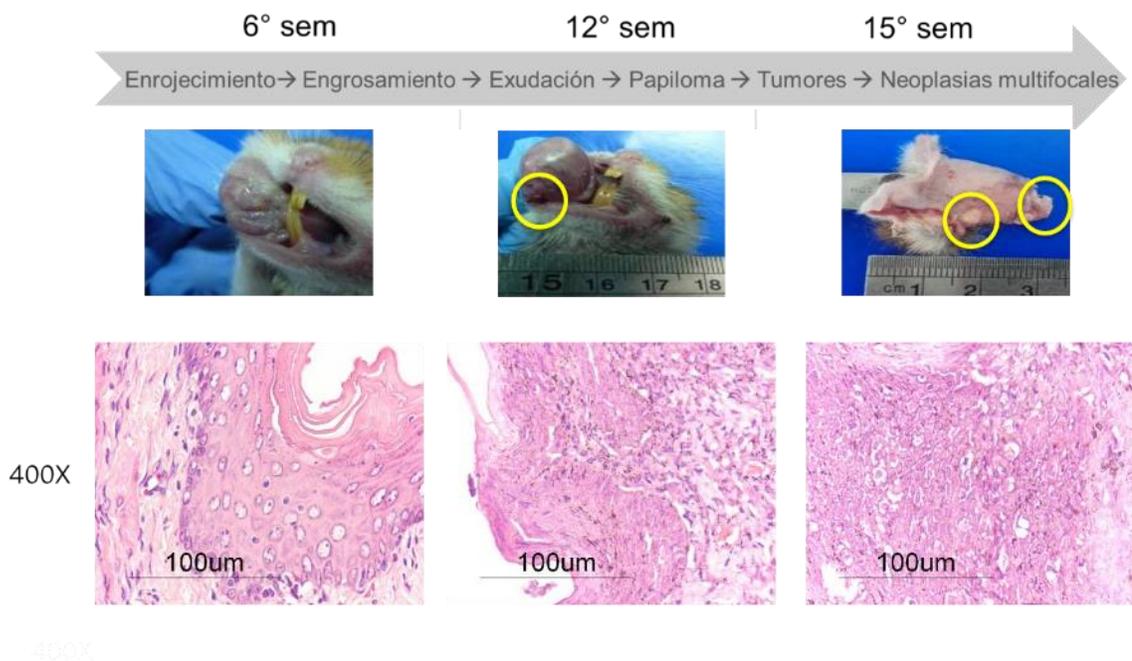
Se observó que alrededor de las 12 semanas de edad (sexta semana de exposición al DMBA) los animales alcanzaron un máximo de peso que se mantuvo estable en los animales del grupo control (figura 3-4-1). Se presenta una disminución de peso del 23% en el animal A09, individuo que desarrolló un absceso de tipo supurativo en el labio inferior del hocico, situación patológica que disminuyó la ingesta de comida por parte del animal. El sacrificio de este individuo se realizó de forma anticipada, en la semana 14 de exposición. El peso del animal A10 alcanzó un máximo de 138,0 g de peso, llegando a la semana 15 de exposición al carcinogénico a un peso de 103,0 g (pérdida de peso del 25%). Dicho sujeto de experimentación presentó masas neoplásicas en la comisura del hocico,

lo cual disminuyó notablemente la ingesta de alimento; así mismo, presentó comportamiento agresivo contra su compañero de jaula por lo cual debió ser aislado después de la semana 10 de experimentación. Dentro del grupo B (control) el individuo B01 alcanzó un máximo de peso de 149,5 g, disminuyendo considerablemente desde la semana 10 hasta alcanzar un valor de 113,0 g (disminución de 24%). A pesar de que el grupo B corresponde a los individuos no expuestos al carcinogénico, la pérdida de peso puede estar asociada al estado inmunológico deficiente de los animales y las alteraciones metabólicas causadas por los glucocorticoides. Dos animales (A07 y A09) fueron sacrificados antes del cronograma propuesto por causas patológicas diferentes a la inducción del carcinoma. El individuo A07 recibió por parte de su compañero de jaula mordeduras profundas en el lomo a causa del comportamiento agresivo que adquieren los animales cuando se desarrollan las neoplasias. El individuo A09 presentó una lesión supurativa de tipo infeccioso en el labio inferior del hocico y pérdida considerable de peso (23% de peso en un tiempo de 3 semanas).

Desde la tercera semana de exposición al DMBA, se presenta enrojecimiento y engrosamiento de la mucosa. 3 de los 10 animales expuestos al carcinogénico presentaron un papiloma rojizo en la comisura del abazón tratado. También la estomatitis y exudación es generalizada para la mayoría de los animales. A la sexta semana de exposición la estomatitis es más evidente con generación excesiva de exudado (figura 3-4-2), además los animales pierden parte del pelo de la comisura del hocico evidenciándose rugosidad en la piel que bordea esta cavidad. Finalizadas las 9 semanas de exposición, los signos no son diferentes de la estomatitis, rugosidad de la mucosa y exudación, 4 de los 6 animales en tratamiento presentan una masa rojiza en la comisura del hocico. Entre las 10 y 12 semanas de exposición aparecen los primeros tumores en 2 de los 4 animales en tratamiento. El individuo A07 fue sacrificado en la semana 11 de exposición, debido a que su compañero de jaula le propició lesiones en el lomo, lo cual deterioró su estado de salud. En la autopsia exploratoria no se evidenciaron lesiones macroscópicas al interior de la cavidad oral. El individuo A08, sacrificado a las 12 semanas presentó una masa rojiza similar a un papiloma, con volumen $6,24 \text{ mm}^3$, el análisis histopatológico dictamina la naturaleza de esta lesión. Al mismo tiempo se evidenció que el animal A09 presentaba un tumor exofítico con volumen de $14,04 \text{ mm}^3$, así 2 de los 4 animales en experimentación presentaron lesiones macroscópicas evidentes. Alrededor de la semana 14 de experimentación el animal A09 desarrolló un absceso supurativo con un diámetro de

aproximadamente 3 mm sobre el labio inferior del hocico, lo cual dificultó la ingesta de comida del animal, evento que se ve reflejado en la disminución de peso durante las últimas dos semanas de vida. La observación detallada de los abazones durante la autopsia permitió evidencia lesiones tumorales multifocales, supurativos, con tejido cianótico y rugoso (figura 3-4-1, 15° sem). Sobresale el tumor cercano a la comisura del hocico con un volumen de 9,75 mm³. Se encontraron 5 masas de diferente tamaño no determinado (diámetro < 1mm).

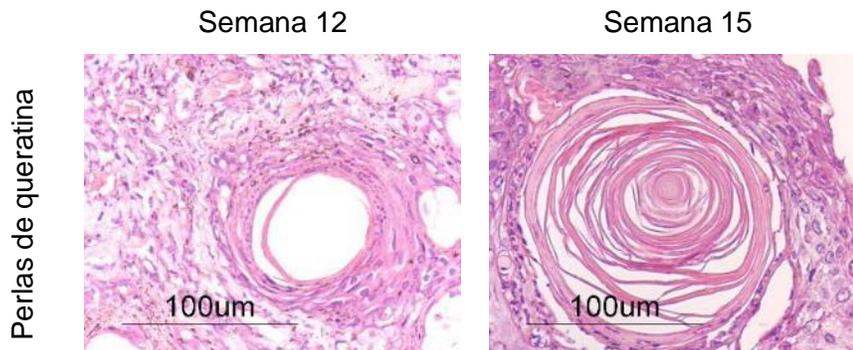
Figura 3-4-2. Progresión macroscópica y microscópica de las lesiones por exposición a DMBA-DEX



A nivel microscópico, a partir de la sexta semana de la toma de muestras histológicas se evidencia la hiperplasia con aumento considerable de la región espinosa e hiperqueratinización, las células de la lámina basal pierden su forma poliédrica tornándose más redondeadas y difusas. Al cabo de las 12 semanas, con la aparición de las primeras lesiones macroscópicas, corresponde el análisis histológico con la displasia y la presencia de células infiltrativas que cambian la morfología de las capas más externas del epitelio, la hiperqueratinización es moderada. Finalmente, hacia el final de las 15 semanas con la presencia de tumores multifocales, se corrobora a nivel microscópico el pleomorfismo nuclear, con pérdida de la lámina basal, hiperqueratosis paraqueratótica (con núcleos en la capa de células queratinizadas), fibrosis y morfología aberrante de las células del

epitelio. Adicionalmente, a partir de la semana 12 se evidenció la formación de perlas de queratina hacia el interior del epitelio incluso infiltrando el tejido conectivo, las cuales se desarrollan de forma concéntrica hacia el final del ensayo (figura 3-4-2).

Figura 3-4-3. Desarrollo de perlas de queratina, lesión indicadora de carcinoma (400X)



La inmunomodulación de la respuesta del hámster ante el carcinogénico DMBA permitió obtener un modelo de cancerización bastante comparable al que se presenta en el ser humano, especialmente cuando la etiología está asociada a la exposición crónica al tabaco, al alcohol o en general sustancias carcinogénicas. Otras alternativas que se han propuesto para realzar el efecto carcinogénico del DMBA incluyen la adición de café a la dieta de los animales (77), la aplicación de nitrosornicotina (NNN), compuesto presente en el humo del tabaco (78) e incluso el aumento de la temperatura que reduce el tiempo de aparición de los tumores (79). Distintas son las formas en las que el modelo puede ser optimizado; sin embargo, la aproximación con corticoides refleja en el hámster el desarrollo de la enfermedad en pacientes inmunocomprometidos. Esta aproximación data desde los inicios del estudio del modelo con el uso de cortisona para alcanzar estados metastásicos (80). El modelo permitió también evaluar el proceso de cancerización por campos, en el que los cambios genéticos y moleculares transforman las células en diferentes zonas del epitelio sin necesariamente tener un foco específico, hasta llegar a la invasión de células malignas (81). Por lo general el proceso de cancerización no es evidente a nivel macroscópico, tal y como ocurre en los pacientes, dadas estas circunstancias el CECO es uno de los cánceres con baja prognosis, ya que su detección se da en estadios avanzados. Para fines del presente trabajo, la implementación del modelo permitió conocer la variabilidad en el desarrollo de las lesiones, el proceso de carcinogénesis a nivel macro y microscópico, las condiciones necesarias para el mantenimiento de los animales, el

esquema de tratamiento con DEX para un efecto inmunomodulador efectivo, el tiempo de exposición para la aparición de lesiones mesurables y finalmente, implementar este modelo para la evaluación de la actividad anticancerígena del péptido LfcinB[20-25]₂. A diferencia de la mayoría de autores que han empleado el modelo para la evaluación de agentes terapéuticos o quimiopreventivos, no se encontraron trabajos que empleen la inmunomodulación como agente sinérgico para minimizar el tiempo de aparición de los tumores y aumentar la severidad de las lesiones. Está documentado que la carcinogénesis en hámster se desarrolla después de 14-16 semanas sin intervención de corticoides, de esta forma este modelo se ha empleado ampliamente para la evaluación de fitoterapéuticos o nutracéuticos en la prevención del CECO (82–86).

4. Evaluación de la actividad anticancerígena de LfcinB[20-25]₂ en modelo animal

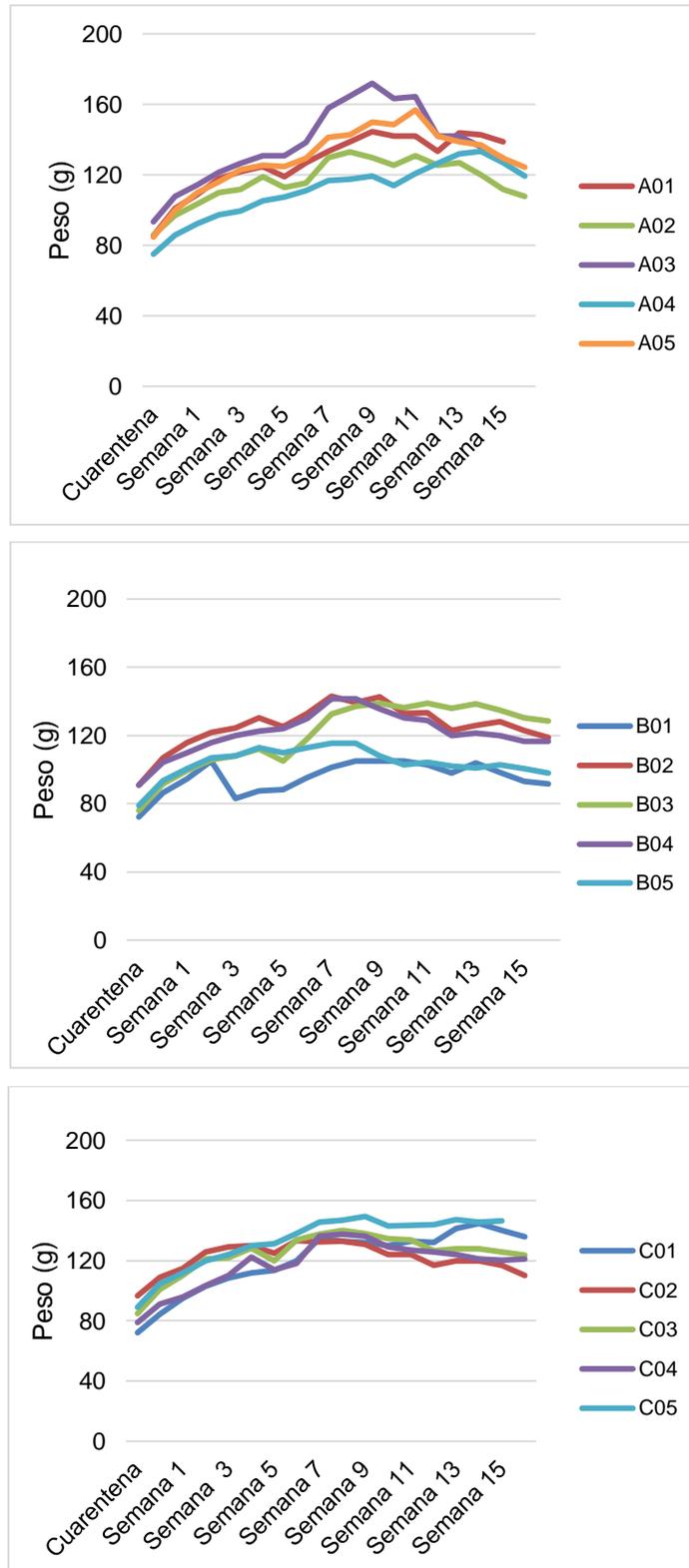
Después de la implementación del modelo de carcinogénesis inducida químicamente en cavidad oral de hámster sirio, se realizó un nuevo ensayo para evaluar la actividad antiproliferativa del péptido seleccionado. En total 20 hámsteres fueron adquiridos del Instituto Nacional de Salud, pertenecientes a la misma cepa utilizada durante la implementación del ensayo (capítulo 3). Los animales con una edad de 4 semanas, fueron transportados al bioterio del Departamento de Farmacia y alojados bajo las mismas condiciones ya descritas. Durante dos semanas, los animales se habituaron al hábitat del bioterio, a la manipulación por parte de los investigadores y se tomaron las muestras hematológicas y coprológicas para el respectivo análisis, ninguno de los animales involucrados en el ensayo presentó anomalías en los resultados de los exámenes de laboratorio.

Después de dos semanas de adaptación se inició la exposición al carcinogénico DMBA y la administración del corticoide DEX con el fin de inducir el desarrollo del carcinoma hasta obtener lesiones macroscópicamente mesurables, así poder determinar el volumen de los tumores y la posible regresión de las lesiones después del tratamiento con el péptido LfcinB[20-25]₂. De manera aleatoria los 20 animales se distribuyeron en 4 grupos así: Grupo A, grupo B y grupo C de seis animales cada uno ($n=6*3$) expuestos a DMBA-DEX, y el grupo D de dos animales control ($n=2$) con aplicación de aceite mineral libre de DMBA y administración simultánea del esquema con DEX. De acuerdo a los resultados obtenidos durante la implementación del modelo, se espera que al menos 3 de cada 6 animales en cada grupo expuesto a DMBA-DEX desarrollen lesiones macroscópicamente visibles. Posterior al desarrollo de las neoplasias, se administró por vía intratumoral cada uno de los tratamientos propuestos: a los animales del grupo A se les administró diariamente 50

μL de solución salina de péptido LfcinB[20-25]₂ 200 μM por un tiempo de tratamiento de 15 días, a los animales del grupo B se les administró una sola vez el volumen de una suspensión de micro-partículas elaboradas con PLGA 50:50 (0,25 dL/g) que contenían microencapsulada la cantidad de péptido LfcinB[20-25]₂ equivalente a 12 dosis, y a los animales del grupo C se les administró 50 μL de solución salina normal (SSN) (control negativo) durante 15 días. A partir del inicio de tratamiento en cualquiera de las tres modalidades, se registraron a diario las dimensiones (largo y ancho) de los tumores. Además de ello, se registró el peso semanal de los hámsteres durante el tiempo de cuarentena, inducción del carcinoma y tratamiento (ver figura 4-1), también se contó con el apoyo del personal médico veterinario para la evaluación clínica de los animales. Finalizado el tiempo de tratamiento, se realizó la eutanasia de los animales para la obtención de muestras histológicas de la cavidad oral, así como de órganos vitales.

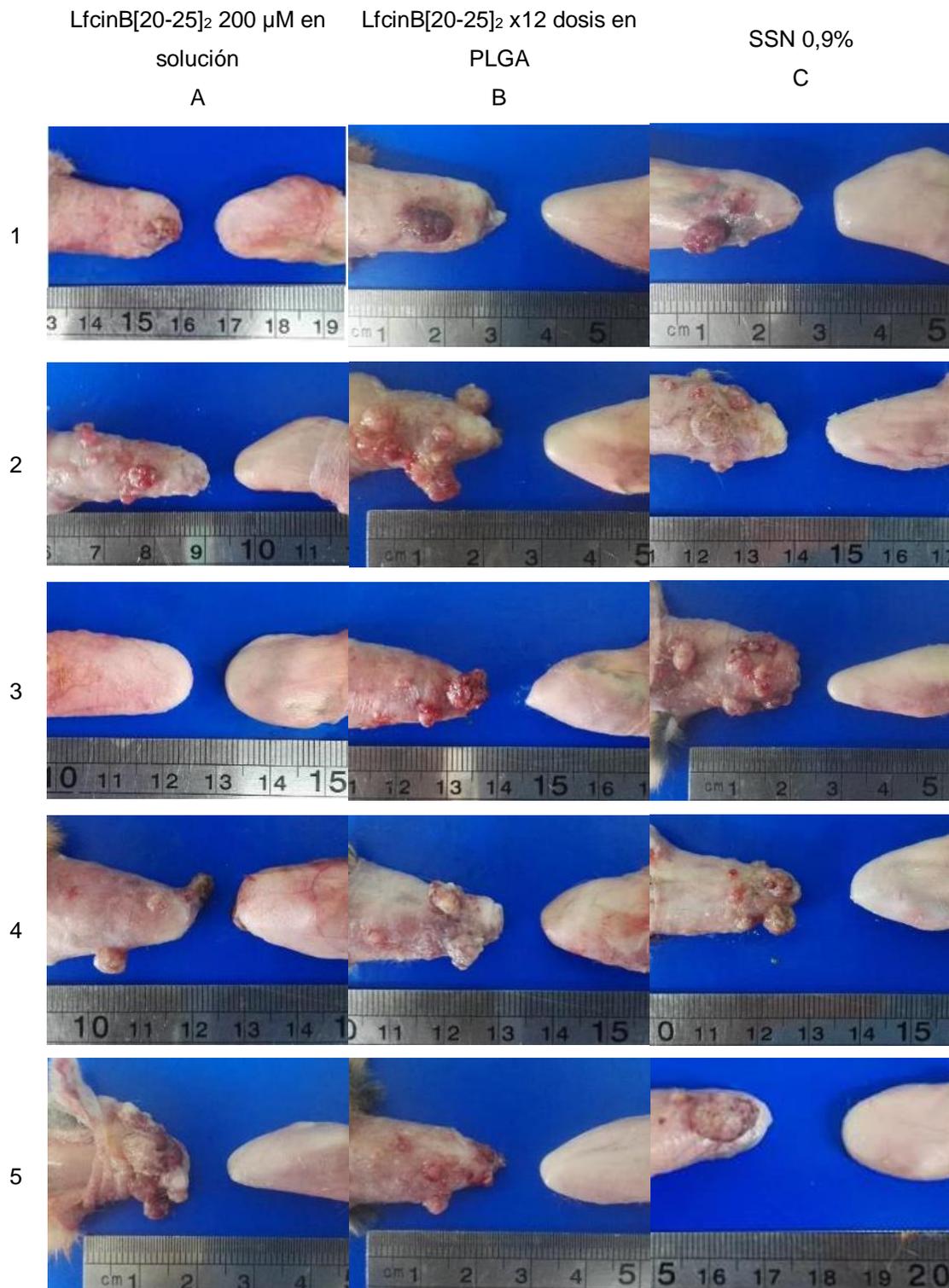
En total 15 de los 18 animales expuestos a DMBA-DEX desarrollaron tumores entre las semanas 12-16. A medida que los animales desarrollaron las lesiones se inició el tratamiento, distribuyendo 5 hámsteres en cada uno de los grupos de tratamiento. Alrededor de las 10 semanas de edad, los animales alcanzaron un máximo de peso que se mantuvo estable hasta el desarrollo de las lesiones, durante el último mes del experimento el peso de los animales disminuye considerablemente. Los animales tratados con el péptido en solución y el péptido encapsulado en las microesferas de PLGA, presentaron una disminución de peso corporal promedio del 15%. El animal C05 fue sacrificado antes de terminar el tratamiento (control negativo SSN), debido a que presentó un volumen de tumor mayor a 300mm³, con impedimento para comer. Además de ello, la tumefacción del tejido alrededor de la zona afectada no permitió everter los abazones lo que dificultó la medición de las dimensiones de los tumores y la observación clínica al interior de la cavidad oral. Los demás animales recibieron el tratamiento completo hasta finalizar los 15 días de tratamiento.

Figura 4-1. Peso de los animales que desarrollaron CECO con tratamiento



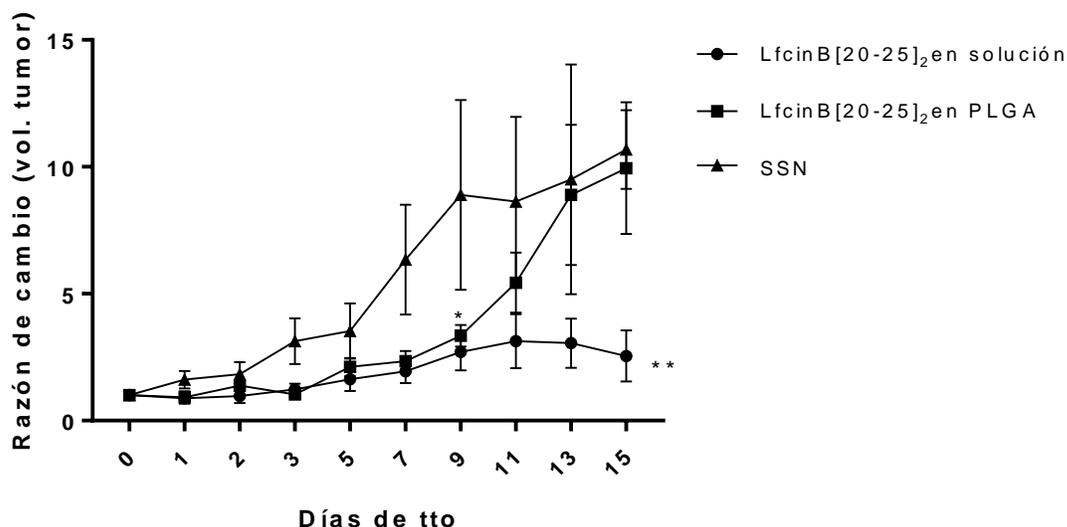
Grupo A. Solución salina de LfcinB[20-25]₂. Grupo B: Microesferas de PLGA-LfcinB[20-25]₂. Grupo C: Solución salina 0,9%

Figura 4-2. Imágenes del abazón tratado y no tratado de cada uno de los animales que desarrollaron CECO, los cuales fueron sometidos al efecto del péptido y la SSN



El tratamiento con la solución de péptido LfcinB[20-25]₂ genera necrosis evidente con ulceración y exudado excesivo. El tumor desarrollado en el abazón del animal A04 presentó coloración café oscuro con necrosis específicamente los últimos días de tratamiento, el tamaño de los tumores multifocales presentados no disminuyó. En comparación al animal A03, este último disminuyó el volumen del tumor progresivamente hasta observarse la ausencia del mismo y como se observa en la figura 4-1, en el presente documento no se presenta la evidencia del tumor que había sido desarrollado antes del tratamiento con el péptido.

Teniendo en cuenta que el péptido sintético es susceptible a reacciones de hidrólisis en el medio enzimático de la mucosa, se decidió trabajar con un sistema de liberación modificada, que además de proteger a la molécula de la degradación proteolítica, permitiera la liberación controlada, mediante una sola administración. A los animales tratados con este sistema de liberación modificada (grupo B) se les administró una sola vez las 12 dosis requeridas para el tratamiento, encapsuladas en micropartículas de PLGA 50:50. El seguimiento de la medida de las dimensiones del tumor y la evaluación clínica de la evolución se realizó durante los 15 días siguientes a la administración de la dosis única. Durante los primeros días de tratamiento se presentó una disminución en el volumen del tumor (gráfica 4-2) y se presentó la necrosis característica del tejido, coloración café oscuro. Sin embargo, durante los últimos días de seguimiento se observa crecimiento del tumor y el tejido presenta alta vascularización, ya que es característico el sangrado durante la manipulación. En la figura 4-1 (grupo B) se observan tumores altamente vascularizados con coloración rojiza. Entre tanto, después de 15 días de tratamiento con inyección intratumoral de 50µL de SSN, en la figura 4-1 se observa cómo el desarrollo de CECO es específico para el abazón expuesto al DMBA. El número de tumores multifocales en el grupo C aumenta durante el tiempo de tratamiento con SSN, aumentando la carga tumoral y empeorando el estado patológico de los animales con sangrado recurrente, vocalización y agresividad.

Figura 4-3. Razón de cambio del volumen de tumor para cada tratamiento

Para cada uno de los animales entre los tres grupos de tratamiento, el volumen del tumor, calculado como se indicó en “inducción de CECO” (ver 3.1), es diferente al inicio del tratamiento (día cero). Por esta razón, es necesario normalizar los valores y evaluar el aumento o disminución (razón de cambio) del volumen del tumor, respecto al valor que tuvo el día cero. La razón de cambio en cada punto se calculó mediante la fórmula:

Ecuación 4-1: Cálculo de la razón de cambio del volumen de tumor para cada animal

$$\text{Razón de cambio} = \frac{\text{Vol del tumor día } n \text{ (mm}^3\text{)}}{\text{Vol del tumor día cero (mm}^3\text{)}}$$

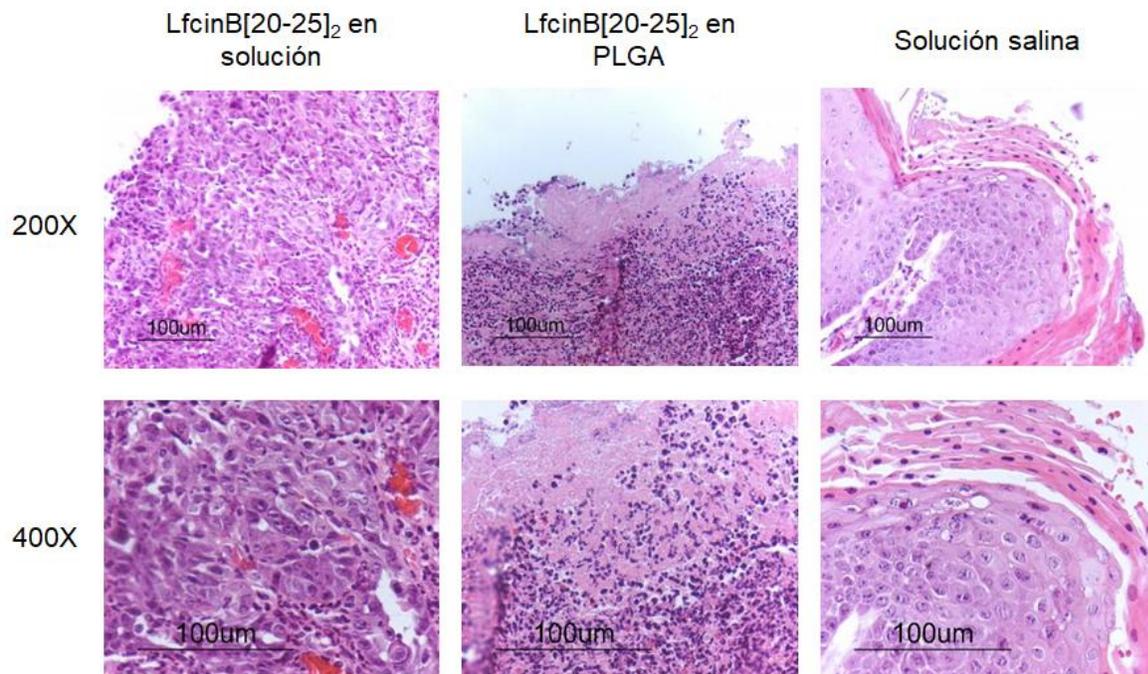
El análisis de varianza entre los grupos de tratamiento se realizó mediante ANOVA de dos vías, con test Dunnet ($\alpha=0,1$) para las comparaciones múltiples a un grupo de referencia (grupo control negativo con SSN), empleando el paquete estadístico GraphPad7®.

En la gráfica 4-2 se representa el promedio de la razón de cambio ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) en cada uno de los grupos de tratamiento durante los 15 días de seguimiento. El tratamiento con el péptido en solución inhibe el crecimiento del tumor con una diferencia significativa en comparación al grupo tratado con SSN, a partir del día 9 ($p=0,007$), hacia el final del tratamiento (día 15) el tratamiento con el péptido en solución no permite que el aumento

del tamaño del tumor llegue a los valores del control negativo (SSN). Por su parte, el sistema de liberación modificado de micropartículas de PLGA 50:50-LfcinB[20-25]₂ es también efectivo en la inhibición del crecimiento del tumor, de manera similar a la inducida con administración diaria del péptido en solución hasta el día 9 del estudio, incluso ocasionando que el tamaño del tumor fuera significativamente menor en el día 9 ($p=0,0167$). Sin embargo, como este sistema corresponde a una sola dosis administrada el día 1 de tratamiento, a partir del día 11 el tumor crece alcanzando un comportamiento similar al crecimiento para el control negativo SSN, este comportamiento sugiere que a pesar de haberse simplificado el número de administraciones con este sistema, sería necesaria la administración de una segunda dosis a partir del día 9. La razón de cambio del volumen de tumor corresponde con las observaciones macroscópicas detalladas anteriormente, así mismo la vascularización del tejido puede ser indicador de angiogénesis que toma lugar durante la ausencia del tratamiento. La forma de entrega del péptido es eficiente para la liberación modificada del péptido, y sugiere un avance importante en el área farmacotécnica, permitiendo que la administración del tratamiento se dé a intervalos de tiempo más amplios (en este caso cada 9 días), más no a diario, como lo requiere la administración de solución del péptido.

La observación microscópica evidencia algunos signos de regresión de las lesiones por acción del péptido, evidenciándose células fusiformes que ocupan los espacios de células ausentes por necrosis. Llama la atención la masiva infiltración linfocítica en los tejidos tratados con el péptido, bien sea en solución o en las microesferas de PLGA, por lo cual se hace recomendación complementar con estudios de toxicidad (administrando el péptido a individuos sanos) que permitan determinar si hay una respuesta inmunogénica frente a la acción del péptido. El carcinoma de los animales tratados con los péptidos es infiltrativo, tejido en el cual se perdió la continuidad y organización de los estratos de la mucosa; mientras que la displasia que desarrolló el animal tratado con solución salina no tiene un carácter infiltrante como es evidente para los casos del tratamiento con el péptido. Es necesario complementar los hallazgos macroscópicos con pruebas inmunohistoquímicas que definan la naturaleza de los marcadores del carcinoma y/o de la actividad antiproliferativa del péptido.

Figura 4-4. Evaluación histológica de los tumores tratados con LfcinB[20-25]₂, LfcinB[20-25]₂ en micropartículas de PLGA y SSN.



Cabe destacar que durante el tiempo de tratamiento se continuó con la exposición al carcinogénico, y así no atribuir alguna disminución en el volumen del tumor a la suspensión de la exposición al DMBA, ya que está reportado que algunos animales pueden revertir las lesiones por sí solos (67). El bienestar de los animales se ve afectado por la condición patológica que padecen, el tumor no permite que el animal pueda ingerir el alimento como lo hace de forma habitual, la vascularización genera sangrado cada vez que se manipula el abazón afectado y es evidente el cambio de comportamiento de los animales tornándose agresivos. El tratamiento con el péptido, a pesar de que no elimina completamente el tumor inhibe el crecimiento para que este no alcance volúmenes similares al de grupo control tratado con SSN. Los hallazgos son similares a los reportados por (44) donde se evidencia que se suprime el aumento del tamaño del tumor con el uso del péptido tetramérico LfcinB[20-25]₄ en una dosis de 100 µg/mL (21,7µM), 4 veces menor a la dosis empleada en el presente ensayo. Las diferencias en las dosis guardan relación con la CI₅₀ hallada en los ensayos con líneas celulares de CECO, resaltando la mayor actividad anticancerígena que ejerce el péptido tetramérico. Sin embargo, durante el desarrollo del presente trabajo se escogió al dímero para la evaluación de la actividad antiproliferativa *in vivo*, ya que tiene

un menor efecto hemolítico (39) y una menor actividad citotóxica frente a células normales no tumorogénicas (HEK001). El estudio de este péptido como alternativa al tratamiento del CECO requiere de una evaluación del efecto antiproliferativo a diferentes dosis. En comparación a otros estudios similares con péptidos derivados de LfcinB, no solamente el efecto antitumoral ha sido de gran interés, otras aplicaciones de estos péptidos como son los dendrímeros acoplados a terapias génicas específicas que son transportados eficientemente hasta el tumor gracias a la asociación con LfcinB, confirman la posible especificidad de este péptido por el tejido cancerígeno (87). La especificidad puede estar asociada como se ha descrito ampliamente por el carácter catiónico y anfipático de los péptidos (88), por lo cual el dímero es propuesto dentro del amplio grupo de péptidos anticancerígenos potencialmente terapéuticos.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se diseñaron, sintetizaron y caracterizaron péptidos lineales y ramificados (polivalentes) derivados de la secuencia de LfcinB mediante síntesis en fase sólida, empleando la metodología Fmoc/tBu. La pureza de los péptidos osciló entre 83-96% y la relación m/z correspondió a la masa monoisotópica.

Los péptidos lineales no disminuyeron el porcentaje de viabilidad celular de las células ATCC FaDu y SCC 9 evaluado mediante la reducción enzimática de resazurina, sin embargo, se evidenciaron signos de muerte celular a nivel microscópico con algunas secuencias, específicamente con los péptidos que conservan el extremo N-terminal inalterado LfcinB[17-31].

Las moléculas polivalentes como LfcinB[20-25]₂, LfcinB[20-25]₄ y LfcinB[20-25]_{Pal} presentaron mayor efecto citotóxico frente a las líneas tumorales evaluadas. La mayor actividad citotóxica la ejerce la forma tetramérica LfcinB[20-25]₄, sin embargo, no es un péptido selectivo, ya que indujo una importante acción citotóxica frente a células normales (ATCC HEK001) y una mayor actividad hemolítica. Por otro lado, se destacó el efecto citotóxico del dímero LfcinB[20-25]₂, el cual es internalizado por las células generando poros y malformaciones en la membrana celular.

La implementación del modelo de CECO en hámster sirio, fue modificado con la inmunosupresión inducida con el corticoide dexametasona. La exposición simultánea a DMBA-DEX permitió el desarrollo de neoplasias al cabo de 12-16 semanas, así mismo se caracterizó el desarrollo de los diferentes estadios del carcinoma.

El dímero LfcinB[20-25]₂ administrado diariamente en solución, promovió la inhibición del crecimiento de los tumores inducidos en el abazón de los hámsteres expuestos a DMBA-

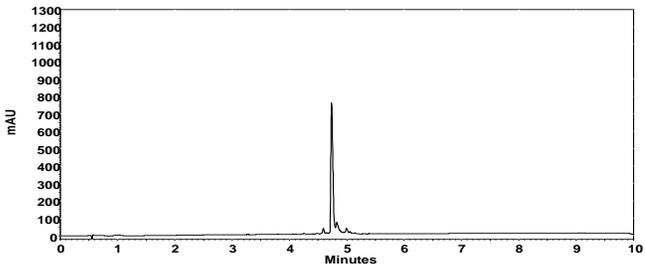
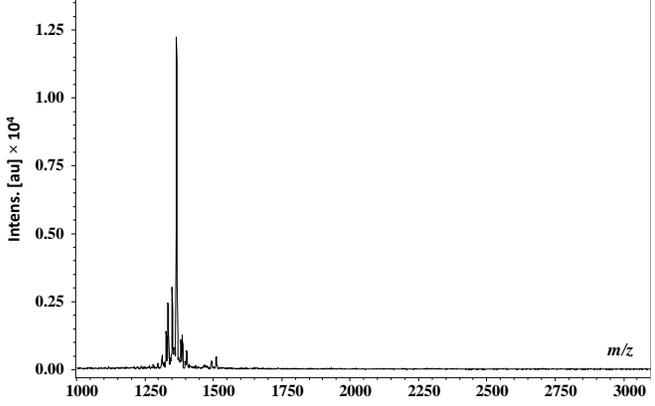
DEX, adicionalmente cuando fue administrado microencapsulado en microesferas de PLGA 50:50, se evidenció que es posible simplificar su esquema de administración.

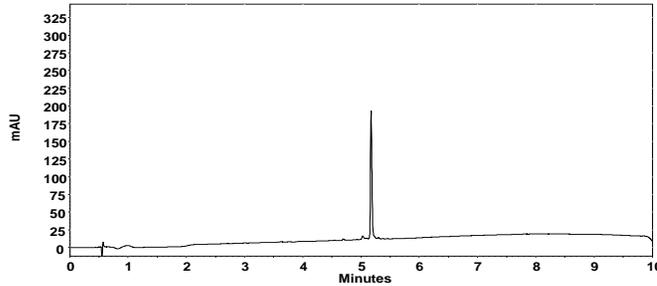
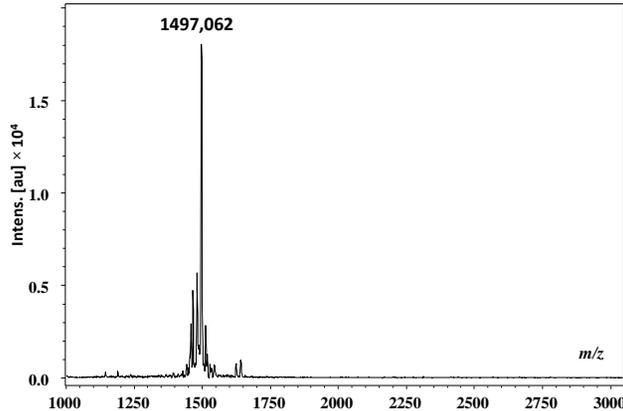
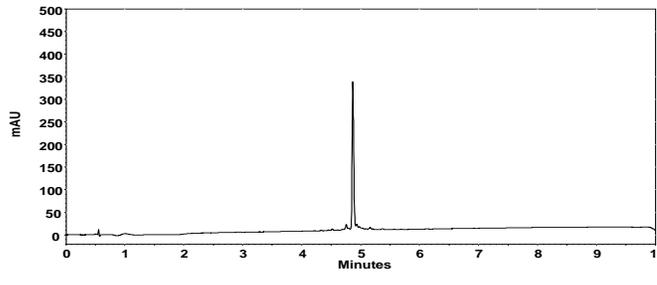
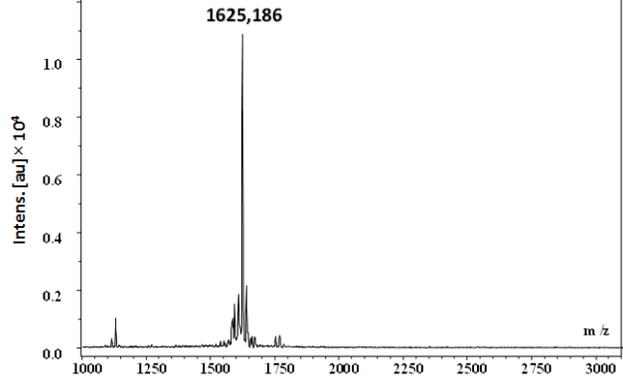
En acuerdo a los resultados derivados de este trabajo es posible sugerir que péptidos sintéticos multivalentes derivados de la secuencia de LfcinB, que contengan el motivo RRWQWR en su secuencia, presentan potencial actividad antitumoral frente a carcinoma oral, cuando son administrados en forma libre o microencapsulados en microesferas elaboradas con PLGA 50:50, contribuyendo de manera preliminar en la búsqueda de novedosas terapias anticancerígenas.

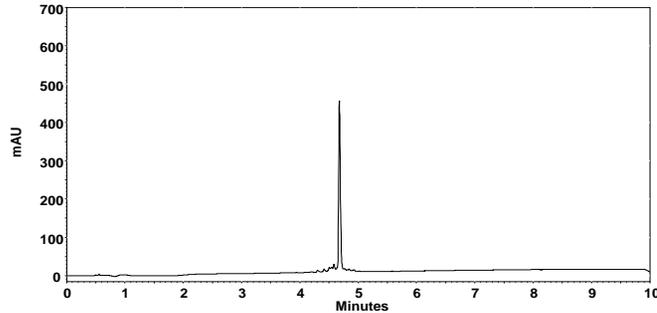
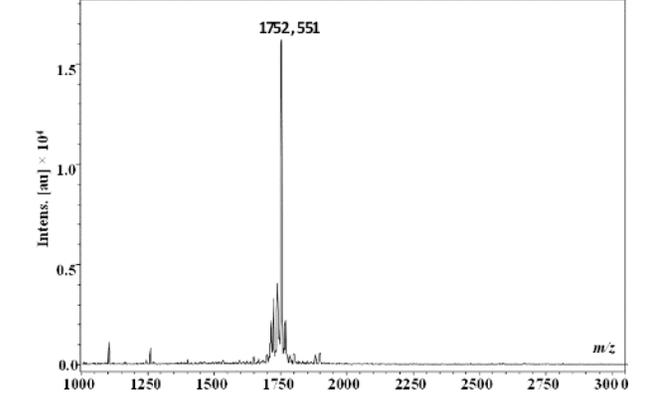
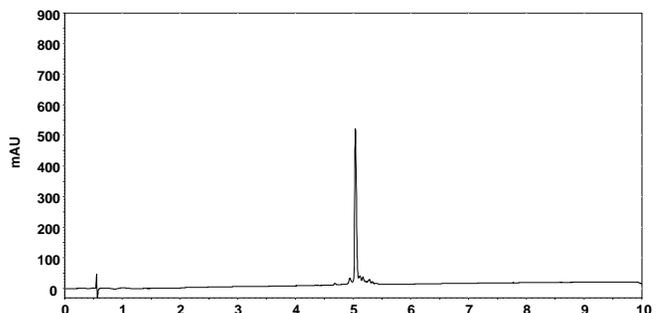
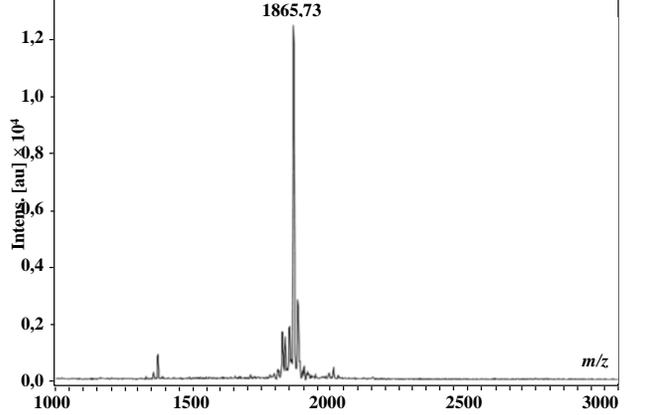
5.2 Recomendaciones

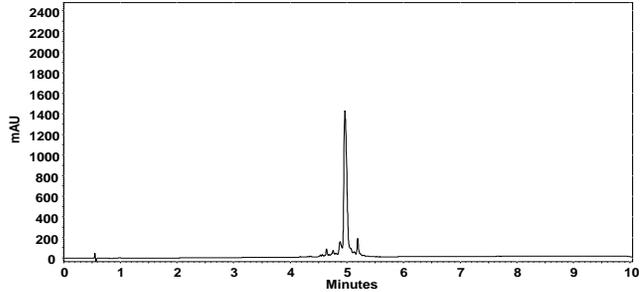
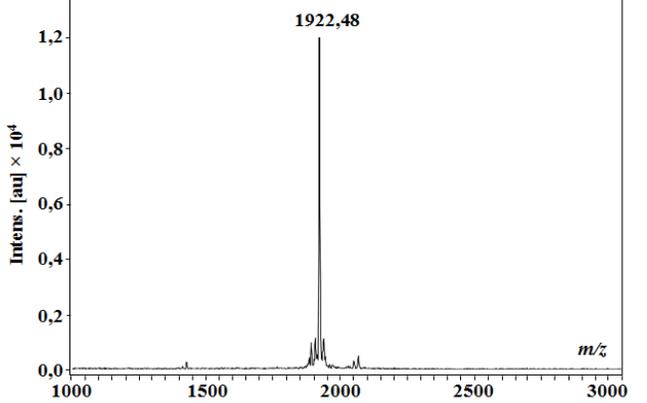
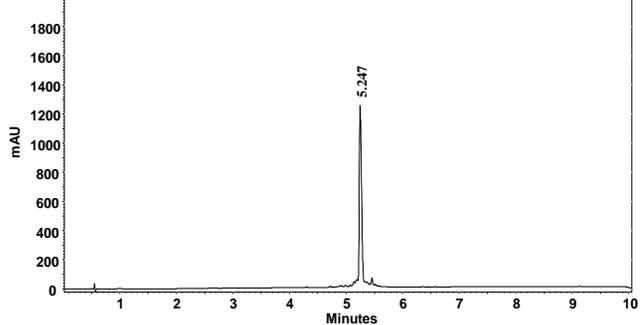
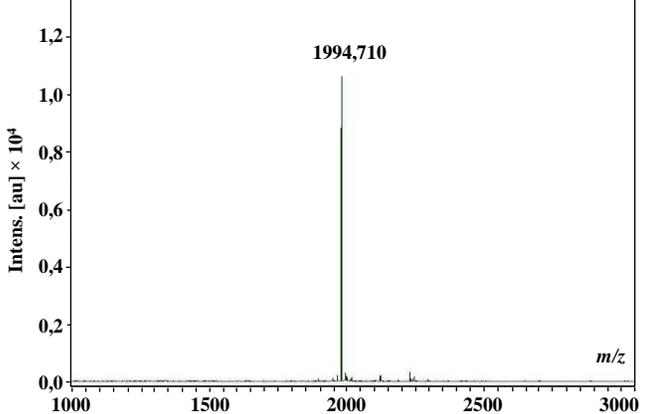
Para dar continuidad a este estudio, se sugiere diseñar nuevas moléculas con modificaciones puntuales en la secuencia, inclusión de aminoácidos modificados e incluso el diseño de estructura fisicoquímicamente más estables que minimice la posible degradación del péptido en el ambiente enzimático del tejido epitelial. Además, se considera importante ahondar en el estudio de cadenas más cortas como LfcinB[20-26], LfcinB[20-27] y LfcinB[20-28] las cuales indujeron signos de muerte celular en la morfología de las células FaDu, pero no evidenciaron cambios en la viabilidad celular por el método de resazurina. También se sugiere complementar los estudios relacionados con la acción citotóxica de los péptidos, con la evaluación del mecanismo necrosis/apoptosis, y el empleo de marcadores específicos de cada uno de estos mecanismos de muerte celular. En el caso de la evaluación en hámster sirio, se sugiere realizar un estudio comparativo dosis/respuesta y la tinción citológica para la evaluación de marcadores específicos de muerte celular en modelo *in vivo*.

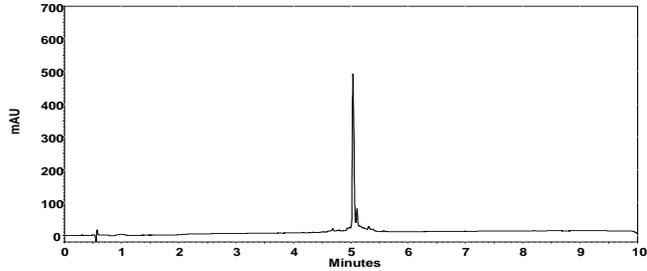
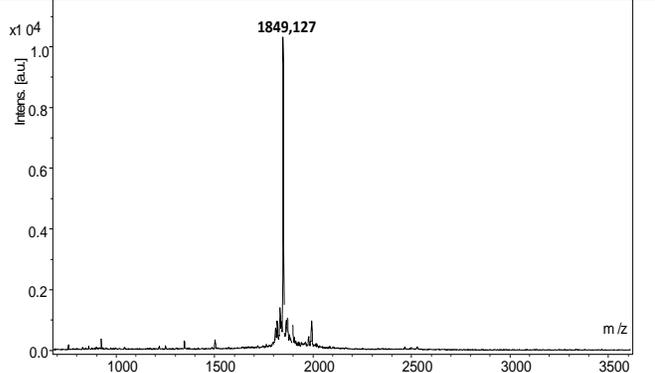
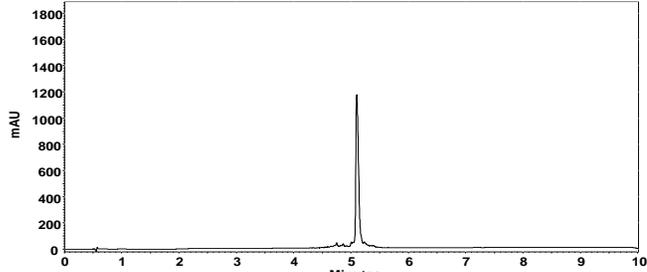
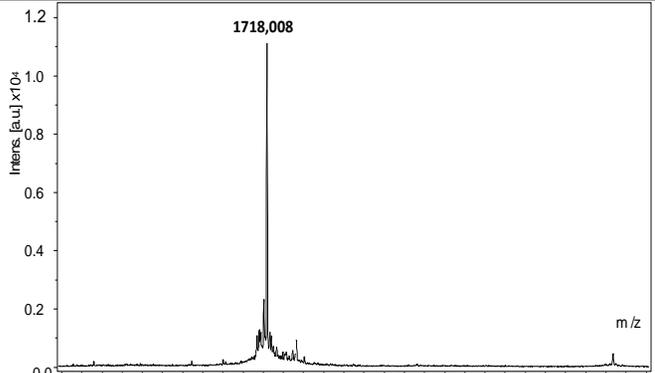
A. Anexo: Caracterización de péptidos derivados de LfcinB

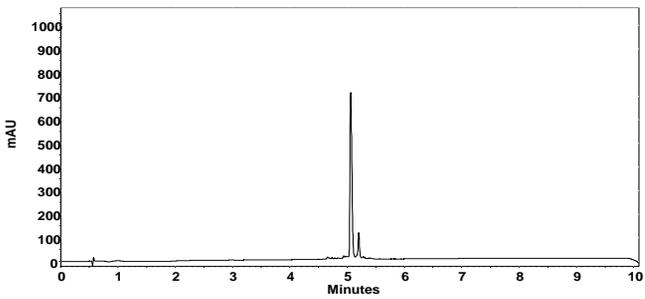
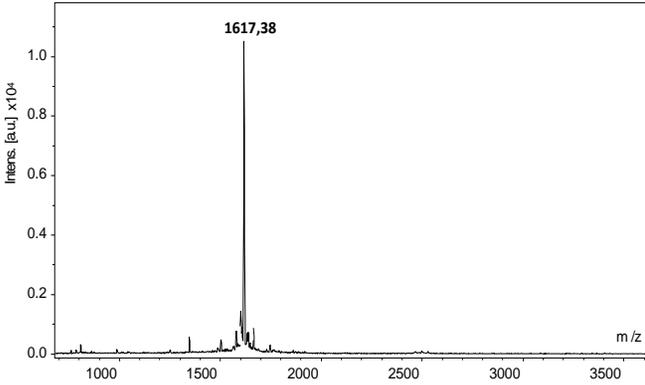
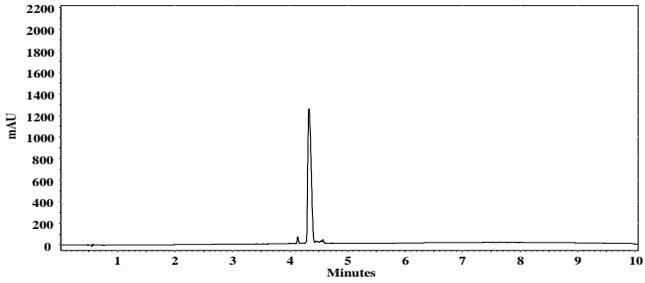
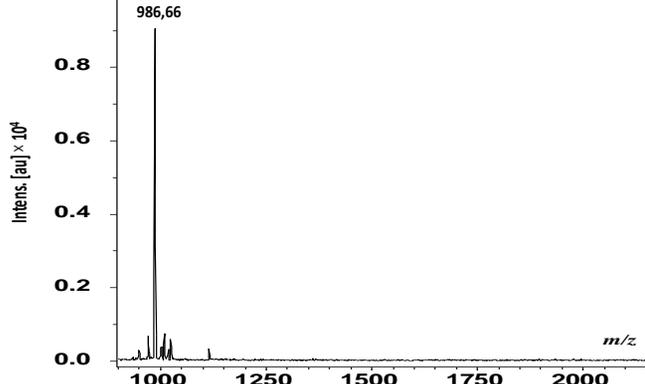
Secuencia	RP-HPLC	MALDI-TOF MS
<p>¹⁷FKCRRWQR²⁵</p>		

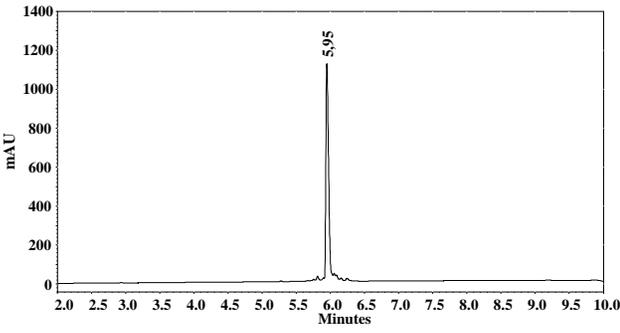
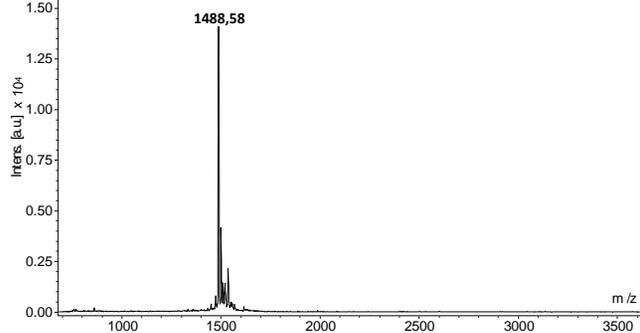
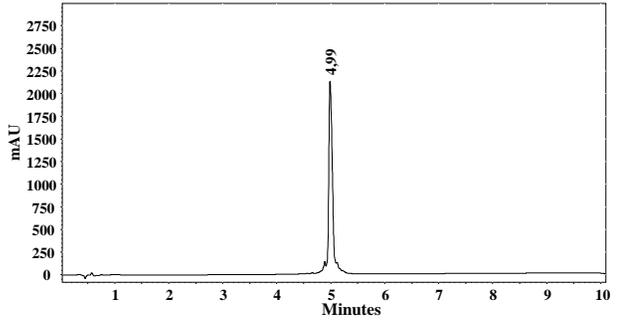
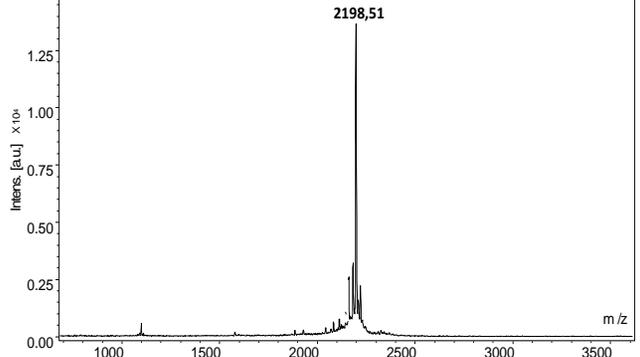
Secuencia	RP-HPLC	MALDI-TOF MS
$^{17}\text{FKCRRWQWRM}^{26}$		
$^{17}\text{FKCRRWQWRMK}^{27}$		

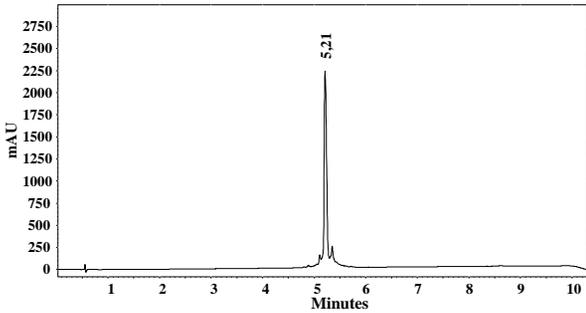
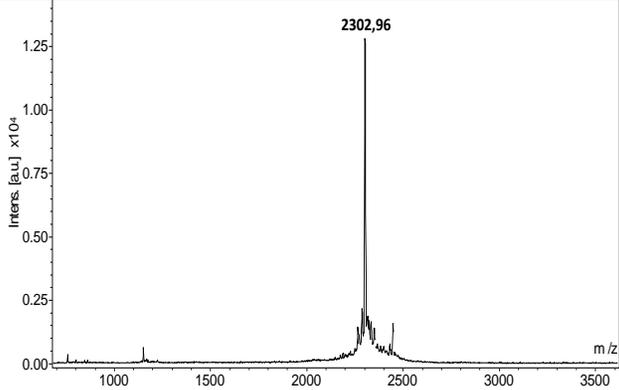
Secuencia	RP-HPLC	MALDI-TOF MS
$^{17}\text{FKCRRWQWRMKK}^{28}$		
$^{17}\text{FKCRRWQWRMKKL}^{29}$		

Secuencia	RP-HPLC	MALDI-TOF MS
$^{17}\text{FKCRRWQWRMKKLG}^{30}$		
$^{17}\text{FKCRRWQWRMKKLG}^{31}$		

Secuencia	RP-HPLC	MALDI-TOF MS
<p>¹⁸KCRRWQWRMKKLGA³¹</p>		
<p>¹⁹CRRWQWRMKKLGA³¹</p>		

Secuencia	RP-HPLC	MALDI-TOF MS
$^{20}\text{RRWQWRMKKLGA}^{31}$		
$^{20}\text{RRWQWR}^{25}$		

Secuencia	RP-HPLC	MALDI-TOF MS
RWQWRWQWR	 <p>RP-HPLC chromatogram for RWQWRWQWR. The y-axis represents mAU (milliabsorbance units) from 0 to 1400. The x-axis represents time in minutes from 2.0 to 10.0. A single, sharp peak is observed at 5.95 minutes, reaching a maximum intensity of approximately 1200 mAU.</p>	 <p>MALDI-TOF MS spectrum for RWQWRWQWR. The y-axis represents intensity in arbitrary units (Intens. [au] x 10⁴) from 0.00 to 1.50. The x-axis represents the mass-to-charge ratio (m/z) from 1000 to 3500. A major peak is observed at m/z 1488.58, with an intensity of approximately 1.45 x 10⁴ au.</p>
(RRWQWR) ₂ KAhx	 <p>RP-HPLC chromatogram for (RRWQWR)₂KAhx. The y-axis represents mAU (milliabsorbance units) from 0 to 2750. The x-axis represents time in minutes from 1 to 10. A single, sharp peak is observed at 4.99 minutes, reaching a maximum intensity of approximately 2200 mAU.</p>	 <p>MALDI-TOF MS spectrum for (RRWQWR)₂KAhx. The y-axis represents intensity in arbitrary units (Intens. [au] x 10⁴) from 0.00 to 1.25. The x-axis represents the mass-to-charge ratio (m/z) from 1000 to 3500. A major peak is observed at m/z 2198.51, with an intensity of approximately 1.25 x 10⁴ au.</p>

Secuencia	RP-HPLC	MALDI-TOF MS
(RRWQWR)₂KAhxC-	 <p>RP-HPLC chromatogram showing a single sharp peak at 5.21 minutes. The y-axis is labeled 'mAU' and ranges from 0 to 2750. The x-axis is labeled 'Minutes' and ranges from 0 to 10.</p>	 <p>MALDI-TOF MS spectrum showing a major peak at m/z 2302.96. The y-axis is labeled 'Intens. [a.u.] x10⁴' and ranges from 0.00 to 1.25. The x-axis is labeled 'm/z' and ranges from 1000 to 3500.</p>

B. Anexo: Participación en eventos y producción académica

Socialización en eventos internacionales:

In vitro cytotoxic effect of synthetic peptides derived from bovine lactoferricin sequence against OSCC cell lines. 6th World Congress of Oral Cancer of the International Academy of Oral Oncology, Bengaluru, India. 2017. Modalidad póster.

Artículos publicados:

Sandra C. Vega Chaparro, J. Tatiana Valencia Salguero, **Diana A. Martínez Baquero** and Jaiver E. Rosas Pérez. *Effect of Polyvalence on the Antibacterial Activity of a Synthetic Peptide Derived from Bovine Lactoferricin against Healthcare-Associated Infectious Pathogens*. Biomed Research International. Volume 2018, Article ID 5252891. <https://doi.org/10.1155/2018/52528912018:12>.

Sandra C. Vega, **Diana A. Martínez**, María del S. Chalá, Hernán A. Vargas and Jaiver E. Rosas. *Design, Synthesis and Evaluation of Branched RRWQWR-Based Peptides as Antibacterial Agents against Clinically Relevant Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens*. Frontiers in Microbiology. 02 March 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.00329.

Artículos en preparación:

Dexamethasone immunosuppressive action enhances the development of OSCC in hamster buccal pouch carcinogenesis model

Cytotoxic effect of bovine lactoferricin derived peptides against oral squamous cell carcinoma: In vitro and in vivo evaluation

Bibliografía

1. International Agency for Research on Cancer. Fact Sheets by Population. 2012;
2. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4–5):309–16.
3. Feller L, Lemmer J, Lemmer J. New “second primary” cancers: review. *South African Dent J.* 2012 May 1;67(4):175–8.
4. Gallegos JF. El cáncer de la cavidad oral: su importancia como problema de salud. *Acta médica Grup Ángeles.* 2012;10(2):69–71.
5. Rocha Buelvas A. Oral cancer: the role of the dentist in early diagnosis and control. *Rev Fac Odontol Univ Antioquia.* 2009;21(1):112–21.
6. Seoane J, Otero-Rico A, López-Cedrún J, Varela-Centelles P. Shorter specialist time intervals are associated with advanced stage on symptomatic oral cancer. *Oral Dis.* 2018 Mar 1;24(1–2):112–4.
7. Uribe López JC. Mortalidad en Colombia por Cáncer oral en el 2008. *CES Salud Pública.* 2011 Dec 20;2(2):187–95.
8. Scully C, Ward-Booth RP. Detection and treatment of early cancers of the oral cavity. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1995 Nov;21(1–3):63–75.
9. Brocklehurst P, Kujan O, O’Malley LA, Ogden G, Shepherd S, Glenny A-M. Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer. *Cochrane database Syst Rev.* 2013 Jan;11:CD004150.
10. Montero PH, Patel SG. Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015 Jul;24(3):491–508.
11. van der Waal I. Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; some considerations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013 Jan;18(1):e33-7.
12. Kansy K, Mueller A, Mücke T, Koersgen F, Wolff K, Zeilhofer H, et al. A worldwide comparison of the management of surgical treatment of advanced oral cancer. *J cranio-maxillofacial Surg.* 2018;46(3):511–20.
13. Furness S, Glenny A-M, Worthington H V, Pavitt S, Oliver R, Clarkson JE, et al.

- Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. *Cochrane database Syst Rev.* 2011 Jan;(4):CD006386.
14. Campos MI, Campos CN, Aarestrup FM, Aarestrup BJ. Oral mucositis in cancer treatment: Natural history, prevention and treatment. *Mol Clin Oncol.* 2014 May 1;2(3):337–40.
 15. Pinna R, Campus G, Cumbo E, Mura I, Milia E. Xerostomia induced by radiotherapy: an overview of the physiopathology, clinical evidence, and management of the oral damage. *Ther Clin Risk Manag.* 2015;11:171–88.
 16. Adelstein DJ. Oropharyngeal Cancer: The Role of Chemotherapy. *Curr Treat Options Oncol.* 2003;4(1):3–13.
 17. Pico J-L, Avila-Garavito A, Naccache P. Mucositis: Its Occurrence, Consequences, and Treatment in the Oncology Setting. *Oncologist.* 1998 Dec 1;3(6):446–51.
 18. Specenier P, Vermorken JB. Cetuximab: its unique place in head and neck cancer treatment. *Biologics.* 2013 Jan;7:77–90.
 19. Bellone M, Iezzi G, Imro MA, Protti MP. Cancer immunotherapy: synthetic and natural peptides in the balance. *Immunol Today.* 1999 Oct 1;20(10):457–62.
 20. Marqus S, Pirogova E, Piva TJ. Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *J Biomed Sci.* 2017;24(21):1–15.
 21. Wu D, Gao Y, Qi Y, Chen L, Ma Y, Li Y. Peptide-based cancer therapy: Opportunity and challenge. *Cancer Lett.* 2014 Aug 28;351(1):13–22.
 22. Xiao Y-F, Jie M-M, Li B-S, Hu C-J, Xie R, Tang B, et al. Peptide-Based Treatment: A Promising Cancer Therapy. *J Immunol Res.* 2014;1–13.
 23. Araste F, Abnous K, Hashemi M, Taghdisi SM, Ramezani M, Alibolandi M. Peptide-based targeted therapeutics: Focus on cancer treatment. *J Control Release.* 2018 Dec 28;292:141–62.
 24. Thundimadathil J. Cancer Treatment Using Peptides: Current Therapies and Future Prospects. *J Amino Acids.* 2012;1–13.
 25. Gill K, Singh AK, Kapoor V, Nigam L, Kumar R, Holla P, et al. Development of peptide inhibitor as a therapeutic agent against head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) targeting p38alpha MAP kinase. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Mar;1830(3):2763–9.
 26. Han Y, Cui Z, Li Y-H, Hsu W-H, Lee B-H. In Vitro and in Vivo Anticancer Activity of Pardaxin against Proliferation and growth of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Mar Drugs.* 2016;14(2):12.
 27. Satitmanwiwat S, Changsangfa C, Khanuengthong A, Promthep K, Roytrakul S, Arpornsuwan T, et al. The scorpion venom peptide BmKn2 induces apoptosis in cancerous but not in normal human oral cells. *Biomed Pharmacother.* 2016 Dec 1;84:1042–50.
 28. Tong-ngam P, Roytrakul S, Sritanaudomchai H. BmKn-2 scorpion venom peptide for killing

- oral cancer cells by apoptosis. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2015;16(7):2807–11.
29. Okumura K, Itoh A, Isogai E, Hirose K, Hosokawa Y, Abiko Y, et al. C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS-H1 cells. *Cancer Lett.* 2004 Aug 30;212(2):185–94.
 30. García-Montoya IA, Cendón TS, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Mar;1820(3):226–36.
 31. Arias M, McDonald LJ, Haney EF, Nazmi K, Bolscher JGM, Vogel HJ. Bovine and human lactoferricin peptides: Chimeras and new cyclic analogs. *BioMetals.* 2014;27(5).
 32. Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62:2588–98.
 33. Zhang Y, Lima C, Rodrigues L. Anticancer effects of lactoferrin: underlying mechanisms and future trends in cancer therapy. *Nutr Rev.* 2014;72(12):763–73.
 34. Chea C, Miyauchi M, Inubushi T, Febriyanti Ayuningtyas N, Subarnbhesaj A, Nguyen PT, et al. Molecular mechanism of inhibitory effects of bovine lactoferrin on the growth of oral squamous cell carcinoma. Reddy S V., editor. *PLoS One.* 2018 Jan 30;13(1):e0191683.
 35. Sakai T, Banno Y, Kato Y, Kawaguchi M. Pepsin-Digested Bovine Lactoferrin Induces Apoptotic Cell Death With JNK/SAPK Activation in Oral Cancer Cells. *J Pharmacol Sci.* 2005;98(1):41–8.
 36. León-Calvijo MA, Leal-Castro A, Almanzar G, Rosas J, García J, Rivera Z. Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Derived from Lactoferricin against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Biomed Res Int.* 2015;1–8.
 37. Huertas Méndez N, Vargas Casanova Y, Gómez Chimbi A, Hernández E, Leal Castro A, Melo Diaz J, et al. Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Antimicrobial Activity against *E. coli* ATCC 11775, *S. maltophilia* ATCC 13636 and *S. enteritidis* ATCC 13076. *Molecules.* 2017 Mar 12;22(3):452.
 38. Huertas M. N, Monroy Z, Medina R, Castañeda J. Antimicrobial Activity of Truncated and Polyvalent Peptides Derived from the FKRRQWQWRMKKGLA Sequence against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Molecules.* 2017 Jun 14;22(6):987.
 39. Vega Chaparro SC, Valencia Salguero JT, Martínez Baquero DA, Rosas Pérez JE. Effect of Polyvalence on the Antibacterial Activity of a Synthetic Peptide Derived from Bovine Lactoferricin against Healthcare-Associated Infectious Pathogens. *Biomed Res Int.* 2018;2018:12.
 40. Vega Chaparro SC, Martínez DA, Chalá M del S, Vargas H, Rosas JE. Design, Synthesis

- and Evaluation of Branched RRWQWR-Based Peptides as Antibacterial Agents against Clinically Relevant Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens. *Front Microbiol.* 2018;9:329.
41. Vargas-Casanova Y, Rodríguez-Mayor AV, Cardenas KJ, Leal-Castro AL, Muñoz-Molina LC, Fierro-Medina R, et al. Synergistic bactericide and antibiotic effects of dimeric, tetrameric, or palindromic peptides containing the RWQWR motif against Gram-positive and Gram-negative strains. *RSC Adv.* 2019 Mar 1;9(13):7239–45.
 42. Vargas Casanova Y, Rodríguez Guerra J, Umaña Pérez Y, Leal Castro A, Almanzar Reina G, García Castañeda J, et al. Antibacterial Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Cytotoxic Effect against MDA-MB-468 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines. *Molecules.* 2017 Sep 29;22(10):1641.
 43. Solarte V, Rosas J, Rivera Z, García JE, Arango M, Vernot J-P. A tetrameric peptide derived from bovine lactoferricin exhibits specific cytotoxic effects against Oral Squamous-Cell Carcinoma cell lines. *Biomed Res Int.* 2015;13.
 44. Alfonso Solarte V, Conget P, Vernot J-P, Eduardo Rosas J, Jenny Rivera Z, Eduardo García J, et al. A tetrameric peptide derived from bovine lactoferricin as a potential therapeutic tool for oral squamous cell carcinoma: A preclinical model. *PLoS One.* 2017;12(3).
 45. Hao Y, Yang N, Teng D, Wang X, Mao R, Wang J. A review of the design and modification of lactoferricins and their derivatives. *BioMetals.* 2018 Jun 17;31(3):331–41.
 46. Schibli DJ, Hwang PM, Vogel HJ. The structure of the antimicrobial active center of lactoferricin B bound to sodium dodecyl sulfate micelles. *FEBS Lett.* 1999 Mar 12;446(2–3):213–7.
 47. Vogel HJ, Schibli DJ, Jing W, Lohmeier-Vogel EM, Epanand RF, Epanand RM. Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides. *Biochem Cell Biol.* 2002;80(1):49–63.
 48. Nguyen LT, Schibli DJ, Vogel HJ. Structural studies and model membrane interactions of two peptides derived from bovine lactoferricin. *J Pept Sci.* 2005;11(7):379–89.
 49. Vergel Galeano CF, Rivera Monroy ZJ, Rosas Pérez JE, García Castañeda JE. Efficient Synthesis of Peptides with 4-Methylpiperidine as Fmoc Removal Reagent by Solid Phase Synthesis. *J Mex Chem Soc.* 2014;58(4):386–92.
 50. Tomita M, Wakabayashi H, Shin K, Yamauchi K, Yaeshima T, Iwatsuki K. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie.* 2009;91(1):52–7.
 51. Hwang PM, Zhou N, Shan X, Arrowsmith CH, Vogel HJ. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. *Biochemistry.* 1998 Mar 24;37(12):4288–98.

52. Utsugi T, Schroit AJ, Connor J, Bucana CD, Fidler IJ. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res.* 1991 Jun 1;51(11):3062–6.
53. Eliassen LT, Berge G, Sveinbjørnsson B, Svendsen JS, Vorland LH, Rekdal Ø. Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferrin. *Anticancer Res.* 2002 Jan;22(5):2703–10.
54. Moniruzzaman M, Islam MZ, Sharmin S, Dohra H, Yamazaki M. Entry of a Six-residue antimicrobial peptide derived from Lactoferrin B into single vesicles and *Escherichia coli* cells without damaging their membranes. *Biochemistry.* 2017 Aug 22;56(33):4419–31.
55. Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD, Cook PI. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem.* 1970 Apr 1;34(2):595–8.
56. Stoddart M. Cell viability assays: introduction. In: Stoddart M, editor. *Mammalian cell viability Methods and protocols.* Davos Platz: Humana Press; 2011. p. 1–6.
57. Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel).* 2012 Jan;12(9):12347–60.
58. Solarte VA. Péptidos derivados de Lactoferrina bovina como agentes anticancerígenos contra el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral. Universidad Nacional de Colombia; 2016.
59. Eliassen LT, Berge G, Leknessund A, Wikman M, Lindin I, Løkke C, et al. The antimicrobial peptide, lactoferrin B, is cytotoxic to neuroblastoma cells *in vitro* and inhibits xenograft growth *in vivo*. *Int J Cancer.* 2006 Aug 1;119(3):493–500.
60. Eliassen LT, Haug BE, Berge G, Rekdal Ø, Øystein. Enhanced antitumor activity of 15-residue bovine lactoferrin derivatives containing bulky aromatic amino acids and lipophilic N-terminal modifications. *J Pept Sci.* 2003 Aug;9(8):510–7.
61. Onishi J, Roy MK, Juneja LR, Watanabe Y, Tamai Y. A lactoferrin-derived peptide with cationic residues concentrated in a region of its helical structure induces necrotic cell death in a leukemic cell line (HL-60). *J Pept Sci.* 2008 Sep;14(9):1032–8.
62. Yang N, Stensen W, Svendsen JS, Rekdal Ø. Enhanced antitumor activity and selectivity of lactoferrin-derived peptides. *J Pept Res.* 2002 Oct;60(4):187–97.
63. Salley JJ. Experimental Carcinogenesis in the Cheek Pouch of the Syrian Hamster. *J Dent Res.* 1954 Apr 9;33(2):253–62.
64. Morris AL. Factors Influencing Experimental Carcinogenesis in the Hamster Cheek Pouch. *J Dent Res.* 1961 Jan 9;40(1):3–15.
65. Lopes de Souza F. Avaliação dos efeitos morfológicos do Sunitinib em lesões

- cancerizáveis induzidas com DMBA em bolsa jugal de hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*) e análise metodológica retrospectiva dos 60 anos deste modelo experimental de câncer bucal. Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2014.
66. Vairaktaris E, Spyridonidou S, Papakosta V, Vylliotis A, Lazaris A, Perrea D, et al. The hamster model of sequential oral oncogenesis. Vol. 44, *Oral Oncology*. 2008. p. 315–24.
 67. Nagini S, Letchoumy PV, A T, CR R. Of humans and hamsters: A comparative evaluation of carcinogen activation, DNA damage, cell proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis in oral cancer patients and hamster buccal pouch carcinomas. *Oral Oncol*. 2009;45(6):e31–7.
 68. Chen Y-K, Lin L-M. DMBA-induced hamster buccal pouch carcinoma and VX2-induced rabbit cancer as a model for human oral carcinogenesis. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010 Sep 10;10(9):1485–96.
 69. Monti-Hughes A, Aromando RF, Pérez MA, Schwint AE, Itoiz ME. The hamster cheek pouch model for field cancerization studies. *Periodontol 2000*. 2015 Feb;67(1):292–311.
 70. National Research Council of the National Academies. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Eighth Ed. Fletcher C, Crossgrove R, editors. Washington: National Academies Press; 2011. 246 p.
 71. Faustino-Rocha A, Oliveira PA, Pinho-Oliveira J, Teixeira-Guedes C, Soares-Maia R, da Costa RG, et al. Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. *Lab Anim (NY)*. 2013 Jun 1;42(6):217–24.
 72. Sun Y, Liu N, Guan X, Wu H, Sun Z, Zeng H. Immunosuppression Induced by Chronic Inflammation and the Progression to Oral Squamous Cell Carcinoma. *Mediators Inflamm*. 2016;12.
 73. Boxberg M, Leising L, Steiger K, Jesinghaus M, Alkhamas A, Mielke M, et al. Composition and clinical impact of the immunologic tumor microenvironment in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Immunol*. 2019;202:278–91.
 74. Xiang L, Marshall GD. Immunomodulatory effects of dexamethasone on gene expression of cytokine and stress hormone receptors in peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunopharmacol*. 2013 Nov 1;17(3):556–60.
 75. Slaughter D, Southwick H, Smejkal W. “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. *Cancer*. 1953;6:963–8.
 76. Chun-Ta L, Christopher W, Li-Yu L, Chuen H, Chien-Yu L, Kang-Hsing F, et al. Clinical evidence of field cancerization in patients with oral cavity cancer in a betel quid chewing area. *Oral Oncol*. 2014;50(8):721–31.
 77. Saroja M, Balasenthil S, Ramachandran C, Nagini S. Coffee enhances the development of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced hamster buccal pouch carcinomas. *Oral*

- Oncol. 2001 Feb 1;37(2):172–6.
78. Altuwaigi O, Papageorge M, Doku C. The cancer promoting effect of N-nitrosornicotine used in combination with a subcarcinogenic dose of 4-Nitroquinoline-N-Oxide and 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995;53(8):910–3.
 79. Kathiresan K, Sithrangaboopathy N. Temperature effect on chemical-induced carcinogenesis in hamster cheek pouch. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2008 Sep 1;26(2):147–9.
 80. Kage T, Mogi M, Katsumata Y, Yamada T, Chino T. Lung and cervical lymph-node metastasis after cortisone enhancement in hamster cheek-pouch carcinogenesis. *Arch Oral Biol.* 1988 Jan 1;33(6):459–61.
 81. Li C-C, Shen Z, Bavarian R, Yang F, Bhattacharya A. Oral Cancer. Genetics and the role of precision medicine. *Dent Clin North Am.* 2018;62:29–46.
 82. Cheng H-C, Chien H, Liao C-H, Yang Y-Y, Huang S-Y. Carotenoids suppress proliferating cell nuclear antigen and cyclin D1 expression in oral carcinogenic models. *J Nutr Biochem.* 2007 Oct;18(10):667–75.
 83. Nicolao Berta G, Salamone P, Elio Sprio A, Di Scipio F, Marinos LM, Sapino S, et al. Chemoprevention of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamster cheek pouch by topical application of resveratrol complexed with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Oral Oncol.* 2010 Jan 1;46(1):42–8.
 84. Priyadarsini R, Nagini S. Quercetin suppresses cytochrome P450 Mediated ROS generation and NF κ B activation to inhibit the development of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) induced hamster buccal pouch carcinomas. *Free Radic Res.* 2012;46(1):41–9.
 85. Zhu X, Xiong L, Zhang X, Shi N, Zhang Y, Ke J, et al. Lyophilized strawberries prevent 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral squamous cell carcinogenesis in hamsters. *J Funct Foods.* 2015 May 1;15:476–86.
 86. Ramu A, Kathiresan S, Ali Ahmed B. Gramine inhibits angiogenesis and induces apoptosis via modulation of TGF- β signalling in 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) induced hamster buccal pouch carcinoma. *Phytomedicine.* 2017 Sep 15;33:69–76.
 87. Lim LY, Koh PY, Somani S, Al Robaian M, Karim R, Yean YL, et al. Tumor regression following intravenous administration of lactoferrin- and lactoferrin-bearing dendriplexes. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2015 Aug 1;11(6):1445–54.
 88. Dennison SR, Whittaker M, Harris F, Phoenix DA. Anticancer alpha-helical peptides and structure/function relationships underpinning their interactions with tumour cell membranes. *Curr Protein Pept Sci.* 2006 Dec;7(6):487–99.