



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Implementación y Optimización de la Síntesis de Péptidos Diméricos Derivados de la Secuencia LfcinB (20-30) con Potencial Actividad Anticancerígena Contra el Cáncer de Mama

Diego Sebastián Insuasty Cepeda

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2022

Implementación y Optimización de la Síntesis de Péptidos Diméricos Derivados de la Secuencia LfcinB (20-30) con Potencial Actividad Anticancerígena Contra el Cáncer de Mama

Diego Sebastián Insuasty Cepeda

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias - Química

Directora:

Ph.D. Zuly Jenny Rivera Monroy

Codirector (a):

Ph.D. Alejandra Ochoa Zarzosa

Línea de Investigación:

Química Bioanalítica

Grupo de Investigación:

Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2022

Dedicatoria

Dedicado a la vida de mi preciosa hija *Amelia*, que se está gestando en el vientre de mi amada esposa. Te esperé con ansias durante mucho tiempo y hoy eres una realidad. Este logro es por ti y para ti.

“No tengo ningún talento especial. Sólo soy apasionadamente curioso.”

Albert Einstein

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Diego Sebastián Insuasty Cepeda

Nombre

Fecha 03/08/2022

Agradecimientos

Agradezco a MinCiencias RC. No. 706-2018 por la financiación de esta investigación a través del proyecto: Project: Desarrollo de un medicamento contra el cáncer de mama basado en un péptido polivalente derivado de la LfcinB: Estudio de la fase preclínica (fase cero), caracterización fisicoquímica de un lote del fármaco para estudios preclínicos.

A la Universidad Nacional de Colombia por permitirme realizar mis estudios doctorales dentro del Departamento de Química – Facultad de Ciencias y a la Dirección Académica por otorgarme la Beca Asistente Docente con la que cubrí mis gastos de manutención durante el doctorado.

Al grupo de investigación Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP) al que he pertenecido durante los últimos 8 años y que ha pasado a convertirse para mí en una familia y mi segundo hogar. Sería imposible nombrar a todas las personas que han pasado por el grupo durante todo este tiempo y que han dejado en mí grandes aprendizajes y amistades. Agradezco en particular a Andrea Barragán, Kevin Huertas, Héctor Pineda, Verónica Rodríguez, Tatiana Román y Natalia Ardila; también a la nueva generación: Amalia López, Mateo González, Luisa Guerra-Acero, David Ramírez y Alejandro Velandia. Todos ellos han contribuido enormemente con su apoyo personal y académico en la realización de esta tesis doctoral.

Al Laboratorio de Respuesta Inmune Innata de la Interacción Hospedero Patógeno del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México) dirigido por la doctora Alejandra Ochoa Zarzosa y el doctor Joel Edmundo López López donde llevé a cabo mi pasantía de investigación. Agradezco a los doctores por su fraterno y caluroso acogimiento durante mi pasantía y por regalarme parte de su enorme conocimiento relacionado con bioquímica y cultivo celular, también por permitirme el acceso a la infraestructura y los materiales y reactivos necesarios para poder llevar a cabo la gran mayoría de los estudios relacionados con viabilidad y tipo de muerte celular. Por otra parte, agradezco a los estudiantes del Laboratorio: Martín, David, Marisol, Andrea y Paola; quienes me enseñaron de su profesión

y su cultura y me hicieron sentir como en casa durante mi tránsito por México, convirtiéndose en un gran apoyo académico y emocional.

Al profesor Javier Eduardo García Castañeda por sus grandes enseñanzas. Por inculcarme los valores de la humildad, la perseverancia y el optimismo; y por su gran creatividad y sabiduría que fueron sumamente valiosas para superar los obstáculos y dificultades experimentales y académicas que tuvieron lugar durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

A mi directora de tesis, profesora Zuly Jenny Rivera Monroy quien ha sido la persona más importante en mi formación como profesional e investigador. Agradezco su apoyo incondicional y maternal tanto en el ámbito académico como en el emocional durante todo mi proceso de formación desde el pregrado, hasta la maestría y el doctorado. Por su profunda vocación por la docencia y la investigación, que me transmitieron el cariño y la pasión por la ciencia y el aprendizaje. Por su invaluable conocimiento y su gran generosidad para compartirlo; me llevaré por siempre su frase: “Lo único que puedes dar ilimitadamente y jamás se te va a acabar, es el conocimiento”.

Finalmente agradezco a mi familia y a mi amada esposa Ericka, quien, con su amor infinito, su compañía y sus palabras de aliento se convirtió en mi motor para recorrer con alegría, entusiasmo y fortaleza esta fascinante travesía llamada Ciencia.

Resumen

El cáncer de mama es el tipo de neoplasia más diagnosticada en el mundo y la primera causa de muerte en mujeres, por lo cual es imperativo encontrar nuevos medicamentos que permitan combatir esta enfermedad de una manera eficiente y selectiva. La secuencia dimérica LfcinB (20-30)₂: (RRWQWR**M**KKLG)₂-K-Ahx ha demostrado ser promisoría en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, ya que ejerce un potente efecto citotóxico *in vitro* contra líneas celulares derivadas de cáncer de mama. En esta investigación se sintetizaron, purificaron y caracterizaron once nuevos péptidos diméricos análogos a la secuencia LfcinB (20-30)₂, en los cuales la posición central ²⁶Met, fue reemplazada por diferentes aminoácidos, . Para cada péptido se evaluó su efecto citotóxico en las líneas celulares derivadas de cáncer de mama HTB-132 y/o MCF-7, encontrando que la posición 26 es un residuo crítico, ya que aumentar la hidrofobicidad de este, potencia significativamente el efecto citotóxico contra las líneas de cáncer. Los péptidos que presentaron mayor actividad fueron ²⁶[F] LfcinB (20-30)₂: (RRWQWR**F**KKLG)₂-K-Ahx y ²⁶[1-Nal] LfcinB (20-30)₂: (RRWQWR-**1-Nal**-KKLG)₂-K-Ahx. Estos péptidos análogos tuvieron valores de IC₅₀ menores a 20 μM en las líneas MCF-7 y/o HTB-132, presentaron selectividad *in vitro* frente a eritrocitos y baja toxicidad en los modelos *in vivo* *G. Mellonella* y murino. Adicionalmente, generaron un tipo de muerte celular que involucra eventos de apoptosis extrínseca e intrínseca y no afectaron significativamente la membrana citoplasmática. Finalmente, se logró optimizar y escalar la síntesis del péptido ²⁶[F] LfcinB (20-30)₂ hasta obtener 1.8 g, con el fin de contribuir al inicio de estudios que permitan el comienzo de fases preclínicas de esta molécula, ya que nuestros resultados sugieren que es una secuencia peptídica promisoría para el futuro desarrollo de medicamentos contra el cáncer de mama al igual que ²⁶[1-Nal] LfcinB (20-30)₂.

Palabras clave: Lactoferricina Bovina, Actividad Anticancerígena, Péptidos diméricos.

Implementation and Optimization of the Synthesis of Dimeric Peptides Derived from the LfcinB Sequence (20-30) with Potential Anticancer Activity against Breast Cancer

Abstract

Breast cancer is the most diagnosed type of neoplasia in the world and the first cause of death in women, for which it is imperative to find new drugs that allow us to combat this disease in an efficient and selective manner. The dimeric sequence LfcinB (20-30)₂: (RRWQWRMKKLG)₂-K-Ahx has shown promise in the development of new therapeutic agents, as it exerts a powerful cytotoxic effect *in vitro* against cell lines derived from breast cancer. In this research, 11 new dimeric peptides analogous to the LfcinB (20-30)₂ were synthesized, purified and characterized, in which the central position ²⁶Met was replaced by amino acids of different chemical natures. For each peptide, its cytotoxic effect was evaluated in cell lines derived from breast cancer HTB-132 and/or MCF-7, finding that ²⁶Met is a critical residue, since increasing its hydrophobicity significantly enhances the cytotoxic effect against cancer lines. The most potent peptides were ²⁶[F] LfcinB (20-30)₂: (RRWQWRFKCLG)₂-K-Ahx and ²⁶[1-Nal] LfcinB (20-30)₂: (RRWQWR-1-Nal-KKLG)₂ -K-Ahx. These analogous peptides had IC₅₀ values lower than 20 μM in the MCF-7 and/or HTB-132 lines, they showed *in vitro* selectivity against erythrocytes and low toxicity in the *in vivo* *G. Mellonella* and murine models. Additionally, they generated a type of cell death involving extrinsic and intrinsic apoptotic events and did not significantly affect the cytoplasmic membrane. Finally, it was possible to optimize and scale the synthesis of the peptide ²⁶[F] LfcinB (20-30)₂ up to 1.8 g, in order to contribute to the start of studies that allow the start of preclinical phases of this molecule, since our Results suggest that it is a promising peptide sequence for the future development of drugs against breast cancer, such as ²⁶[1-Nal] LfcinB (20-30)₂.

Keywords: Bovine Lactoferricin, Anticancer Activity, Dimeric Peptides.

Contenido

	Pág.
	I
Resumen	XI
Lista de figuras	XV
Lista de Tablas	XVIII
Lista de Símbolos y abreviaturas	XIX
Introducción	1
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1 GENERALIDADES	5
1.2 EL CÁNCER DE MAMA	5
1.3 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS COMO AGENTES TERAPÉUTICOS CONTRA EL CÁNCER	7
1.4 LACTOFERRINA Y LACTOFERRICINA BOVINA.....	8
1.5 PÉPTIDOS DERIVADOS DE LfcinB	10
2. HIPÓTESIS	15
3. DISEÑO EXPERIMENTAL	16
4. OBJETIVOS	20
4.1 OBJETIVO GENERAL	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. METODOLOGÍA	21
5.1 MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.2 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA Fmoc/tBu	21
5.2.1 DESPROTECCIÓN: REACCIÓN DE REMOCIÓN DEL GRUPO FMOC	22
5.2.2 ACOUPLE: REACCIÓN DE ACTIVACIÓN E INCORPORACIÓN DE LOS FMOC-AMINOÁCIDOS A LA RESINA	23
5.2.3 REACCIÓN DE MONITOREO: TEST DE KAISER.....	23
5.2.4 CLIVAJE: SEPARACIÓN DEL PÉPTIDO DE LA RESINA	24
5.2.5 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS DIMÉRICOS	24
5.3 ANÁLISIS POR RP-HPLC	24
5.4 PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA, SPE	25

5.5	ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF	25
5.6	CULTIVO CELULAR	26
5.6.1	DESCONGELAMIENTO DE CÉLULAS.....	28
5.6.2	PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS	28
5.6.3	SUBCULTIVO CELULAR Y CONGELAMIENTO DE CÉLULAS	28
5.7	ENSAYO DE VIABILIDAD POR MTT.....	29
5.8	ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE LOS PÉPTIDOS	29
5.9	EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA CITOPASMÁTICA USANDO SYTO 9/IP	29
5.10	DETERMINACIÓN DEL TIPO DE MUERTE CELULAR APOPTÓISIS/ NECROSIS.....	30
5.11	DETERMINACIÓN DE LA DESPOLARIZACIÓN DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	31
5.12	ENSAYO DE FLUJO DE CALCIO	31
5.13	ENSAYO DE ACTIVIDAD DE CASPASAS 8 Y 9.....	31
5.14	Modelo de toxicidad <i>in vivo</i> en <i>Galleria mellonella</i>	32
5.15	Modelo preliminar de toxicidad <i>in vivo</i> en ratones.....	32
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
6.1	Obtención de péptidos diméricos derivados de LfcinB (20-30) ₂ y evaluación de su efecto citotóxico <i>in vitro</i> contra líneas celulares de cáncer de mama	35
6.2	Estudios de estabilidad enzimática	46
6.3	Estudios de selectividad y toxicidad	51
6.4	Estudio del tipo de muerte celular ejercido por péptidos diméricos sobre la línea celular de cáncer de Mama MCF-7	60
6.5	Escalamiento sintético: Obtención y caracterización de 1 g de ²⁶ [F]-LfcinB (20- 30) ₂ 66	
7.	CONCLUSIONES.....	73
8.	APORTES ACADÉMICOS.....	75
	Bibliografía	81
A.	Anexo: Divulgación Científica	87
B.	Anexo: Caracterización de Péptidos Diméricos Derivados de LfcinB (20-30)₂ ¡Error! Marcador no definido.	
C.	Anexo: Registro Fotográfico de Documentación Empleada en la Obtención de un lote de 1 g de ²⁶[F]LfcinB(20-30)₂	¡Error! Marcador no definido.

Lista de figuras

Figura 1. Muertes en mujeres a causa de cáncer en Colombia en el año 2018 y contribución porcentual de los tipos de cáncer más comunes. Tomado y adaptado de World Human Organization (WHO) http://www.who.int/cancer/en/ (accessed May 22, 2018). ²	2
Figura 2. Efecto citotóxico de péptidos polivalentes derivados de la LfcinB frente a líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-468 (HTB-132 TM) y MDA-MB-231 (HTB-26 TM). Negro: Péptido lineal, rojo: Péptido cíclico, verde: dímero, azul: tetrámero. A y B familia LfcinB (20-25), C y D familia LfcinB (20-30). Tomado y adaptado de ¹⁸	12
Figura 3. Efecto citotóxico de péptidos polivalentes derivados de la LfcinB (20-30) frente a líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-468 (Línea continua) y fibroblastos dermales no tumorigénicos PCS-201-012 (Línea punteada). Azul: tetrámero, verde: dímero. Tomado y adaptado de ¹⁸	13
Figura 4. Péptidos polivalentes (arriba: dímero, abajo: tetrámero), derivados de la LfcinB (20-30). Las esferas grises representan los aminoácidos involucrados en la secuencia. En azul: Lísina, rojo: ácido 6-aminohexanoico, verde: cisteínas formando puente disulfuro	14
Figura 5. Péptido LfcinB (20-30) ₂ . Izquierda: tiempo cero. Derecha: Cuatro meses de almacenamiento a Tamb.....	14
Figura 6. Diseño experimental del proyecto de investigación.	16
Figura 7. Diagrama de la síntesis de péptidos diméricos en fase sólida (SPPS-Fmoc/tBu).....	22
Figura 8. Caracterización analítica del péptido ²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂ . A. Estructura química y masa exacta, B. Perfil cromatográfico del péptido puro a 210 nm. C. Espectro de masas ESI-Q/TOF.....	37
Figura 9. Efecto citotóxico de ²⁶ [M]: (RRWQWRMKKLG) ₂ -K-Ahx y sus análogos contra las líneas celulares HTB-132 (A,B) y MCF-7 (C,D). Las células de cáncer de mama se trataron con el péptido durante 24 h, 37 °C. Efecto citotóxico de los péptidos a 100 µg/mL frente a células HTB-132 (E) y 50 µg/mL frente a células MCF-7 (F). Los datos en A–B representan la media ± SE (tres experimentos independientes n=3). Los datos en C–D representan la media ± SE (tres experimentos independientes con n=4). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el efecto citotóxico exhibido por los péptidos diméricos modificados y el péptido sin modificar. (Se utilizó la prueba de comparaciones múltiples Anova de Sidak, P ≤ 0,05).	40
Figura 10. Diseño sintético de seis nuevos péptidos análogos a la secuencia ²⁶ [F]: (RRWQWRFKLLG) ₂ -K-Ahx Rojo: difenilalanina (Dip), azul: 4-benzoilfenilalanina (Bpa),	

verde: 3-(1-naftil)alanina (1-Nal), morado: homofenilalanina (hF), ciano: ácido (2-amino) benzoico (2-Abz) y naranja: ácido (4-amino) benzoico (4-Abz)..... 44

Figura 11. Efecto citotóxico de péptidos diméricos contra MCF-7. (Izquierda) Análogos con menor actividad que el péptido $^{26}\text{[F]}$: $^{26}\text{[Dip]}$ en rojo, $^{26}\text{[4-Abz]}$ en naranja, $^{26}\text{[2-Abz]}$ en ciano. (Derecha) Análogos con mayor actividad que el péptido $^{26}\text{[F]}$: $^{26}\text{[Bpa]}$ en azul, $^{26}\text{[1-Nal]}$ en verde, y $^{26}\text{[hF]}$ en morado. Los datos representan el promedio \pm SE. Se realizaron tres experimentos independientes con $n=4$ cada uno. (Se empleó el test ANOVA, Sidak's de comparaciones múltiples, $p \leq 0.05$). 45

Figura 12. Digestión con pepsina y tripsina de los péptidos diméricos. Izquierda: Tratamiento de a. $^{26}\text{[F]}$, b. $^{26}\text{[1-Nal]}$, y c. $^{26}\text{[hF]}$ con pepsina. Derecha: Tratamiento de d. $^{26}\text{[F]}$, e. $^{26}\text{[1-Nal]}$ y f. $^{26}\text{[hF]}$ 48

Figura 13. Ensayos de selectividad de péptidos diméricos. MCF-7 (Línea sólida negra $-\bigcirc-$); HEK-293 (Línea sólida punteada $-\square-$); fibroblastos (Línea sólida punteada $-\nabla-$) y eritrocitos (Línea sólida roja $-\bigcirc-$). Los datos representan el promedio \pm SE. Tres experimentos independientes con $n=4$ cada uno. (ANOVA, test Sidak's de comparaciones múltiples, $p \leq 0.05$). 53

Figura 14. Gráfica de supervivencia de *Galleria Mellonella* tratada con los péptidos $^{26}\text{[F]}$ en rojo, $^{26}\text{[1-Nal]}$ en azul y $^{26}\text{[hF]}$ en verde, a una concentración de 800 $\mu\text{g/mL}$ 55

Figura 15. Micrografía de células MCF-7 tratadas con el péptido $^{26}\text{[F]}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$. Las células fueron cultivadas en ausencia (A) y presencia de péptido a (B) 5 min (Las flechas señalan células redondeadas), (C) 90 min, (D) 4 horas, (E) 24 horas (Las flechas señalan posible formación de vacuolas) y (F) 48 horas a 37°C. El tamaño celular fue determinado como el promedio de 100 medidas, usando una cámara AxioCam ICc1 (40x)..... 62

Figura 16. Ensayos de citometría de flujo en la línea celular MCF-7 tratadas con $^{26}\text{[F]}$ y $^{26}\text{[1-Nal]}$ en su concentración IC_{50} A. Ensayo de Anexina V/ 7AAD. Control negativo: células sin tratar, control positivo: ActD 0,5 μM . B. Ensayo de flujo de calcio citosólico extracelular. Control negativo: células sin tratar, control positivo: PMA 9 μM . C. Ensayo de activación de caspasas 8 y 9. Control negativo: células sin tratar, control positivo: H_2O_2 . D. Ensayo de potencial de membrana mitocondrial empleando fluoróforo JC-1 para el péptido $^{26}\text{[F]}$. Control negativo: Células sin trata, control positivo: ActD 0,5 μM . Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las células sin tratamiento y las células tratadas con los péptidos. (Test Anova Sidak's de comparaciones múltiples). Los datos representan la medida \pm SE. Un ensayo independiente con $n=3$. Para todos los ensayos se empleó la concentración IC_{50} de los péptidos determinada por ensayos de MTT..... 63

Figura 17. Cálculo de sustitución de la resina Rink Amide AM mediante espectroscopía UV. Azul: Antes del primer acople. Rojo: Después del primer acople. 68

Figura 18. Comportamiento de la síntesis del péptido $(\text{RRWQWRFKKL})_2\text{K-Ahx}$. Lote 1: 100 mg de resina, Lote 2: 1000 mg de resina. (X: Ácido 6-(Fmoc-amino)hexanoico, K_2 : Fmoc-Lys(Fmoc)-OH). La síntesis se realiza del extremo C al N-terminal, correspondientes a X y R, respectivamente. 69

Figura 19. Caracterización analítica de los Lote 1 y 2 por RP-HPLC y HRMS ESI-Q

OF. **A.** Lote 1 puro, **B.** Lote 2 crudo, **C.** Lote 3 puro.

/T

72

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Péptidos involucrados en estudios clínicos y preclínicos para el desarrollo de medicamentos contra en diferentes tipos de cáncer. Tomado y adaptado de ³⁷	7
Tabla 2. Actividad antineoplásica de LFB en diferentes tipos de cáncer. Tomado y adaptado de ⁴¹	10
Tabla 3. Características principales de las líneas celulares que se evaluarán en este proyecto.	27
Tabla 4. Caracterización y efecto citotóxico contra líneas celulares de cáncer de mama de péptidos diméricos análogos a la secuencia ²⁶ [M]-LfcinB (20-30) ₂	38
Tabla 5. Índice de selectividad de péptidos diméricos frente a fibroblastos, HEK-293 y eritrocitos en comparación con la línea celular de cáncer de mama MCF-7.	54
Tabla 6. Experimentos preliminares de toxicidad en ratones machos y hembras para los péptidos ²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂ y ²⁶ [1-Nal]-LfcinB (20-30) ₂ . *ip: intraperitoneal, **sc: subcutánea.	56
Tabla 7. Cantidad de reactivos empleados para la obtención de dos lotes del péptido ²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂ . Lote 1: 100 mg de resina, Lote 2: 1000 mg de resina. *Rendimiento calculado a partir de la cantidad de péptido crudo esperado teóricamente.....	70

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
6-Cl-HOBt	6-cloro-hidroxibenzotriazol
ACN	Acetonitrilo
<i>Ahx</i>	Ácido 6-aminohexanoico
Arg	Arginina
ATCC	American Type Culture Collection
BPM	Buenas prácticas de manufactura
CDI	Carcinoma ductal infiltrante
CLI	Carcinoma lobular infiltrante
CMEB	Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología
CMR-HN	Carcinoma mamario de receptores hormonales negativos
CMR-HP	Carcinoma mamario de receptores hormonales positivos
Cys	Cisteína
DANE	Departamento Administrativo Nacional de Estadística
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDT	Etanoditiol
Fmoc	9-fluoronilmetoxycarbonilo

XX Péptidos Diméricos Derivados de la Secuencia LfcinB (20-30) con Potencial
Actividad Anticancerígena contra el Cáncer de Mama

GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
IC ₅₀	Concentración 50 Inhibidora
IP	Yoduro de propidio
LF	Lactoferrina
LFB	Lactoferrina bovina
LfcinB	Lactoferricina Bovina
Lys	Lisina
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionization
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	3-4,5-dimetiltiazol-2-ilo-2,5-difeniltetrazol
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
NMP	N-metilpirrolidona
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
OSCC	Cáncer oral escamoso
PACs	Péptidos anticancerosos
PAMs	Péptidos antimicrobianos
pl	Punto isoeléctrico
RE	Estrógeno
PR	Progesterona
rpm	Revoluciones por minuto

RP-SPE	Extracción en fase sólida en modo fase reversa
SPPS	Síntesis de péptidos en fase sólida
TBTU	Tetrafluoroborato de tetrametilaminio
<i>t</i> Bu	Terbutilo
TFA	Ácido trifluoroacético
TIPS	Tetraisopropilsilano
TOF	Time of Flight
Trp	Triptófano
Trt	Tritilo
μ M	Micromolar
μ m	Micrómetro

Introducción

El cáncer es el mayor problema de salud pública a nivel mundial¹. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), es la segunda causa de muerte en el mundo. En el 2018 fallecieron 8.2 millones de personas a causa de esta enfermedad, y anualmente se reportan 14 millones de casos nuevos², de los cuales más del 60% se presentan en Asia, África y Sudamérica, y en estas regiones se presenta el 70% de las muertes a causa de esta enfermedad. En el 2012, los cánceres en mujeres diagnosticados con mayor frecuencia fueron: mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago; mientras que para el hombre fueron: pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado³.

El cáncer de mama es el más diagnosticado en el mundo con un estimado de 2.26 millones de casos en el año 2020⁴. Esta enfermedad presenta alta incidencia tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. De acuerdo con reportes de la Organización Panamericana de Salud (OPS) y la OMS; se estima que en el 2020 fallecieron más de 685 mil mujeres a causa de esta enfermedad y que anualmente se presentan 2.1 millones de nuevos casos. La morbilidad y mortalidad es mayor en países subdesarrollados ya que en estas regiones se presentan más del 58% de los casos y muertes.

En el caso particular de Colombia, en el año 2018 fallecieron 18,400 mujeres por cáncer, de las cuales el 15.3% fueron a causa del cáncer de mama (Figura 1), confiriéndole la mayor mortalidad entre todos los tipos de cáncer. Según el DANE, la mortalidad ha venido creciendo en las últimas décadas y esta enfermedad es considerada un problema de salud pública, por lo que se ha hecho una gran inversión en campañas para su prevención, diagnóstico temprano y tratamiento.

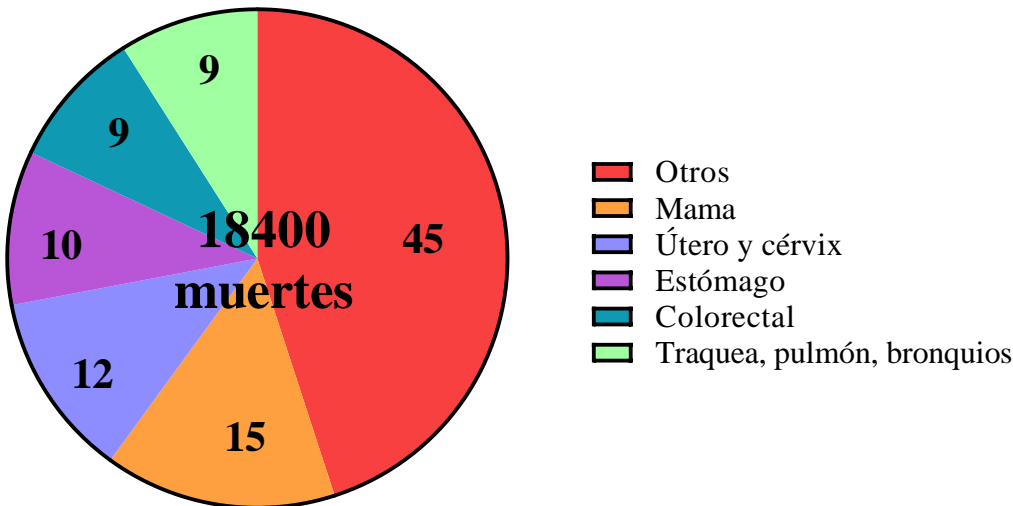


Figura 1. Muertes en mujeres a causa de cáncer en Colombia en el año 2018 y contribución porcentual de los tipos de cáncer más comunes. Tomado y adaptado de World Human Organization (WHO) <http://www.who.int/cancer/en/> (accessed May 22, 2018).²

Las opciones terapéuticas más empleadas actualmente para el tratamiento del cáncer de mama son las terapias sistemáticas, como la quimioterapia y la terapia endocrina, y las terapias localizadas, como la radioterapia y la remoción quirúrgica del tumor. Estos tratamientos han logrado reducir la mortalidad hasta en un 40%; sin embargo, todas ellas tienen efectos adversos severos como náuseas, alopecia, amenorrea, fracturas, entre otros que afectan significativamente la calidad de vida de los pacientes⁵. Por esto, es una prioridad buscar nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer de mama que permitan disminuir la mortalidad de esta enfermedad, y que sean más selectivos para disminuir los efectos secundarios.

Dentro de las nuevas alternativas terapéuticas se encuentran los péptidos antimicrobianos (PAMs). Los PAMs son péptidos que contienen entre 12 y 60 aminoácidos de longitud y forman parte del sistema inmunitario innato. Son moléculas cargadas positivamente con residuos catiónicos e hidrofóbicos y propiedades anfipáticas que pueden actuar sobre las bacterias a través de mecanismos membranolíticos y no membranolíticos⁶. Se ha encontrado que los PAMs tienen otras funciones biológicas, como actividad inmunomoduladora, antifúngica, antiviral y anticancerígena, entre otras⁷⁻¹⁰. Dada la gran cantidad de PAMs que también poseen actividad anticancerígena, ha surgido una nueva clasificación conocida como péptidos anticancerígenos (PACs). Los PACs suelen ser

selectivos para células de cáncer y actúan sobre receptores de membrana y/o dianas intracelulares, lo que les otorga un amplio espectro de acción en diferentes tipos de cáncer¹¹. Dentro de este contexto se encuentra la Lactoferrina Bovina, que es una glicoproteína presente en los fluidos corporales bovinos, y forma parte del sistema inmune innato. Cuando esta proteína es hidrolizada por la pepsina gástrica, se libera un péptido de la región N-Terminal conocido como Lactoferricina Bovina (LfcinB)¹². Varias investigaciones han demostrado que LfcinB presenta actividad antimicrobiana, antifúngica y anticancerosa¹³⁻¹⁵. A partir de su secuencia se han desarrollado otros péptidos, con algunas modificaciones estructurales, que presentan actividad biológica potenciada^{16,17}.

En el caso particular del cáncer de mama, se reportó que péptidos diméricos derivados de LfcinB, presentan elevado efecto citotóxico frente a líneas celulares derivadas de este tipo de cáncer. Adicionalmente, estas secuencias presentaron bajo efecto citotóxico frente a células no tumorogénicas, lo que sugiere que su actividad anticancerosa es altamente específica¹⁸. Teniendo en cuenta la urgente necesidad de obtener agentes terapéuticos alternativos contra el cáncer de mama, que sean menos invasivos y más selectivos, las secuencias peptídicas diméricas derivadas de la LfcinB se convierten en candidatos potenciales para desarrollar nuevos medicamentos. Uno de los dímeros identificados como más promisorios es el péptido dimérico LfcinB (20-30)₂: (RRWQWR**M**KKLG)₂-K-Ahx.

Con el fin de contribuir a la identificación de moléculas promisorias para el desarrollo de medicamentos contra el cáncer de mama, en esta investigación, a partir del péptido dimérico de LfcinB (20-30)₂ se planteó: (i) diseñar nuevas moléculas que puedan potenciar su efecto citotóxico contra líneas celulares derivadas de cáncer de mama, (ii) la evaluación del efecto citotóxico selectivo de estas moléculas frente a líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama, (iii) evaluación preliminar del tipo de muerte celular generado por la molécula que presente el mayor efecto citotóxico y (iv) exploración del proceso de escalamiento sintético del mejor candidato.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 GENERALIDADES

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células (metástasis), que puede aparecer en cualquier parte del cuerpo. La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifásico y suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son a causa de factores genéticos del paciente y/o exposición a agentes externos como (i) carcinógenos físicos (radiaciones UV e ionizantes); (ii) carcinógenos químicos (asbestos, humo de tabaco, aflatoxinas, arsénico, compuestos orgánicos, etc.); y (iii) carcinógenos biológicos (virus, bacterias, hongos o parásitos). El envejecimiento es otro factor fundamental en la aparición del cáncer, la acumulación general de factores de riesgo que provoquen mutaciones se combina con la tendencia que tienen los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad¹⁹.

1.2 EL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el más diagnosticado y la principal causa de muerte en mujeres a nivel mundial. Representa el 25% del total de cánceres padecidos por mujeres y se presentan 2.1 millones de nuevos casos cada año³. Esta enfermedad se define como el crecimiento de tumores malignos en los tejidos mamarios, es una enfermedad heterogénea y se clasifica con base a criterios clínicos, genéticos y moleculares²⁰.

En cuanto a la clasificación clínica existen dos tipos de cánceres de mama, el carcinoma ductal infiltrante (CDI) y el carcinoma lobular infiltrante (CLI). El CDI es el tipo de cáncer de mama más común y representa entre el 80% al 90% de los cánceres de mama diagnosticados, este cáncer se presenta en los conductos ductales que transportan la leche materna desde los lóbulos hasta el pezón. El CLI corresponde entre el 10% al 12% de los casos y se desarrolla en los lóbulos que producen la leche materna. Existen otros tipos de

cáncer poco frecuentes que representan menos del 10% de los casos reportados, entre estos se encuentran el carcinoma ductal y lobular *in situ*, carcinoma cribiforme, carcinoma papilar, carcinoma mucinoso y carcinoma medular²¹.

La clasificación genética se basa en la expresión de genes o realizando agrupamiento de tumores que responden diferencialmente a los tratamientos de acuerdo a marcadores de superficie^{22,23}. Con respecto a la clasificación molecular, las neoplasias malignas se dividen en dos grupos: los carcinomas mamarios receptores hormonales positivos (CMR-HP) de estrógeno (RE) y progesterona (RP), y los carcinomas mamarios receptores hormonales negativos (CMR-HN). Los CMR-HP, también conocidos como luminales, se dividen en tres subtipos: (i) el luminal A, que se caracteriza por la elevada expresión de RE, (ii) el luminal B caracterizado por la presencia de marcadores RE+ y/o RP+ y (iii) el luminal C de expresión baja a moderada de genes específicos incluyendo el grupo RE. Los CMRHN se caracterizan por la ausencia de RE y HER2 negativo. Cabe destacar que los CMR-HP son por lo general de mejor pronóstico que los CMR-HN^{24,25}.

El tipo de tratamiento para el cáncer de mama depende de las características histológicas y el estadio o etapa de extensión en el que se encuentra el paciente. Las terapias incluyen cirugía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, terapia dirigida o terapia con hormonas. Los tratamientos generalmente involucran dos o más terapias combinadas de acuerdo con el estado del paciente y buscan evitar la recurrencia. Entre las cirugías más utilizadas se encuentra la mastectomía, tumorectomía y la disección de los ganglios linfáticos axilares. Los tratamientos utilizados para tratar el cáncer de mama generalmente inducen efectos secundarios en los pacientes afectando significativamente su calidad de vida²⁶.

Para la identificación de nuevos agentes terapéuticos se realizan estudios de citotoxicidad de las moléculas mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. La primera etapa generalmente consiste en evaluar el efecto citotóxico de las moléculas contra líneas celulares humanas derivadas del cáncer de mama. Estas líneas son provenientes de células de un tejido humano y han sido caracterizadas. El banco de células más reconocido en nuestro hemisferio es la American Type Culture Collection (ATCC), la cual ha prestado el servicio de colección de líneas celulares y microorganismos desde 1925 y está presente en 150 países²⁷. Dentro de las líneas celulares derivadas de cáncer de mama más ampliamente empleadas se encuentran la MCF-7 y MDA-MB-231 y la T-47D; que fueron aisladas de

pacientes de diferentes etnias y edades con adenocarcinoma ductal, que es el tipo de cáncer de mama más común. Se estima que sólo estas tres líneas celulares abarcan las dos terceras partes de la totalidad de los ensayos *in vitro* reportados en la literatura²⁸.

1.3 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS COMO AGENTES TERAPÉUTICOS CONTRA EL CÁNCER

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) contienen entre 5 y 60 aminoácidos y forman parte del sistema inmune innato. Por lo general son anfipáticos, con regiones hidrofílicas e hidrofóbicas, que facilitan su interacción con la membrana celular. Estos péptidos actúan rápidamente para inactivar agentes infecciosos especialmente en la superficie de la mucosa y las barreras epiteliales²⁹. Se han reportado alrededor de 3000 PAMs aislados de bacterias, hongos, plantas y mamíferos entre otros. Estos péptidos es su mayoría son catiónicos, con una carga neta que varía entre +2 y +9 debido a la presencia de residuos con carga positiva como Lisina (Lys) y Arginina (Arg). Estos péptidos tienen la capacidad de interactuar electrostáticamente con moléculas cargadas negativamente sobre las membranas bacterianas³⁰. La estructura secundaria y la anfipaticidad de los PAMs influyen en su capacidad para reconocer e insertarse en las membranas celulares³¹.

En concentraciones que no son tóxicas para las células normales, algunos PAMs presentan efecto citotóxico contra células cancerosas, debido a que reconocen las células neoplásicas por su alto contenido en moléculas aniónicas y pueden inducir en ellas, necrosis o apoptosis celular^{6,18,32}. Así, los PAMs han sido moléculas de partida para el diseño y desarrollo de péptidos anticancerosos (PACs), actualmente varios de estos péptidos están involucrados en estudios preclínicos y clínicos para el desarrollo de medicamentos oncológicos (Tabla 1).

Existen algunos péptidos que actualmente son comercializados y empleados en tratamientos de pacientes con cáncer. Entre estos encontramos la leuprolida, octreotida, triptorelina y desmopresina. Este grupo de péptidos son derivados de hormonas producidas en el organismo, con modificaciones puntuales por D-aminoácidos y puentes disulfuro intramoleculares. Funcionan a nivel hormonal, afectando la producción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y la somatotropina, que son sobre expresadas durante el crecimiento y desarrollo tumoral de varios tipos de cáncer³³⁻³⁶.

Tabla 1. Péptidos involucrados en estudios clínicos y preclínicos para el desarrollo de medicamentos contra en diferentes tipos de cáncer. Tomado y adaptado de³⁷.

Fase	péptido	Condición	Ruta de administración
	LL37	Melanoma metastático	Intratumoral
I	GRN-1201	Tumor sólido (Melanoma y pulmón)	Intravenosa
	LTX-315	Tumor sólido	Intravenosa
	WT-2725	malignidades hematológicas y tumor sólido	Intravenosa
II	SGX942	Cáncer en cabeza y cuello	Intravenosa
	ANG-1005	Metástasis en cerebro y seno	Intravenosa
III	ITK-1	Glioblastoma y cáncer de próstata	Intravenosa

Los PACs como agentes terapéuticos tienen grandes ventajas, entre las cuales se encuentra: (i) su elevada selectividad, presentan la capacidad de discriminar entre células malignas y sanas; (ii) amplio espectro de acción ya que pueden ir a diferentes dianas dentro de la célula, por lo cual se ha encontrado que los PACs tienen actividad frente a diferentes tipos de cáncer; y (iii) su biocompatibilidad, ya que son producidos por el sistema inmune innato, y el organismo no los reconoce como agentes extraños, lo cual puede disminuir los efectos secundarios de su administración en comparación con los agentes terapéuticos actualmente empleados. Sin embargo, enfrentan retos tales como su estabilidad *in vivo*, degradación por proteasas, vida media corta, baja biodisponibilidad, y desafíos de producción y fabricación³⁸.

1.4 LACTOFERRINA Y LACTOFERRICINA BOVINA

La Lactoferrina (LF) es una glicoproteína globular multifuncional de la familia de la transferrina, que se encuentra en la mayoría de las secreciones exocrinas de mamíferos,

presente en la leche, lágrimas, saliva y sudor. Tiene carga neta positiva con punto isoeléctrico (pI) entre 8.0 y 8.5 y cuatro sitios potenciales de N-glicosilación. La LF tiene la capacidad de secuestrar el ion férrico (Fe^{3+}) en los sitios de infección, lo que impide el crecimiento bacteriano al limitar de nutrientes esenciales a la bacteria. Adicionalmente, se ha identificado que su región N-terminal presenta actividad antibacteriana, antiviral, antitumoral e inmunológica³⁹.

La Lactoferrina bovina (LFB) presenta mayor actividad que las Lactoferrinas humana, murina y caprina. La LFB actúa contra patógenos como, parásitos, hongos, bacterias y virus⁴⁰. Varios estudios *in vitro* mostraron que inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, entre las que se destaca las cepas resistentes de *S. aureus* y *E. coli*³⁹.

La LFB inhibe la carcinogénesis de colon, esófago, pulmón y vejiga en ratas cuando se administra por vía oral y tiene la capacidad de reducir las propiedades metastásicas de las líneas celulares MDA-MB-231 en modelos *in vitro*²⁶. Se han reportado estudios de actividad de la LFB contra líneas celulares de cáncer y modelos animales, todos mostrando efectos beneficiosos (ver Tabla 2).

Tabla 2. Actividad antineoplásica de LFB en diferentes tipos de cáncer. Tomado y adaptado de ⁴¹.

Cáncer	Modelo	Organismo
Colon	<i>In vivo, In vitro</i>	Rata, humano
Pólipos colorrectales	<i>In vivo</i>	Humano
Pulmón y esófago	<i>In vivo</i>	Rata
Vejiga	<i>In vivo</i>	Rata
Carcinoma escamoso de cabeza y cuello	<i>In vivo, In vitro</i>	Ratón
Glándula mamaria	<i>In vitro</i>	Perro
Linfoma	<i>In vivo, In vitro</i>	Ratón
Carcinoma pulmonar de Lewis	<i>In vivo, In vitro</i>	Ratón
Melanoma	<i>In vivo, In vitro</i>	Ratón

La Lactoferricina bovina (LfcinB: ¹⁷FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF⁴¹) es uno de los PAMs más estudiados por su potencial antimicrobiano, antitumoral e inmunológico. Este fragmento peptídico de 25 aminoácidos se produce por acción proteolítica de la pepsina gástrica, bajo condiciones ácidas, sobre el extremo N-terminal de la LFB. Tiene un alto contenido de Lys y Arg, que le proporciona una carga neta de +8, y residuos hidrofóbicos como Phe y Trp que le da características anfipáticas. Además, presenta dos cisteínas ¹⁹Cys y ³⁶Cys que forman un enlace disulfuro intramolecular dándole una configuración de bucle que le brinda rigidez y estabilidad a la estructura⁴².

Se ha reportado que la LfcinB presenta citotoxicidad selectiva contra diversos tipos de cáncer, como neoplasias malignas hematológicas, melanomas y carcinomas; activando diversas vías de señalización que incluyen apoptosis, necrosis y arresto del ciclo celular, sin presentar una significativa actividad citotóxica en células normales como fibroblastos, células endoteliales y linfocitos T^{43,44}.

1.5 PÉPTIDOS DERIVADOS DE LfcinB

Estudios *in vitro* han demostrado que péptidos cortos derivados de LfcinB, presentan actividad anticancerosa similar o mejor que la LfcinB. Estudios previos muestran que el efecto citotóxico contra líneas celulares humanas derivadas de cáncer oral escamoso (OSCC) del motivo mínimo de actividad LfcinB (20-25): RRWQWR se potencia significativamente cuando se incrementa la polivalencia de esta secuencia en forma

tetramérica: LfcinB (20-25)₄. Los estudios reflejaron que el tetrámero presentó aumento del efecto citotóxico con respecto al péptido lineal, específicamente, se obtuvo citotoxicidad significativa (viabilidad celular cercana al 0%) para el péptido LfcinB (20-25)₄, y baja para el péptido LfcinB (20-25) (viabilidad celular del 90%). Adicionalmente, el péptido tetramérico presentó efecto citotóxico moderado (aproximadamente 40%) en células no cancerosas. Esta primera aproximación sugirió que la presentación polivalente de secuencias derivadas de la LfcinB, podría potenciar la citotoxicidad frente a líneas celulares cancerígenas, con cierto grado de selectividad sobre las mismas^{45,46}. En estudios posteriores, se evaluó la citotoxicidad de los péptidos lineales, cíclicos y polivalentes (, derivados de LfcinB (20-25) y LfcinB (20-30): RRWQWRMKKLG sobre las líneas de adenocarcinoma ductal MDA-MB-231 (HTB-26TM) y MDA-MB-468 (HTB-132TM)¹⁸. Como se puede apreciar (Figura 2), para ambas líneas celulares se encontró que la mayor actividad citotóxica la presentan los péptidos polivalentes (dímeros, tetrámeros), mientras que los péptidos lineales y cíclicos tienen efecto citotóxico bajo. Se puede evidenciar que los péptidos con mayor citotoxicidad son el tetrámero y dímero derivados de la secuencia LfcinB (20-30). También se puede apreciar que el dímero de la secuencia LfcinB (20-25) tiene efecto citotóxico inferior al presentado por el dímero LfcinB (20-30). Esto sugiere que los aminoácidos de las posiciones 25 a 30 (MKKLG), juegan un rol importante en la actividad anticancerosa de los péptidos diméricos.

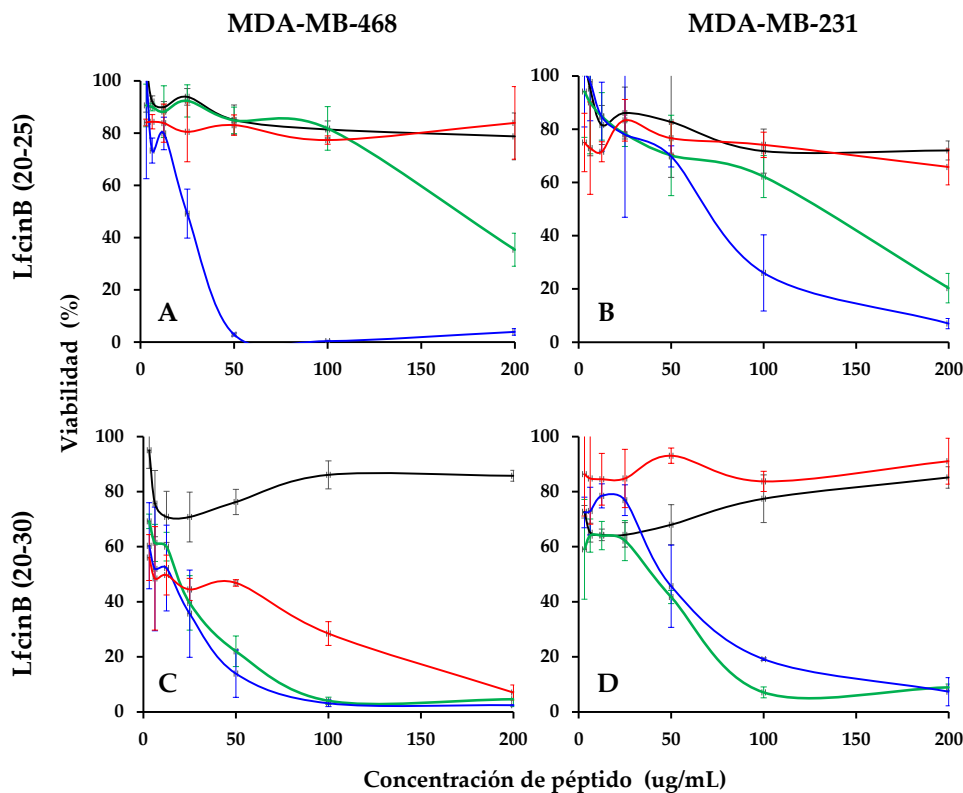


Figura 2. Efecto citotóxico de péptidos polivalentes derivados de la LfcinB frente a líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-468 (HTB-132TM) y MDA-MB-231 (HTB-26TM). Negro: Péptido lineal, rojo: Péptido cíclico, verde: dímero, azul: tetrámero. A y B familia LfcinB (20-25), C y D familia LfcinB (20-30). Tomado y adaptado de ¹⁸.

Adicionalmente, fue evaluado el efecto citotóxico sobre fibroblastos dermales no tumorigénicos PCS-201-012 de los péptidos polivalentes con mayor actividad (Figura 3). Se encontró que a las concentraciones de 50-100 $\mu\text{g/mL}$, el efecto citotóxico sobre los fibroblastos no tumorigénicos estuvo entre el 10 y el 20%, mientras que a esas mismas concentraciones estas moléculas mostraron un efecto citotóxico cercano al 100% sobre líneas celulares derivadas del cáncer de mama. Este resultado sugiere que los péptidos polivalentes derivados de la LfcinB (20-30) son altamente selectivos por las células cancerígenas, lo que los convierte en péptidos promisorios y con un gran potencial para el desarrollo de nuevos medicamentos contra el cáncer de mama.

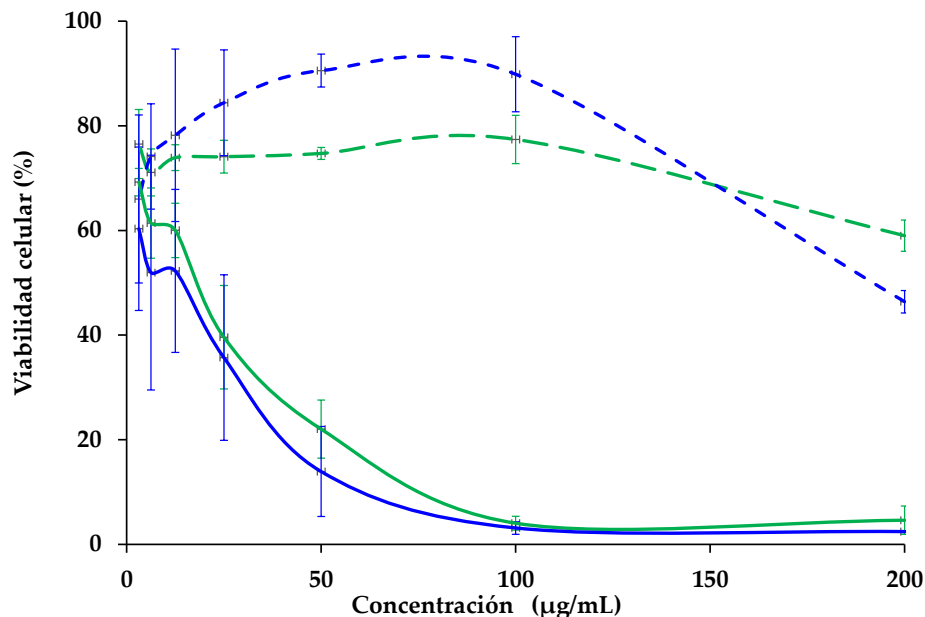


Figura 3. Efecto citotóxico de péptidos polivalentes derivados de la LfcinB (20-30) frente a líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-468 (Línea continua) y fibroblastos dermales no tumorigénicos PCS-201-012 (Línea punteada). Azul: tetrámero, verde: dímero. Tomado y adaptado de ¹⁸.

Al comparar los dos péptidos, LfcinB (20-30)₂ y LfcinB (20-30)₄ (Figura 4), se observa que el dímero presenta una ventaja sintética, ya que no requiere el paso de oxidación para la formación del puente disulfuro, proceso que reduce los rendimientos en la obtención del tetrámero. Por esta razón, la LfcinB (20-30)₂ es la molécula más interesante si se piensa en escalar la síntesis para la obtención de un prototipo, a futuro, que permita realizar los estudios para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de mama. En estudios preliminares se evaluó la estabilidad de los dímeros LfcinB (20-30)₂ y LfcinB (20-25)₂ y se observó que el dímero LfcinB (20-30)₂ presenta después de cuatro meses de almacenamiento nuevas especies por RP-HPLC (Figura 5). Este comportamiento puede estar asociado a problemas de estabilidad en la secuencia que pueden ser atribuidos a la oxidación de la metionina presente en la posición 26. Dentro de este contexto, el presente proyecto evaluó el efecto citotóxico de péptidos diméricos derivados de LfcinB (20-30)₂: (20RRWQWRMKKLG³⁰)₂-K-Ahx, en los cuales el residuo ²⁶Met fue reemplazado por aminoácidos de diferente naturaleza.

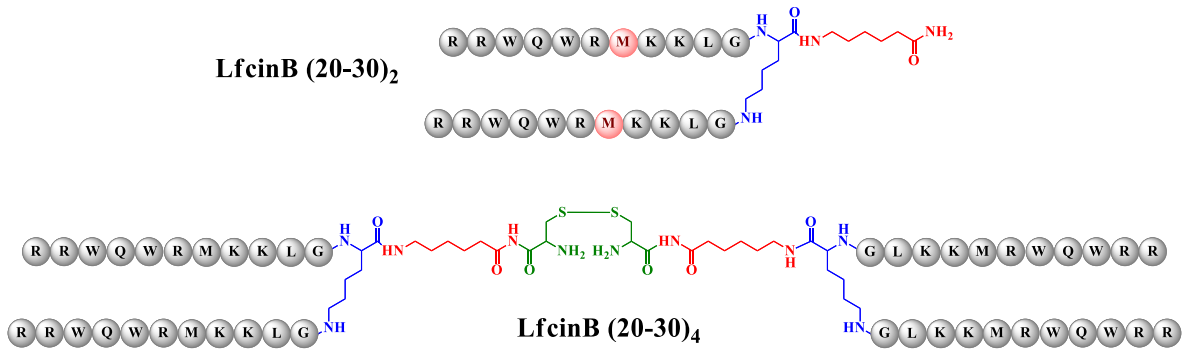


Figura 4. Péptidos polivalentes (arriba: dímero, abajo: tetrómero), derivados de la LfcinB (20-30). Las esferas grises representan los aminoácidos involucrados en la secuencia. En azul: Lísina, rojo: ácido 6-aminohexanoico, verde: cisteínas formando puente disulfuro

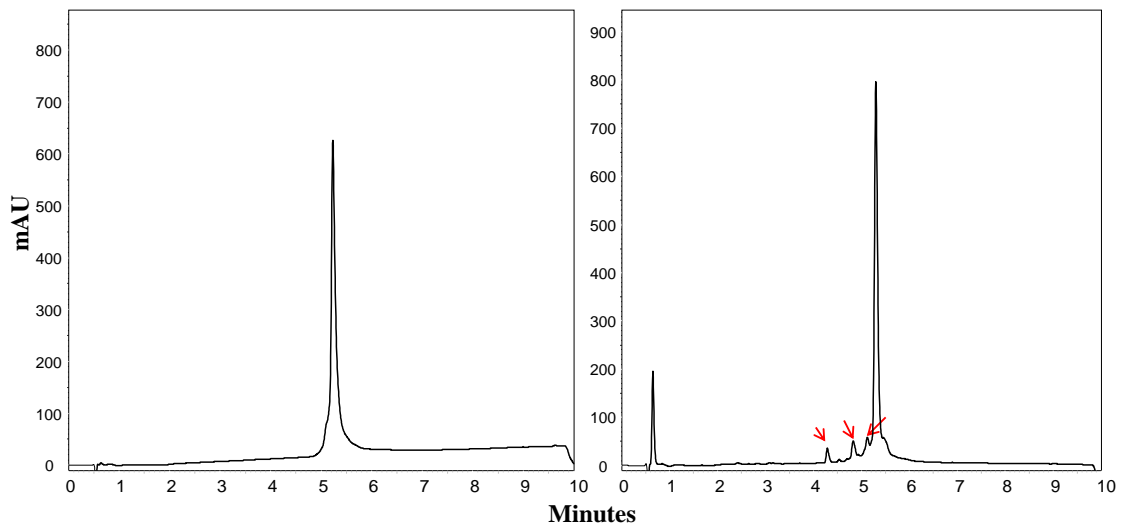


Figura 5. Péptido LfcinB (20-30)₂. Izquierda: tiempo cero. Derecha: Cuatro meses de almacenamiento a Tamb.

2. HIPÓTESIS

Péptidos diméricos análogos de la secuencia LfcinB (20-30)₂: (RRWQWRMKKLG)₂-K-Ahx presentarán igual o mayor efecto citotóxico, contra líneas celulares derivadas del cáncer de mama, que el péptido original.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

En este proyecto se seleccionó la molécula dimérica LfcinB (20-30)₂ a partir de la cual se realizan modificaciones en su secuencia, que permitan mantener o potenciar su actividad y selectividad frente a líneas celulares de cáncer de mama. También se evaluó el efecto sobre la línea HEK-293 y fibroblastos, para corroborar su selectividad. El diseño experimental de este proyecto contempló varias etapas que se describen a continuación y se ilustran en la Figura 6.

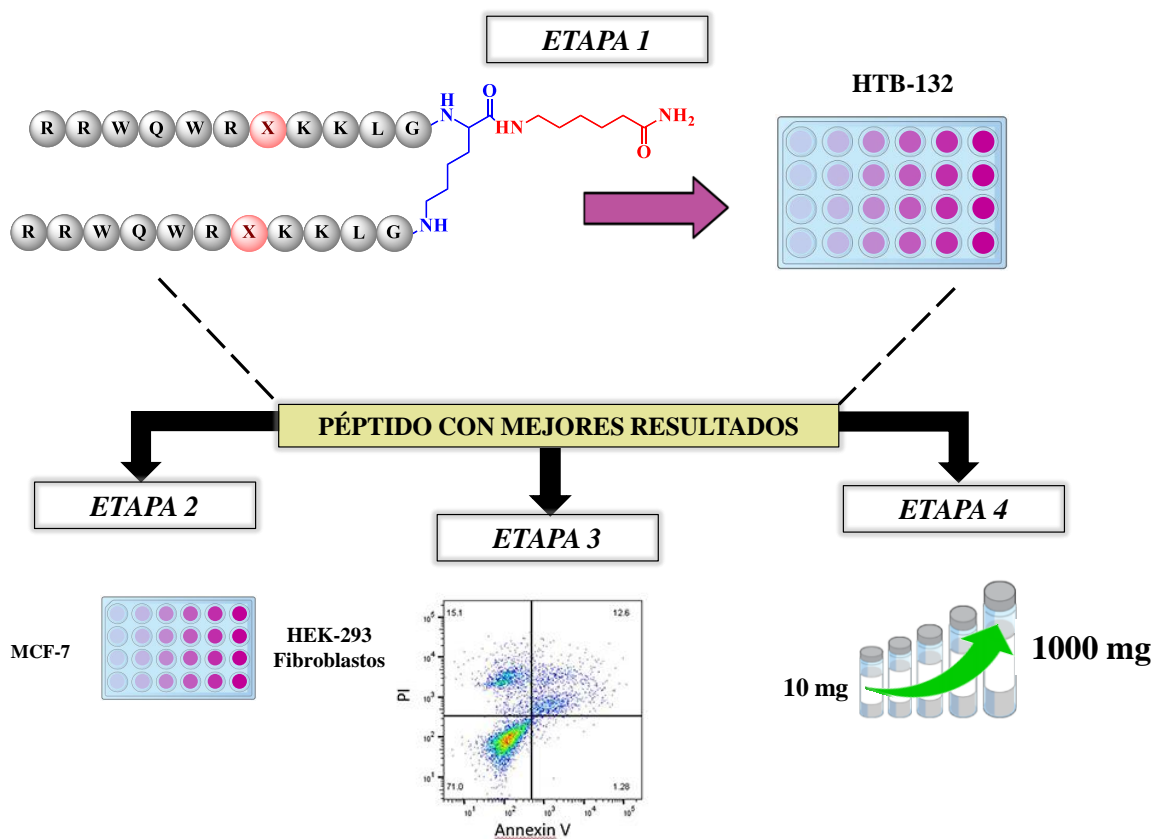


Figura 6. Diseño experimental del proyecto de investigación.

Etapa 1. A partir del péptido LfcinB (20-30)₂: (RRWQWRMKKLG)₂-K-Ahx, se diseñaron los péptidos análogos: (RRWQWRDKKLG)₂-K-Ahx, (RRWQWRKKKLG)₂-K-Ahx, (RRWQWRAKKLG)₂-K-Ahx, (RRWQWRLKKLG)₂-K-Ahx, (RRWQWREKKLG)₂-K-Ahx, donde la posición 26 fue modificada con diferentes aminoácidos

Con los dímeros que presentaron mayor viabilidad sintética se realizaron ensayos de citotoxicidad contra la línea HTB-132 con el fin de evaluar si se conservaba o mejoraba el efecto citotóxico, respecto al dímero original.

Etapa 2. Para esta etapa se eligió el péptido que presente mayor o igual efecto citotóxico que el péptido LfcinB (20-30)₂. El dímero que presentó los mejores resultados fue empleado para evaluar el efecto citotóxico contra la línea celular derivada del cáncer de mama MFC-7 y el efecto citotóxico en células epiteliales mamarias no tumorigénicas HEK-293 y fibroblastos para corroborar su selectividad.

Etapa 3. Se estudió de manera preliminar el tipo de muerte celular ocasionada por el péptido dimérico que presentó la mayor actividad citotóxica selectiva, seleccionado en las etapas 1 y 2. Para este ensayo se empleó la línea celular derivada del cáncer de mama en la que el dímero tuvo la mayor actividad.

Etapa 4. Se desarrolló el escalamiento del proceso de síntesis y purificación del dímero seleccionado en las etapas anteriores. Se pretendía obtener un lote de 1000 mg del dímero caracterizado fisicoquímicamente mediante diferentes técnicas analíticas, esto en aras de contribuir a estudios posteriores para el desarrollo de un medicamento contra el cáncer de mama.

Para cumplir con las etapas estipuladas en este proyecto, fue necesario implementar y/o optimizar diferentes metodologías como: (i) la obtención de los péptidos diméricos mediante síntesis en fase sólida SPPS-Fmoc/*t*Bu, (ii) caracterización de los dímeros por diferentes técnicas analíticas, (iii) evaluación del efecto citotóxico mediante ensayos MTT, (iv) estudio preliminar del tipo de muerte celular por ensayos de citometría de flujo y (v) Implementación de síntesis tipo 'buenas prácticas de manufactura' (BPM) y caracterización fisicoquímica de un lote de 1000 mg de una molécula dimérica con actividad citotóxica selectiva contra líneas derivadas de cáncer de mama. La descripción detallada de cada

uno de los procesos involucrados en este proyecto de investigación se muestra a continuación.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la viabilidad sintética de péptidos diméricos análogos a la secuencia (RRWQWRMKKLG)₂-K-Ahx y determinar su efecto citotóxico contra líneas celulares derivadas de cáncer de mama.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Implementar la síntesis, caracterización y purificación de los péptidos diméricos análogos a la secuencia LfcinB (20-30)₂: (RRWQWRMKKLG)₂-K-Ahx, específicamente, (RRWQWRDKKLG)₂-K-Ahx, (RRWQWRKKKLG)₂-K-Ahx, (RRWQWRAKKLG)₂-K-Ahx, (RRWQWRLKKLG)₂-K-Ahx y (RRWQWRFKKLG)₂-K-Ahx.
- 2- Seleccionar los péptidos con mejores rendimientos y purezas obtenidos en el objetivo 1, y evaluar su efecto citotóxico contra la línea HTB-132.
- 3- Evaluar el efecto citotóxico contra MCF-7, HEK-293 y fibroblastos de los péptidos que presenten los mejores resultados en el objetivo 2.
- 4- Evaluar de manera preliminar el tipo de muerte celular generado por el péptido más promisorio en la línea celular derivada de cáncer de mama MCF-7.
- 5- Implementar y optimizar la síntesis de un lote de 1000 mg del péptido dimérico más promisorio empleando una síntesis tipo BPM, y caracterizarlo mediante técnicas analíticas.

5. METODOLOGÍA

5.1 MATERIALES Y MÉTODOS

La resina Rink amida, los Fmoc-aminoácidos, la dicitclohexilcarbodiimida y 1-hidroxi-6-clorobenzotriazol fueron adquiridos en AAPPTec (Louisville, KY, USA). Los reactivos acetonitrilo, ácido trifluoroacético, diclorometano, diisopropiletilamina, N,N-dimetilformamida, etanoditiol, isopropanol y metanol fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Germany). Las columnas SPE Supelclean™ se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Las líneas celulares HTB-132, MCF-7 y HEK-293 se obtuvieron de ATCC® (Manassas, Virginia - Estados Unidos); El kit de viabilidad LIVE / DEAD™ BacLight™ y la anexina V, el conjugado Alexa Fluor™ 488 se obtuvieron de Invitrogen (Eugene, Oregon); el Kit de potencial de membrana mitocondrial se obtuvo de BD Biosciences (Torreyana Rd., San Diego, Ca 92121). El medio de cultivo DMEM se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Se adquirió suero fetal bovino en Gibco (Massachusetts, Estados Unidos).

5.2 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA Fmoc/tBu

Los péptidos diméricos diseñados para este estudio fueron sintetizados mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) manual, empleando la estrategia Fmoc/tBu⁴⁷, esta síntesis se desarrolló según el protocolo establecido en el grupo SAMP.

La SPPS-Fmoc/tBu involucró reacciones de desprotección, acople y monitoreo que se repitieron hasta obtener la secuencia deseada. Los Fmoc-aminoácidos se fueron incorporando al soporte sólido secuencialmente del extremo C-terminal al N-terminal. La resina que se empleó fue la Rink amida (0,46 meq/g) la cual permitió obtener péptidos con terminación amida (C-terminal), esta resina se sometió a un proceso de hinchamiento con diferentes solventes N,N-dimetilformamida (DMF) y Diclorometano (DCM). En la Figura 7 se muestra el diagrama del proceso de síntesis; el Paso 1 corresponde a la reacción de remoción del grupo Fmoc (desprotección), el Paso 2 es la reacción de formación del enlace peptídico (acople) entre los aminoácidos de la secuencia y el Paso 3 involucra las reacciones de desprotección de las cadenas laterales y la separación del péptido de la resina (Clivaje). Para determinar si las reacciones de desprotección y acople fueron

completas se empleó el test de Kaiser⁴⁸, que permitió determinar la presencia de grupos amino libres.

El péptido crudo fue analizado mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), y purificado por extracción en fase sólida (RP-SPE) con elución por gradiente. El producto purificado se caracterizó por RP-HPLC y por espectrometría de masas MALDI-TOF y/o ESI-Q/TOF.

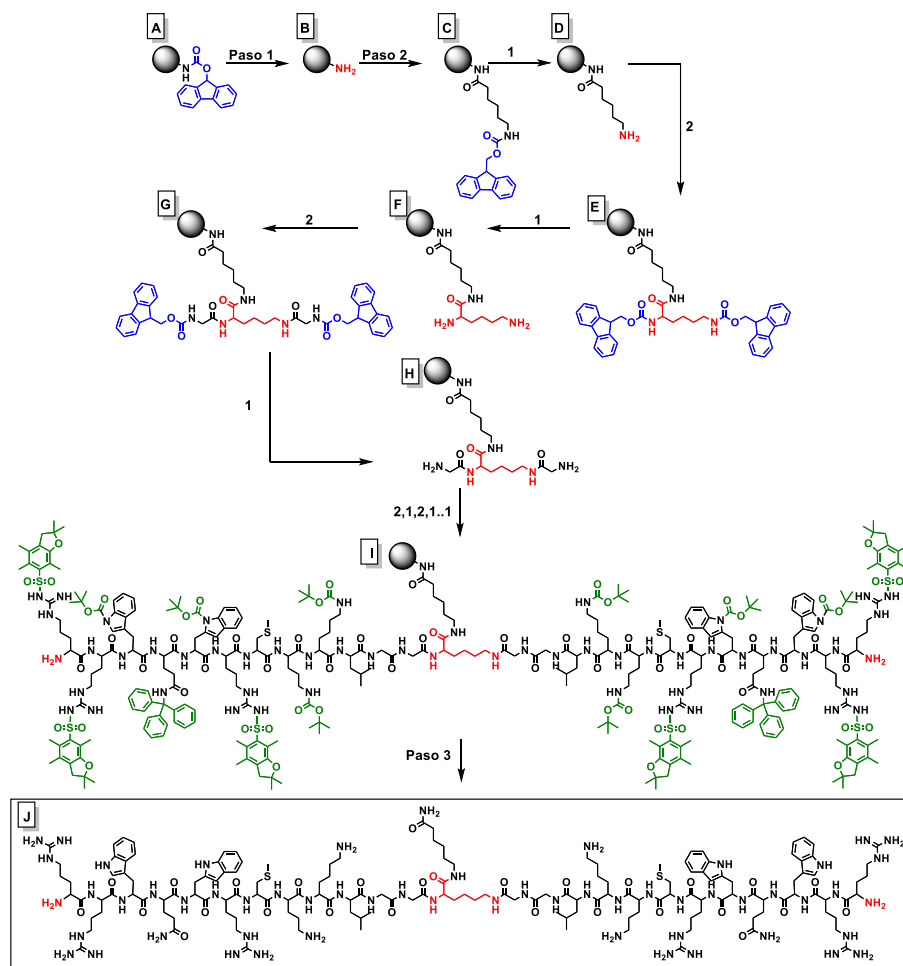


Figura 7. Diagrama de la síntesis de péptidos diméricos en fase sólida (SPPS-Fmoc/tBu).

5.2.1 DESPROTECCIÓN: REACCIÓN DE REMOCIÓN DEL GRUPO FMOC

Los aminoácidos utilizados en la SPPS/Fmoc-tBu poseían una protección de tipo ortogonal, el grupo α -amino estaba protegido con el grupo Fmoc y las cadenas laterales de los aminoácidos tenían grupos protectores que son lábiles al tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA), como los grupos tritilo (trt) y terbutilo (tBu), entre otros. La remoción

del grupo Fmoc, reacción de β -eliminación, se realizó por tratamiento con una base débil, esta se llevó a cabo empleando una solución de piperidina^{49,50} al 2,5% v/v que contenía tritón al 0,1% v/v, en DMF (Figura 5. Paso 1). La resina fue agitada entre 1-24 horas, y finalmente, fue lavada con DMF, y DCM (3 lavados \times 1 minuto con cada solvente) y se realizó el test de Kaiser.

5.2.2 ACOUPLE: REACCIÓN DE ACTIVACIÓN E INCORPORACIÓN DE LOS FMOC-AMINOÁCIDOS A LA RESINA

Para la activación de los grupos ácido carboxílico presentes en los Fmoc-aminoácidos, se emplearon diferentes estrategias que condujeron a la formación de ésteres; si la reacción de formación del enlace peptídico no era completa fue necesario cambiar la estrategia y repetir el acople hasta que el test de Kaiser fuera negativo (coloración amarilla). En este trabajo se empleó la estrategia de éster modificado: Se disolvieron Fmoc-aminoácido, dicitohexilcarbodiimida (DCC), y 6-cloro-hidroxibenzotriazol (6-Cl-HOBt) (1:1:1); en 5 excesos respecto a los miliequivalentes (mEq) de resina, empleando DMF como solvente y se agitó la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego la mezcla de reacción fue adicionada a la resina. La reacción fue monitoreada por el Test de Kaiser, cuando el test indicaba presencia de grupos amino libres, se trató nuevamente la resina con solución del Fmoc-aminoácido activado, hasta que el test de Kaiser fuera negativo (color amarillo).

5.2.3 REACCIÓN DE MONITOREO: TEST DE KAISER

Para realizar la prueba de Kaiser⁴⁸, se prepararon tres disoluciones: (i) 40 g de fenol disueltos en 10 mL de etanol absoluto; (ii) 0,65 mg de KCN, 1,0 mL de agua y 49,0 mL de Piridina; (Solución B) 1,25 g de Ninhidrina en 25 mL de etanol absoluto. Las disoluciones (i) y (ii) fueron mezcladas y almacenadas (Solución A). La Solución B se almacenó en la oscuridad. Para realizar la prueba de Kaiser se tomó una pequeña cantidad de resina-peptido seca (aproximadamente 1 mg) y se le adicionó las soluciones A y B en proporción 2:1 (v/v). Luego se homogenizó la mezcla y se sometió a calentamiento a 90°C por 7 minutos. Transcurrido este tiempo se observó la coloración de la disolución. Una coloración azul indicó prueba positiva para la presencia de grupos aminos primarios libres y una coloración amarilla, prueba negativa. En el caso de la prolina (aminas secundarias), la prueba positiva correspondió a una coloración roja en la resina, y la prueba negativa una coloración amarilla.

5.2.4 CLIVAJE: SEPARACIÓN DEL PÉPTIDO DE LA RESINA

Una vez fueron incorporados todos los aminoácidos, se realizó la remoción del grupo Fmoc y la resina-péptido desprotegida se secó, se pesó y se le adicionó una solución de clivaje que contenía TFA/H₂O/EDT/TIPS (92,5/2,5/2,5/2,5% v/v). La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por 4 horas (Figura 7. Paso 3). Transcurrido este tiempo la disolución fue filtrada y el péptido se precipitó adicionando éter etílico a -20°C. La disolución se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos y el sobrenadante se desechó, luego se realizaron cinco lavados con éter etílico bajo las condiciones descritas anteriormente. Al finalizar el último lavado se descartó el sobrenadante y se dejó secar el sólido obtenido a temperatura ambiente.

5.2.5 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS DIMÉRICOS

Los péptidos diméricos se sintetizaron empleando la metodología descrita previamente la cual se ejemplifica en la figura 7. En el diseño sintético de dímeros, el primer residuo que se acopló es el ácido 6-aminohexanoico (*Ahx*), este funciona como un espaciador entre la resina y la secuencia peptídica que se desea sintetizar. Una vez acoplado el *Ahx* el siguiente paso fue acoplar el aminoácido Fmoc-Lys(Fmoc)-OH que estaba protegida tanto en su ϵ -amino como en su α -amino por un grupo Fmoc, lábil a tratamiento básico (Figura 7E). Posteriormente la resina se desprotegió para obtener la especie que se observa en la figura 7F, de esta manera existían presentes en la estructura dos grupos amino libres por los que se fueron incorporando los siguientes aminoácidos y de esta manera inició la elongación simultánea de dos cadenas peptídicas análogas para obtener el dímero (Figura 7F-I). Finalmente se realizó el proceso de clivaje convencional para remover los grupos protectores de las cadenas laterales, generando el dímero (Figura 7J), que fue precipitado y lavado con éter etílico. Posteriormente el dímero obtenido fue purificado y caracterizado por técnicas analíticas (RP-HPLC y MS).

5.3 ANÁLISIS POR RP-HPLC

Para el análisis por RP-HPLC, se preparó una solución del péptido crudo de 1 mg/mL, se utilizó la fase móvil: Solvente A: 0,05% TFA en agua y Solvente B: 0,05% TFA en ACN. Como fase estacionaria se emplearon dos columnas monolíticas: una Chromolith® C-18 (50x4,6 mm) y una Chromolith® High Resolution^{RP} C-10 (100-4,5 mm). Se usó un

gradiente de elución del 5 al 50% de Solvente B en 8 minutos a un flujo de 2,0 mL/min, volumen de inyección 10 μ L y 210 nm para la detección. Los equipos empleados fueron un cromatógrafo Agilent Series 1260 y un Hitachi Primaide 1100 DAD, disponibles en el grupo de investigación SAMP del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.

5.4 PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA, SPE

Para la purificación de los péptidos se emplearon columnas de RP-SPE de 5 g (Tamaño de partícula: 40-60 μ m). El péptido se disolvió en el Solvente A, la muestra se sembró y luego se eluyó con soluciones que contenían diferentes porcentajes de Solvente B. Las fracciones que contenían al péptido puro se unieron y liofilizaron. Los productos finales se almacenaron en desecador con sílica gel a -20°C sellados con parafilm.

5.5 ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

El peso molecular de los péptidos se determinó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (microFlex, Bruker) disponible en el laboratorio de Micología de la Pontificia Universidad Javeriana y/o en el espectrómetro de masas de alta resolución HPLC ESI-Q/TOF disponible en el departamento de Geología de la Universidad Nacional de Colombia.

En el caso de los análisis por MALDI-TOF, 1 μ L de la solución del péptido purificado (0,5 mg/mL) se mezcló con 18 μ L de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, 5 mg/mL), luego 1 μ L de la mezcla fue sembrada sobre la placa porta muestra. La potencia del láser osciló entre los 2700 y 3000V, y se realizaron 200 disparos del láser.

En cuanto a los análisis por HPLC ESI-Q/TOF, 2 μ L de péptido puro fueron analizados en modo positivo. Se empleó una columna Intensity Solo C18 (2,1 x 100 mm, 1.8 μ m) (Bruker Daltonik), a 40°C y un flujo de 0,250 mL/min. Como fase móvil A se empleó H₂O y como fase móvil B ACN, ambas con ácido fórmico 0,1 %. El programa de elución fue 5/5/95/95/5/5 %B en 0/1/11/13/13,1/15 minutos. Condiciones de fuente ESI: Capilar 4500 V, nebulizador 1,8 bar, gas de secado N₂ 8,0 L/min, temperatura de secado 220°C. Modo de adquisición autoMS/MS con rango espectral de 20-1000 m/z y tasa de espectros de 2 Hz. Energía de collision 5,0 ev.

5.6 CULTIVO CELULAR

El cultivo celular se efectuó de acuerdo con la metodología estandarizada en el Laboratorio de Respuesta Inmune Innata de la Interacción Hospedero Patógeno del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB. Michoacán, México). Las células que se emplearon en este trabajo se describen en la Tabla 3.

Para todas las líneas celulares, el medio usado es el Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/ Nutrient Mixture F-12 Ham. Este medio fue suplementado con diferentes sustancias dependiendo de la línea celular en crecimiento. Para las líneas HTB-132, MCF-7 y HEK-293, el medio fue suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, y se le adicionaron 1,5 g/L de NaHCO_3 y NaOH hasta pH de 7,4, anfotericina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y penicilina y estreptomina al 1%. Para las células de cultivo primario de fibroblastos, adicional a lo anterior se adiciona hidrocortisona (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Todos los medios fueron filtrados por membrana de 0,22 μm .

Tabla 3. Características principales de las líneas celulares que se evaluarán en este proyecto.

Línea Celular	MDA-MB-468	MCF-7	HEK-293	Fibroblastos
Nombre ATCC	HTB-132™	HTB-22™	CRL-1573™	----
Organismo	Humano	Humano	Humano	Humano
Tejido	Glándula mamaria	Glándula mamaria	Riñón	Prepucio
Morfología	Epitelial	Epitelial	Epitelial	Epitelial
Propiedades de cultivo	Adherente	Adherente	Adherente	Adherente/ Cultivo primario
Enfermedad	Adenocarcinoma	Adenocarcinoma	Normal	Normal
Edad	51 años	69 años	Embrión	----
Género	Femenino	Femenino	----	Masculino
Etnia	Negra	Caucásica	----	----
Expresión de receptores	EGF, TGF alfa	RH+	Vitronectina	----
Medio de cultivo	DMEM-F12	DMEM-F12	DMEM-F12	DMEM-F12
Tiempo de duplicación	47 horas	29 horas	28 horas	----

Los materiales fueron esterilizados en un autoclave Felisa® FE-397. (Voltaje: 120 V, potencia: 3000 W, frecuencia: 60 hz, T: 125°C). Se trabajó en una cabina de flujo laminar Thermo Scientific 1300 Series A2 (Voltaje 120 V). Las células se monitorearon en un microscopio invertido Zeiss Primo Vert acoplado a una cámara AxioCam ICc1 para el registro fotográfico. Las líneas celulares se almacenaron en un tanque de N₂ Thermo Scientific Locator Junior Plues de 60 litros a -195,8°C.

5.6.1 DESCONGELAMIENTO DE CÉLULAS

El descongelamiento de las líneas celulares se realizó de acuerdo con la metodología del Laboratorio Respuesta Inmune Innata de la Interacción Hospedero Patógeno (M3) del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB).

Las líneas celulares almacenadas en un criovial, fueron sacados del tanque de N₂ y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ en atmósfera húmeda de 5 a 10 minutos. Una vez que se alcanzó el estado líquido, las células se transfirieron a un tubo eppendorf de 1,5 mL y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, las células se resuspendieron en 1 mL de medio completo y se sembraron en una caja Petri que contenía entre 5 y 10 mL de medio completo dependiendo del número de células.

5.6.2 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS

La preparación de los medios se realizó según protocolos del laboratorio del CMEB. Todo el material empleado fue esterilizado en autoclave antes de la preparación.

A un litro de agua destilada previamente esterilizada se le adicionó el contenido completo de un frasco de medio F-12 D8900 de Sigma establecido para 1 litro de medio. Se adicionaron 1,5 g de NaHCO₃ y se verificó el pH. Cuando fue necesario se adicionó NaOH 1 M hasta obtener un pH de 7,4. El contenido se ingresó a cabina de flujo laminar y se filtró por membrana de 0,22 µm (Medio incompleto). Para la obtención del medio completo se adicionaron los suplementos necesarios y se filtró por membrana de 0,22 µm. El medio incompleto se almacenó a -20°C y el medio completo a 4°C.

5.6.3 SUBCULTIVO CELULAR Y CONGELAMIENTO DE CÉLULAS

Cuando las células se encontraban en una confluencia entre el 70 y 90%, se retiró el medio y se adicionaron 4 mL de tripsina al 2,5% en PBS y 3,7 mg/mL de EDTA. Se incubó durante 5 minutos y se adicionaron 4 mL de medio completo para inactivar la tripsina. La suspensión fue recuperada en un tubo falcon de 15 mL y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y las células se resuspendieron en 1 mL de medio completo. Se adicionan 20 µL de suspensión celular en una cámara de Neubauer y se contaron las células. Se sembró la cantidad de células deseada a una caja Petri de 10 o 5 mL y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ en atmósfera húmeda.

5.7 ENSAYO DE VIABILIDAD POR MTT

Los ensayos MTT se realizaron de acuerdo con la metodología estandarizada en el laboratorio Respuesta Inmune Innata de la Interacción Hospedero Patógeno del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB. Michoacán, México). Brevemente, las células fueron sembradas con medio completo en placas de 96 pozos a razón de 10.000 células y 100 μ L por pozo, y se permitió a su adhesión a las placas durante 24 horas. Posteriormente el medio completo fue retirado y se agregó medio incompleto para su sincronización durante 24 horas más. Luego las células se incubaron a 37°C durante 2, 24 o 48 horas con 100 μ L de péptido a las concentraciones a evaluar (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,1 μ g/mL). A continuación, se retiró el péptido de la caja y se adicionaron 100 μ L de medio incompleto con 10% de bromuro de 3-4,5-dimetiltiazol-2-ilo-2,5-difeniltetrazol (MTT) y se incubaron por 4 horas. El medio fue reemplazado por 100 μ L de isopropanol (IPA) y luego de 30 minutos de incubación a 37°C, la absorbancia se midió a 575 nm. Como control negativo se empleó medio de cultivo incompleto con MTT al 10% y como control positivo se utilizaron células sin tratamiento con MTT⁵¹.

5.8 ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE LOS PÉPTIDOS

Glóbulos rojos humanos normales fueron centrifugados a 2500 rpm durante 8 minutos y se lavaron tres veces con PBS o solución salina al 0,9%. Posteriormente 100 μ L de células (2% de hematocrito) se mezclaron con 100 μ L del péptido (200, 100, 50, 25, 12,5 y 3,1 μ g/mL) y se incuban a 37°C durante 2 horas. Las muestras fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pozos y la absorbancia se leyó a 540 nm. El 0% de hemólisis fue tomado como el sobrenadante de los glóbulos rojos en PBS, y el 100% de hemólisis correspondió al sobrenadante de glóbulos rojos tratados con agua destilada⁵².

5.9 EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA USANDO SYTO 9/IP

Las células con medio completo fueron sembradas y sincronizadas en cajas de 24 pozos en una concentración de 4×10^4 células/pozo en un volumen de 400 μ L/pozo y se permitió la adhesión a la placa durante 24 horas. Luego, el medio completo fue reemplazado por medio incompleto para la sincronización de las células durante 24 horas más.

Posteriormente, el medio de cultivo fue reemplazado con 400 μL de una solución que contenía el péptido a evaluar a una concentración equivalente a su IC_{50} y se incubó durante 2 o 24 horas, las células fueron cosechadas adicionando 200 μL de tripsina e incubando durante 10 minutos. La tripsina fue inactivada con 200 μL de medio completo y se centrifugaron las células a 2500 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y el pellet se lavó con 100 μL PBS y se centrifugó bajo las mismas condiciones previamente descritas. Se desechó el sobrenadante y las células se tiñeron con 30 μL de una solución del kit comercial LIVE/DEAD[®] FungaLigth[™] (Invitrogen) que contenía la mezcla de los fluorocromos (0,5 μL de SYTO9 y/o 0,5 μL de Ioduro de propidio (IP) con 99 μL de PBS). Posteriormente, las células fueron incubadas a temperatura ambiente y oscuridad durante 20 minutos, se centrifugaron y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 100 μL de PBS y se analizó mediante citometría de flujo en un equipo BD Accuri C6 disponible en el laboratorio M3 del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB). Los eventos fueron registrados usando el canal verde (FL1) en el eje de las abscisas y rojo (FL3) en el eje de las ordenadas. Control negativo: Células sin tratamiento marcadas con ambos fluoroforos. Control positivo: Células tratadas con actinomicina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 horas⁵³. Para definir la población de trabajo se empleó un control de células sin tratamiento y sin teñir. Para realizar la compensación se emplean dos controles: (i) Células sin tratamiento teñidas únicamente con IP y (ii) Células sin tratamiento teñidas únicamente con Syto9.

5.10 DETERMINACIÓN DEL TIPO DE MUERTE CELULAR APOPTÓISIS/ NECROSIS

Las células fueron sembradas y sincronizadas en cajas de 24 pozos en una concentración de 4×10^4 células/pozo en 400 μL /pozo, se permitió la adhesión y sincronización de las células y el medio de cultivo es reemplazado con medio que contiene el péptido a evaluar y se incuba durante 2 o 24 horas. Posteriormente las células fueron cosechadas con tripsina, centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos, lavadas con PBS y resuspendidas en 10 μL de buffer de tinción con los fluorocromos (Hepes 10 mM pH 7.4; 10 mM NaCl y 2,5 mM de CaCl_2 que contenía 1 μL de fluorocromo 7AAD y 1 μL de Anexina V). Las células con los fluorocromos se incubaron a 37°C y en oscuridad durante 15 minutos y se resuspendió en 80 μL de buffer de tinción sin fluorocromos para su análisis por citometría

de flujo. Como control positivo de necrosis se empleó: Células tratadas con EDTA 15 mM por 60 minutos, y de apoptóticas: Células tratadas con Actinomicina a 10 μ M durante 24 horas. Control negativo: Células sin tratamiento. Controles de compensación: Células teñidas (i) sólo con Anexina y (ii) sólo con 7AAD. Control de población: Células sin teñir y sin tratamiento.

5.11 DETERMINACIÓN DE LA DESPOLARIZACIÓN DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL

Para este ensayo se usó el kit MitoProbe™ JC-1 Assay (M34152 de Termofisher) según las recomendaciones del proveedor. Las células sembradas y sincronizadas en caja de 24 pozos (4×10^4 células/pozo) fueron incubadas con 400 μ L de péptido a evaluar por 2 y 24 horas. Luego las células fueron tripsinizadas y recolectadas mediante centrifugación a 400 g por 5 minutos. El pellet resultante fue teñido agregando 100 μ L de JC1 “working solution” (Solución 1:100 de JCI reconstituido en DMSO: Buffer assay 1X) e incubado a 37°C por 20 minutos. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces con Buffer assay 1X y finalmente resuspendidas en 100 μ L de buffer assay 1X para su lectura en el citómetro. Control negativo: células sin tratamiento. Control positivo: células tratadas con actinomicina 10 μ M durante 24 horas.

5.12 ENSAYO DE FLUJO DE CALCIO

El ensayo de flujo de calcio extracelular fue realizado acorde a Jiménez-Alcantar et al⁵⁴. 1×10^5 células fueron sincronizadas durante 24 h en medio incompleto e incubadas con el colorante de indicador de calcio de acuerdo al proveedor (calcium assay kit (BD Biosciences) por 1 hora. En un citómetro de flujo BD Accuri™ se leyó la línea base durante un minuto y luego se adicionó el péptido de estudio en su concentración IC₅₀. Se continuó la lectura durante 4 minutos adicionales. Como control positivo se empleó 4-Alfa-Forbol-12-Myristato-13-acetato (3 mM, PMA, Sigma).

5.13 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE CASPASAS 8 Y 9

La evaluación de caspasas 8 y 9 fue llevada a cabo según Jiménez-Alcantar et al⁵⁴. 8×10^4 células fueron sincronizadas con medio incompleto por 24 horas y tratadas con el péptido evaluado a su concentración IC₅₀. Posteriormente, las células fueron cosechadas y teñidas

de acuerdo al proveedor (GaspGlow™ Fluorescein Active Caspase-8 or 9 staining Kit). La lectura se realizó en un citómetro de flujo BD Accuri™. Control positivo: ActD 0,5 μM.

5.14 Modelo de toxicidad *in vivo* en *Galleria mellonella*

Se realizó limpieza en el extremo inferior de las larvas con un isopo e hipoclorito al 70%, posteriormente se inocularon con 10 μL (ultima pata derecha) de las diferentes concentraciones de péptido (400, 600 y 800 μL), cada grupo de tratamiento estaba conformado por 10 larvas y se realizó por duplicado. Como controles se utilizaron: 10 larvas sin limpiar como control absoluto, 10 larvas a las que se realizó la limpieza y 10 larvas a las cuales se les inoculo solución salina 0,9%, como control de inoculación. A continuación, se incubaron las larvas a 37°C y se realizó seguimiento por 10 días. Los datos de viabilidad se analizaron mediante curvas de Kaplan Meyer.

5.15 Modelo preliminar de toxicidad *in vivo* en ratones

Experimento 1. Se agruparon ratones CD1 macho (8 semanas de edad, con un peso de 33-35 g) en grupos de 6 animales por jaula para cada péptido $^{26}\text{[F]}\text{-LfcinB (20-30)}_2$ y $^{26}\text{[1-Nal]}\text{-LfcinB (20-30)}_2$; 3 ratones fueron inoculados por vía intraperitoneal (ip) y 3 ratones fueron inoculados por vía subcutánea (sc). Los ratones inoculados vía ip o sc con solución salina se usaron como control. El péptido se disolvió en solución salina (7 mg/mL) y los ratones se inocularon una sola vez con 0,33-0,35 mL (dosis de 70 mg/kg) vía ip o sc.

Experimento 2. Ratones CD1 hembra (n= 4, 8 semanas de edad, peso 33-35g) fueron inoculados una sola vez con péptido $^{26}\text{[F]}\text{-LfcinB (20-30)}_2$ (dosis 140 mg/kg) o $^{26}\text{[1-Nal]}\text{-LfcinB (20-30)}_2$ (8,8 a 70 mg/kg).

Todos los experimentos se realizaron cumpliendo con los lineamientos y normas de la Resolución 08430 de 1993 del Ministerio de Salud y la Ley 84 del 27 de diciembre de 1989 y se rigieron por los principios y normas del comité de ética para el cuidado y uso de

animales, decretado por el comité de ética institucional de la Universidad Nacional de Colombia.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Obtención de péptidos diméricos derivados de LfcinB (20-30)₂ y evaluación de su efecto citotóxico *in vitro* contra líneas celulares de cáncer de mama

Los péptidos sintéticos, son moléculas versátiles que tienen numerosas aplicaciones como: agentes antimicrobianos y anticancerígenos; en el desarrollo de métodos de diagnóstico y biomarcadores, en la industria cosmética y de alimentos entre muchas otras^{42,44,55,56}. Independiente de la utilidad que se le dé al péptido sintético, este debe pasar por tres fases para su obtención: (i) Síntesis, (ii) purificación y (iii) caracterización; por lo que estas etapas se consideran los pilares fundamentales que han permitido todo el desarrollo científico y tecnológico alrededor de los péptidos en los últimos años. En esta tesis de doctorado se optimizó y estandarizó cada una de estas etapas para los péptidos obtenidos.

Con respecto a la primera etapa (síntesis), se optimizó la concentración de piperidina empleada en el paso de desprotección; pasando de un 25% v/v, que es la concentración que se utiliza comúnmente en la síntesis de péptidos en fase sólida, a un 2,5% v/v (10 veces menos). Mediante diferentes técnicas de caracterización se demostró que es posible obtener péptidos con purzas elevadas y una eficiencia de desprotección cercana al 100% a esta concentración de piperidina, lo cual contribuye significativamente a que la síntesis sea más económica y amigable con el medio ambiente. El desarrollo de esta optimización fue publicado en la revista *International Journal of Peptide Research*⁵⁰ (Para mayor información ver anexo A-1.2).

En el caso de la segunda etapa (purificación), se desarrolló, optimizó e implementó un nuevo método de purificación de péptidos por extracción en fase sólida en modo fase reversa (RP-SPE). A partir del perfil cromatográfico (RP-HPLC) de la molécula sin purificar y utilizando un modelo matemático, se transfiere el programa de elución a la separación por RP-SPE. Este método de purificación es rápido, económico y con bajo consumo de solventes; se puede purificar hasta 150 mg de péptido en una sola corrida y puede ser implementado rutinariamente como alternativa a la purificación por cromatografía RP-HPLC preparativa y semi-preparativa. El desarrollo de este método de purificación fue publicado en la revista *Molecules*⁵⁷ (Para mayor información ver anexo A-1.4).

En la tercera etapa (caracterización), fue posible optimizar el método cromatográfico para el análisis rutinario de péptidos por RP-HPLC a través del modelo de van Deemter y el concepto de factor de retención en el gradiente (k^*). A partir de este trabajo, se logró transferir un método cromatográfico que tenía un tiempo de análisis de 70 minutos en una columna empacada, a un método cromatográfico empleando una columna monolítica, con un tiempo de análisis cercano a 10 minutos, y manteniendo la resolución del perfil cromatográfico. El desarrollo del método fue publicado en la revista *ACS Omega* (Para mayor información ver anexo A-1.3).

A partir de las condiciones previamente descritas, el péptido LfcinB (20-30)₂: (20RRWQWRMKKLG³⁰)₂-K-Ahx y once péptidos diméricos análogos, en los que la posición 26 fue reemplazada por diferentes aminoácidos, fueron obtenidos usando SPPS-Fmoc/tBu, purificados por RP-SPE y caracterizados por RP-HPLC y espectrometría de masas (MS). Para realizar las modificaciones puntuales de la posición 26 se eligieron aminoácidos de diferentes características: (i) Aminoácidos con carga: ácido aspártico, Asp (D), y lisina, Lys (K), (ii) aminoácido sin carga: Alanina, Ala (A), (iii) aminoácido hidrofóbico alifático: leucina, Leu (L), y (iv) aminoácido hidrofóbico aromático: Fenilalanina, Phe (F). Como ejemplo, en la Figura 8 se ilustra la caracterización del péptido ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂: (RRWQWRFKKG)₂-K-Ahx, en el cual la posición 26 fue reemplazada por fenilalanina. El perfil cromatográfico obtenido muestra una señal mayoritaria con un tiempo de retención (t_R) de 5,6 minutos y una pureza cromatográfica, a 210 nm, de 91,2 %. Adicionalmente, se reporta el espectro de masas obtenidos por ESI-Q/TOF, donde mediante deconvolución de las señales se obtiene un valor de masa experimental de $3341,9736 \pm 0,0017$ uma, que

corresponde al valor de masa teórica esperado (3341,97 uma). Todos los demás péptidos fueron caracterizados de la misma manera (ver anexo B).

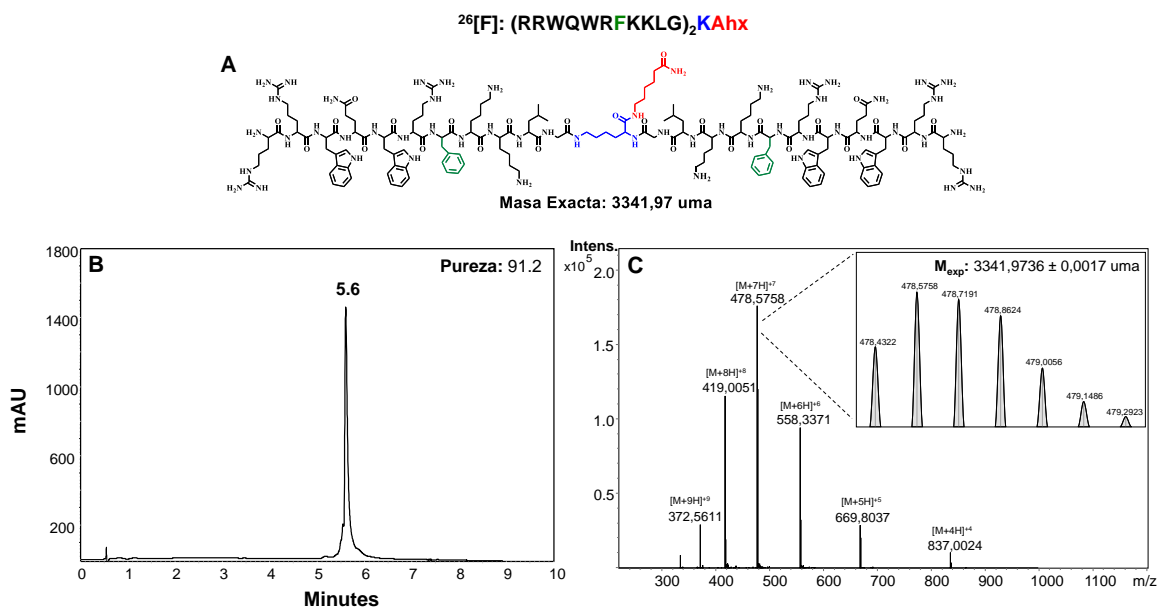


Figura 8. Caracterización analítica del péptido $^{26}\text{[F]-LfcinB (20-30)}_2$. **A.** Estructura química y masa exacta, **B.** Perfil cromatográfico del péptido puro a 210 nm. **C.** Espectro de masas ESI-Q/TOF.

En la Tabla 4 se presenta el resumen de la caracterización de los once péptidos diméricos sintetizados en este trabajo. Como se puede observar, la mayoría de ellos se obtuvieron con purezas superiores al 90% y la masa experimental obtenida, correspondió a la esperada (ver Anexo B). Los péptidos de la tabla 4 están organizados en dos grupos: El grupo 1 corresponde a los cinco dímeros análogos comprometidos dentro de los objetivos de esta tesis, en los cuales la posición 26 fue reemplazada por Asp, Lys, Ala, Leu o Phe; mientras que el grupo 2 corresponde a seis péptidos análogos en los cuales la posición 26 fue reemplazada por aminoácidos no naturales. Los péptidos del grupo 2 fueron sintetizados como consecuencia de los resultados obtenidos para el grupo 1 durante el desarrollo del proyecto y serán discutidos más adelante. Por facilidad, los dímeros serán nombrados según el código presentado en la Tabla 4, en el que se indica el aminoácido que se encuentra en la posición 26. Por ejemplo, el péptido original LfcinB (20-30)₂: (RRWQWRMKKLG)₂-K-Ahx se nombra como $^{26}\text{[M]}$.

Con respecto al grupo 1, la incorporación de los aminoácidos Lys, Asp y Ala en la posición 26 disminuyeron el t_R del péptido dimérico pasando de 5,3 min para el péptido original, $^{26}\text{[M]}$, a 4,8 min para los péptidos $^{26}\text{[K]}$, $^{26}\text{[D]}$ y $^{26}\text{[A]}$ lo cual obedece a una disminución en

la hidrofobicidad del péptido debido a que los aminoácidos Lys Asp y Ala son más polares que Met. Los péptidos ²⁶[L] y ²⁶[F] aumentaron el t_R a 5,5 y 5,6 minutos respectivamente, debido a un evidente incremento de la hidrofobicidad de la secuencia dada la naturaleza de las cadenas laterales de estos aminoácidos. En cuanto a las condiciones de síntesis, todos los péptidos tuvieron un comportamiento similar. La incorporación de los aminoácidos requirió en su mayoría uno y máximo dos ciclos de reacción de acople por lo que se pudo concluir que todos los dímeros análogos son viables sintéticamente y aptos para la siguiente etapa del trabajo, que consistió en la evaluación del efecto citotóxico que ejercen contra la línea celular de cáncer de mama HTB-132.

Tabla 4. Caracterización y efecto citotóxico contra líneas celulares de cáncer de mama de péptidos diméricos análogos a la secuencia ²⁶[M]-LfcinB (20-30)₂.

Grupo	Código	Secuencia	Caracterización			IC ₅₀ μM (μg/mL)	
			RP-HPLC		m/z [M+H] ⁺	HTB-132	MCF-7
			t _R (min)	Pureza* (%)			
1 ^a	²⁶ [M]	(RRWQWR M KKLG) ₂ -K-Ahx	5,3	94	3312,3	30 (96)	>60 (>200)
	²⁶ [K]	(RRWQWR K KKLG) ₂ -K-Ahx	4,8	95	3302,7	>60 (>200)	N.D.
	²⁶ [D]	(RRWQWR D KKLG) ₂ -K-Ahx	4,8	97	3276,7	>60 (>200)	N.D.
	²⁶ [A]	(RRWQWR A KKLG) ₂ -K-Ahx	4,8	95	3187,9	26 (96)	>60 (>200)
	²⁶ [L]	(RRWQWR L KKLG) ₂ -K-Ahx	5,5	92	3272,4	10 (32)	27 (86)
	²⁶ [F]	(RRWQWR F KKLG) ₂ -K-Ahx	5,6	91	3342,5	13 (43)	23 (79)
2 ^b	²⁶ [Dip]	(RRWQWR- Dip -KKLG) ₂ -K-Ahx	6,5	86	3495,1035	N.D.	34 (106)
	²⁶ [Bpa]	(RRWQWR- Bpa -KKLG) ₂ -K-Ahx	5,9	76	3551,0120	N.D.	17 (60)
	²⁶ [4-Abz]	(RRWQWR- 4-Abz -KKLG) ₂ -K-Ahx	5,9	74	2974,7461	N.D.	49 (155)
	²⁶ [2-Abz]	(RRWQWR- 2-Abz -KKLG) ₂ -K-Ahx	5,9	76	2974,7146	N.D.	67 (210)
	²⁶ [1-Nal]	(RRWQWR- 1-Nal -KKLG) ₂ -K-Ahx	6,4	91	3442,9964	N.D.	14 (48)
	²⁶ [hF]	(RRWQWR- hF -KKLG) ₂ -K-Ahx	6,2	94	3370,0620	N.D.	18 (60)

*Pureza cromatográfica a 210 nm. ^a Dímeros caracterizados por MALDI-TOF MS, ^b. Dímeros caracterizados por ESI-QTOF

Con el fin de establecer si las modificaciones realizadas en la posición 26 del dímero para el grupo 1, incrementan el efecto citotóxico en las líneas celulares derivadas de cáncer de mama, los péptidos fueron evaluados, mediante ensayos de MTT. Para el cribado (screening) inicial se escogió la línea celular de cáncer de mama HTB-132, ya que es la línea celular en la que el péptido dimérico original, ²⁶[M], presentó efecto citotóxico

significativo y selectivo en estudios previos⁵⁸. HTB-132 es una línea celular triple negativa, la cual corresponde a uno de los tipos de cáncer de mama más agresivos y de peor pronóstico⁵⁹.

Los resultados de viabilidad celular para HTB-132 se presentan en la Figura 9A-B. Las curvas de viabilidad celular de la línea celular HTB-132 tratada con los péptidos muestran que a medida que aumenta la concentración del péptido disminuye la viabilidad celular, indicando que tanto el péptido ²⁶[M] como sus análogos exhibieron efecto citotóxico significativo y dependiente de la concentración contra esta línea celular. Sin embargo, los péptidos en los cuales la posición 26 fue reemplazada por aminoácidos cargados, Lys y Asp, exhibieron menor citotoxicidad que la del péptido original (Figura 9A). Por otro lado, los péptidos ²⁶[L] y ²⁶[F] generaron mayor efecto citotóxico, indicando que reemplazar esta posición por aminoácidos que contienen una cadena lateral hidrofóbica, incrementa el efecto citotóxico contra HTB-132 (Figura 9B). En la Figura 9E, con fines comparativos, se reporta la viabilidad de las células HTB-132 tratadas con los péptidos a una concentración de 100 µg/mL. La viabilidad celular con ²⁶[M] fue cercana al 50%, mientras que con ²⁶[D] y ²⁶[K] fue superior al 60% lo cual ilustra de manera clara la disminución en el efecto citotóxico al realizar cambios por cadenas polares en la posición 26 del dímero. Por otro lado, la viabilidad celular de las células tratadas con ²⁶[A], ²⁶[L] y ²⁶[F] fue menor a 50%, donde es de resaltar que el péptido ²⁶[F]: (RRWQWREFKKLG)₂-K-Ahx disminuyó la viabilidad celular cerca al 20%, siendo este el péptido con mayor efecto citotóxico.

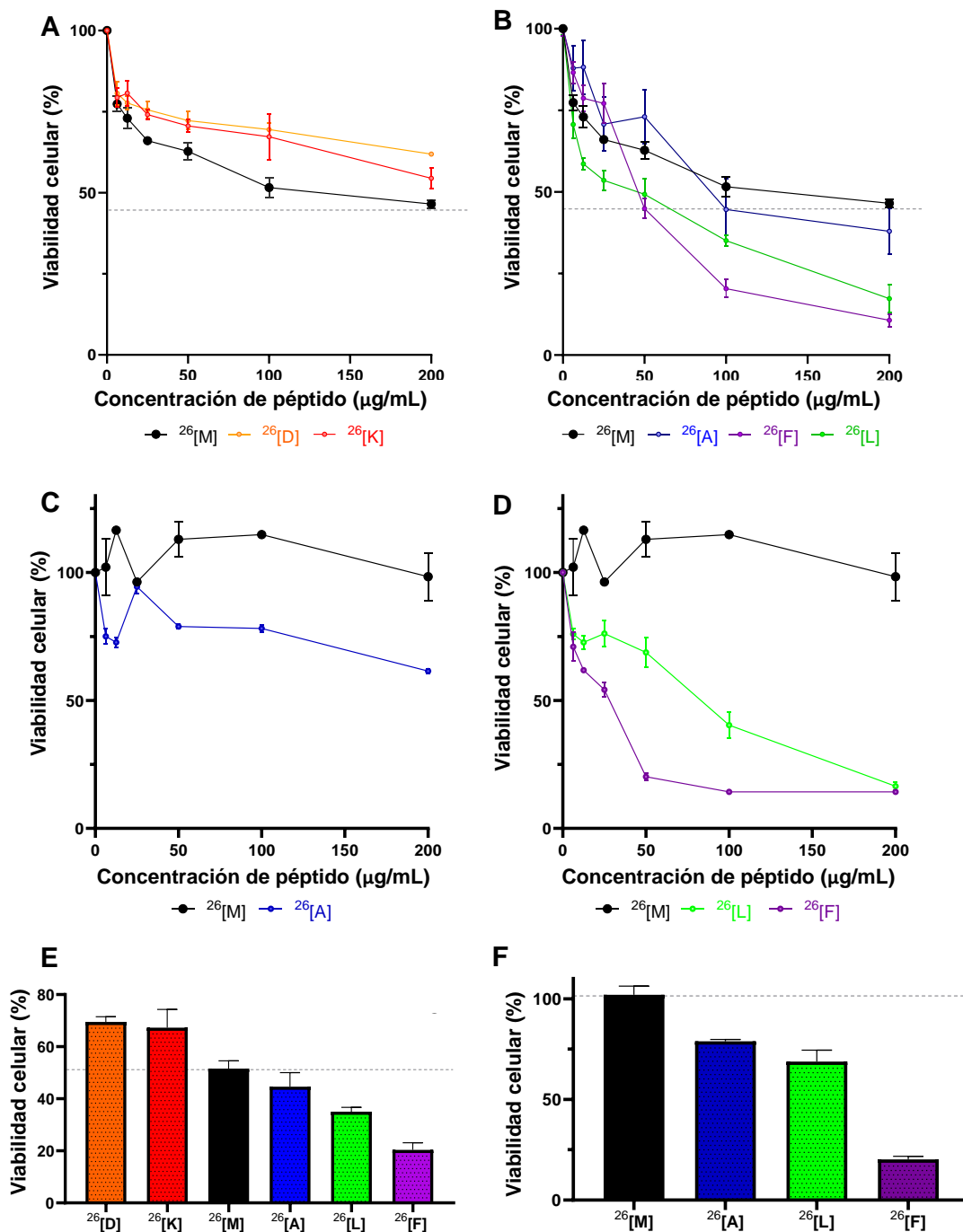


Figura 9. Efecto citotóxico de $^{26}[M]$: (RRWQWRM~~K~~KLG)₂-K-Ahx y sus análogos contra las líneas celulares HTB-132 (A,B) y MCF-7 (C,D). Las células de cáncer de mama se trataron con el péptido durante 24 h, 37 °C. Efecto citotóxico de los péptidos a 100 µg/mL frente a células HTB-132 (E) y 50 µg/mL frente a células MCF-7 (F). Los datos en A–B representan la media ± SE (tres experimentos independientes n=3). Los datos en C–D representan la media ± SE (tres experimentos independientes con n=4). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el efecto citotóxico exhibido por los péptidos diméricos modificados y el péptido sin modificar. (Se utilizó la prueba de comparaciones múltiples Anova de Sidak, $P \leq 0,05$).

Teniendo en cuenta que los péptidos que presentaron mayor citotoxicidad en la línea celular HTB-132 fueron ²⁶[A], ²⁶[L] y ²⁶[F], estos fueron evaluados en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Esta línea celular es derivada de un adenocarcinoma ductal receptivo a hormonas tipo luminal A, el cual es uno de los más diagnosticados a nivel mundial y de los más empleados en estudios *in vitro*⁶⁰. Los resultados de viabilidad celular para MCF-7 se ilustran en la figura 9C-D. Como se puede apreciar, el péptido ²⁶[M] no generó efecto citotóxico contra MCF-7, ya que la viabilidad celular fue cercana al 100%, a todas las concentraciones evaluadas. Este resultado es consistente con otros estudios, donde se ha encontrado que MCF-7 es menos susceptible a péptidos derivados de LfcinB y medicamentos como doxorrubicina⁶¹. En cuanto a sus análogos, el péptido ²⁶[A] presentó efecto citotóxico contra MCF-7 con valores de viabilidad celular mayores a 50% en un rango de 0 a 200 µg/mL. Al igual que en HTB-132, los péptidos ²⁶[L] y ²⁶[F] fueron los más promisorios en MCF-7, encontrando para ambos un potente efecto citotóxico dependiente de la concentración, obteniendo una viabilidad celular a 200 µg/mL (~60 µM) de 11 y 17% respectivamente. Al comparar la viabilidad celular de las células MCF-7 tratadas con los péptidos a una concentración de 50 µg/mL (Figura 9F), se evidencia que el péptido más citotóxico fue ²⁶[F], ya que a esta concentración se observa una viabilidad celular cercana al 20%, mientras que para todos los demás está por encima del 60%.

Los resultados obtenidos para los ensayos MTT de los péptidos con las líneas celulares de cáncer de mama HTB-132 y MCF-7 muestran una tendencia clara: El aumento de la hidrofobicidad en la posición 26 del dímero está directamente asociado con su efecto citotóxico. Esto podría estar relacionado con la manera en que el péptido dimérico interactúa con la membrana celular cancerosa. Varias investigaciones sugieren que el tipo de muerte celular generado por los péptidos está relacionado con una primera interacción electrostática entre la cara polar del péptido y las moléculas de carga negativa; como fosfatidilserina, sulfato de heparano y o-glicosilaciones, que están comúnmente sobre expresadas en las células transformadas. Posteriormente, se genera una disrupción en la bicapa lipídica debido a interacciones de tipo lipofílico con la cara hidrofóbica del péptido que posibilitan la disrupción de la membrana y/o internalización celular⁴⁴. En este sentido, propiedades fisicoquímicas como el área superficial polar, relacionada con atracciones físicas de superficie a través de potencial electrostático⁶²; y la lipofilicidad, relacionada con la disrupción de la membrana, juegan un rol crítico en el efecto citotóxico de los péptidos contra las células neoplásicas⁶³.

Teniendo esto en mente, mediante el uso del software de predicción ADMETLab 2.0; para los seis péptidos diméricos obtenidos, se determinó el valor teórico de los parámetros fisicoquímicos LogP, que es el logaritmo del coeficiente de partición n-octanol/agua y está relacionado con la lipofilicidad de la secuencia y el área superficial polar topológica (TPSA), relacionada con las posibles interacciones electrostáticas del péptido con las moléculas cargadas negativamente de la superficie celular cancerosa (Tabla 5).

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas calculadas con el software ADMETlab 2.0. LogP: Log (n-octanol/agua), TPSA: Área superficial polar topológica.

Grupo	Secuencia	LogP*	TPSA (Å ²)
1	²⁶ [M]	0,330	1394
	²⁶ [K]	-1,255	1446
	²⁶ [D]	-1,802	1469
	²⁶ [A]	-1,264	1394
	²⁶ [L]	1,484	1394
	²⁶ [F]	1,671	1394
2	²⁶ [Dip]	3,273	1394
	²⁶ [Bpa]	2,854	1428
	²⁶ [1-Nal]	3,213	1378
	²⁶ [hF]	2,357	1350
	²⁶ [2-Abz]	1,040	1394
	²⁶ [4-Abz]	0,672	1394

Como se puede apreciar en la tabla, la modificación en la posición 26 no afecta los valores de TPSA para la mayoría de los péptidos, manteniéndose constante en 1394 Å², a excepción de los péptidos ²⁶[K] y ²⁶[D] que aumentan este valor a 1446 y 1469 Å², respectivamente, lo que era de esperarse al ser aminoácidos polares. Sin embargo, el valor de logP, asociado con la lipofilicidad, cambia considerablemente para cada modificación puntual. Los péptidos con menores valores fueron ²⁶[D], ²⁶[K] y ²⁶[A] con valores de -1,802, -1,255 y -1,264, respectivamente; que fueron los péptidos con los menores efectos citotóxicos. Por otro lado, los péptidos con mayor efecto citotóxico ²⁶[L] y ²⁶[F] presentaron un incremento significativo de LogP, con valores de 1,484 y 1,671, los cuales están muy

por encima del péptido original (0,330). Estos resultados sugieren que posiblemente el aumento en el efecto citotóxico para los péptidos ²⁶[L] y ²⁶[F] podría estar asociado a la capacidad de estos de interactuar con bicapa lipídica de la membrana ya sea causando su permeación o disrupción.

En conclusión, el dímero ²⁶[F], en el cual la posición 26 fue reemplazada por una fenilalanina, presentó el mayor efecto citotóxico *in vitro* contra las dos líneas celulares derivadas de cáncer de mama evaluadas (HTB-132 y MCF-7). Nuestros resultados sugieren que el incremento en la hidrofobicidad de la cadena lateral en el aminoácido de la posición 26 del dímero está relacionado con un aumento en la citotoxicidad de la molécula contra las líneas derivadas de cáncer de mama. Dentro de este contexto, se decidió explorar el uso de aminoácidos no naturales para aumentar la hidrofobicidad en la posición 26 (Figura 10). De manera similar a la fenilalanina, todos los aminoácidos no naturales seleccionados presentan un anillo bencénico. Los amino ácidos Dip, Bpa y 1-Nal poseen un grupo fenilo extra y hF presenta un carbono adicional, lo cual les confiere un aumento en su hidrofobicidad con respecto a la fenilalanina, lo cual se evidencia en el incremento de los valores de logP a 3,273, 2,854, 3,213 y 2,357 respectivamente (ver tabla 5), en comparación con el péptido más lipofílico del grupo 1 (²⁶[F], logP: 1,671). Los aminoácidos 2-Abz y 4-Abz también poseen un anillo bencénico en su estructura, pero este se encuentra localizado dentro del esqueleto peptídico. El resumen de la caracterización química de este nuevo grupo de péptidos se encuentra en la Tabla 4 (Grupo 2).

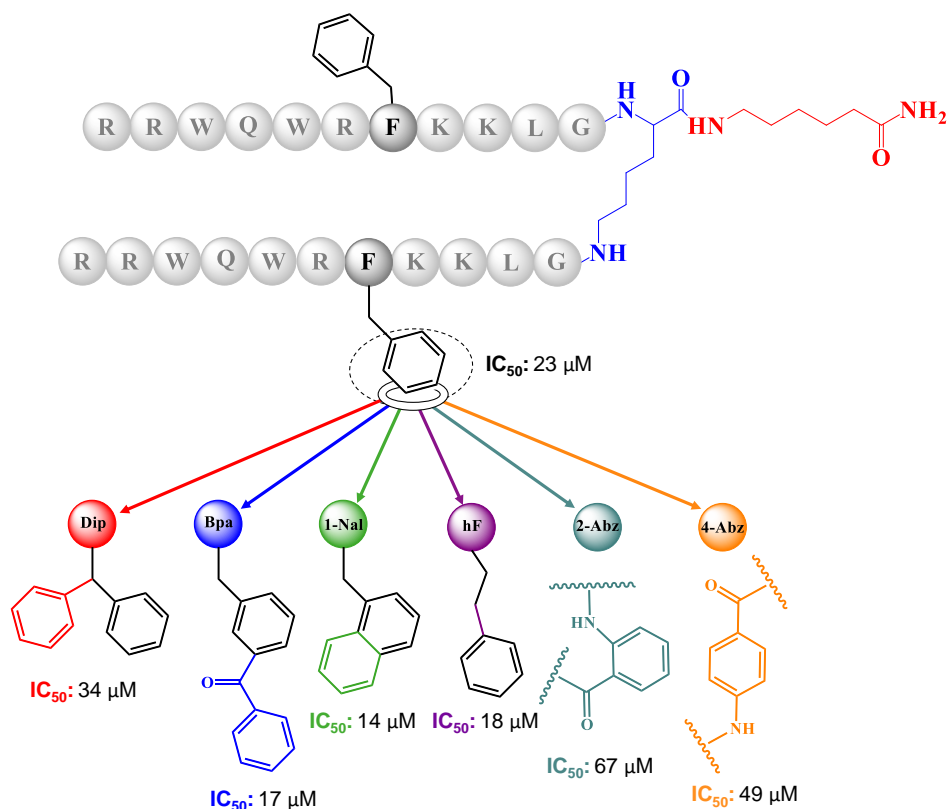


Figura 10. Diseño sintético de seis nuevos péptidos análogos a la secuencia ^{26}F : (RRWQWR ^{26}F KKLG) $_2$ -K-Ahx. Rojo: difenilalanina (Dip), azul: 4-benzoilfenilalanina (Bpa), verde: 3-(1-naftil)alanina (1-Nal), morado: homofenilalanina (hF), ciano: ácido (2-amino) benzoico (2-Abz) y naranja: ácido (4-amino) benzoico (4-Abz).

Mediante ensayos de MTT se evaluó el efecto citotóxico de los péptidos diméricos del grupo 2, contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7; la cual se seleccionó porque mostró una mayor resistencia al efecto de los péptidos diméricos del grupo 1. En la Figura 11 se presentan los resultados obtenidos para los péptidos del grupo 2, y para el péptido ^{26}F . Como se puede observar, los seis péptidos ejercieron un efecto citotóxico rápido y dependiente de la concentración. Los péptidos $^{26}\text{[Dip]}$, $^{26}\text{[4-Abz]}$ y $^{26}\text{[2-Abz]}$ exhibieron menor efecto citotóxico que el péptido $^{26}\text{[F]}$ (IC_{50} : 23 μM) con valores de IC_{50} de 34, 49 y 67 μM respectivamente (ver Tabla 4); mientras que los péptidos $^{26}\text{[Bpa]}$, $^{26}\text{[1-Nal]}$ y $^{26}\text{[hF]}$ mostraron un efecto citotóxico potenciado con respecto al péptido $^{26}\text{[F]}$, con IC_{50} de 17, 14 y 18 μM , respectivamente (ver Tabla 4). Cabe mencionar que los péptidos $^{26}\text{[1-Nal]}$ y $^{26}\text{[hF]}$ presentaron purezas altas (>90%), mientras que el péptido $^{26}\text{[Bpa]}$ presentó una pureza del 76% posiblemente atribuido a dificultades en el acople del aminoácido Bpa. Es de resaltar que los tres péptidos tuvieron un valor de IC_{50} menor que el péptido $^{26}\text{[F]}$, lo que

fortalece la hipótesis de la importancia en la hidrofobicidad de la posición 26 para la actividad anticancerosa contra MCF-7.

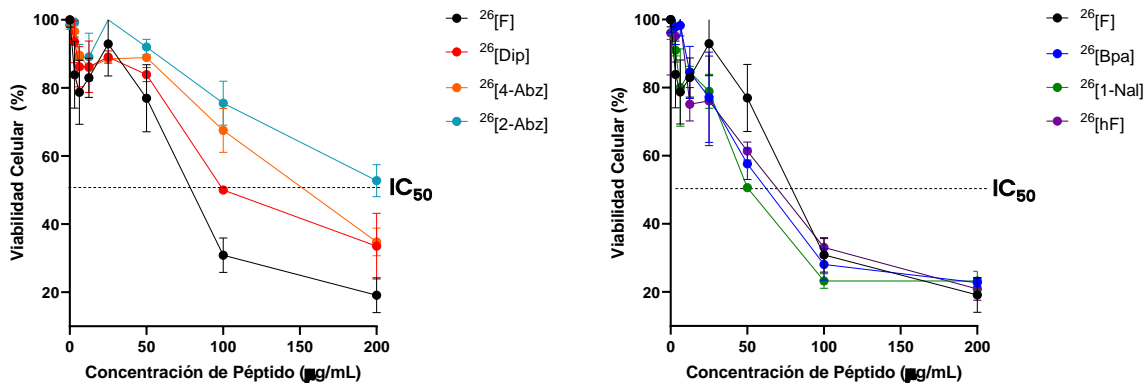


Figura 11. Efecto citotóxico de péptidos diméricos contra MCF-7. (Izquierda) Análogos con menor actividad que el péptido $^{26}[F]$: $^{26}[Dip]$ en rojo, $^{26}[4-Abz]$ en naranja, $^{26}[2-Abz]$ en ciano. (Derecha) Análogos con mayor actividad que el péptido $^{26}[F]$: $^{26}[Bpa]$ en azul, $^{26}[1-Nal]$ en verde, y $^{26}[hF]$ en morado. Los datos representan el promedio \pm SE. Se realizaron tres experimentos independientes con $n=4$ cada uno. (Se empleó el test ANOVA, Sidak's de comparaciones múltiples, $p \leq 0.05$).

Conclusiones del capítulo 6.1: Se obtuvieron satisfactoriamente los péptidos diméricos $^{26}[M]$, y sus once análogos, en los que se modificó la posición 26 con aminoácidos naturales (grupo 1) y no naturales (grupo 2). A excepción de los péptidos $^{26}[2-Abz]$, $^{26}[4-Abz]$, $^{26}[Bpa]$ y $^{26}[Dip]$; que presentaron purezas bajas, los demás péptidos fueron viables sintéticamente, presentando purezas superiores al 90% y una relación m/z acorde a las especies esperadas.

La posición 26 del péptido dimérico $^{26}[M]$ juega un rol crítico en el efecto citotóxico que ejerce sobre las líneas celulares de cáncer de mama HTB-132 y MCF-7. Se encontró que incorporar aminoácidos con cadena lateral hidrofóbica en esta posición, potencia significativamente el efecto citotóxico, lo que podría atribuirse a un aumento en la anfipaticidad de la estructura que permitiría una mayor interacción con la bicapa lipídica; fenómeno que ha sido sugerido en estudios previos, que relacionan la anfipaticidad con la actividad antibacteriana y anticancerígena de los péptidos^{18,64}. El péptido dimérico más promisorio para el grupo 1, fue $^{26}[F]$: $(RRWQWREK KLG)_2-K-Ahx$ con valores de IC_{50} de 13 μM para HTB-132 y de 23 μM para MCF-7. Mientras que los dímeros más promisorios para el grupo 2, en los que se hicieron modificaciones con aminoácidos no naturales, fueron $^{26}[1-Nal]$: $(RRWQWR-1-Nal-K KLG)_2-K-Ahx$ y $^{26}[hF]$: $(RRWQWR-hF-K KLG)_2-K-Ahx$ presentando valores de 14 y 18 μM para la línea MCF-7, respectivamente. A partir de los

resultados obtenidos de este capítulo, se seleccionaron los péptidos $^{26}\text{[F]}$, $^{26}\text{[hF]}$ y $^{26}\text{[1-Nal]}$ para la siguiente etapa.

Con los resultados obtenidos en este capítulo se cumplen los objetivos específicos 1 y 2, y parcialmente el objetivo específico 3. La obtención y evaluación del efecto citotóxico *in vitro* de los péptidos del grupo 2 no están contemplados dentro de los objetivos específicos planteados, por lo que son considerados logros adicionales. Parte de los resultados reportados en este capítulo fueron publicados en la revista International Journal of Molecular Science y sometidos en la revista RSC Advances (Para mayor información, ver anexos A-1.5 y A-1.8)

6.2 Estudios de estabilidad enzimática

Una de las principales desventajas de los péptidos como agentes terapéuticos es su baja biodisponibilidad debido a su reducida estabilidad en condiciones fisiológicas. Esto se atribuye principalmente a que al ser moléculas proteicas estas pueden ser degradadas por diferentes proteasas presentes en los sistemas biológicos. Enzimas del sistema digestivo como la tripsina, quimiotripsina y pepsina generan cortes a la cadena en los aminoácidos cargados; Arg y Lys, para el caso de la tripsina, o aminoácidos hidrófobos como Trp y Phe, para el caso de la quimiotripsina y pepsina; lo cual imposibilita que la molécula llegue intacta a su diana celular y por ende, pierda su efecto⁶⁵. Muchas investigaciones han centrado su atención en la búsqueda de alternativas para proteger las moléculas peptídicas de la degradación enzimática. Dentro de las estrategias más destacadas se encuentran: (i) La presentación del péptido en forma polivalente como dímeros o tetrámeros y (ii) la incorporación de aminoácidos no naturales. Ambas aproximaciones van enfocadas a dificultar la interacción de tipo conformacional enzima-sustrato, lo cual evita la acción de la enzima sobre el péptido⁶⁶. En este capítulo, se estudió el efecto de las enzimas digestivas tripsina y pepsina sobre los péptidos diméricos con mayor actividad anticancerosa: $^{26}\text{[F]}$, $^{26}\text{[hF]}$ y $^{26}\text{[1-Nal]}$, con el fin de determinar si la modificación puntual en la posición 26 tiene algún efecto sobre la estabilidad enzimática de estas moléculas. Es importante destacar que estos tres péptidos fueron los más promisorios en los ensayos del efecto citotóxico *in vitro* contra líneas celulares de cáncer de mama y que la incorporación de aminoácidos no naturales como hF y 1-Nal podrían favorecer su estabilidad enzimática.

Los tres péptidos fueron incubados con las enzimas tripsina o pepsina; luego se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y se detuvo la actividad enzimática. Los péptidos antes y después del tratamiento enzimático fueron analizados por RP-HPLC y LC-HRMS (Figura 12). El péptido $^{26}\text{[F]}$ antes del tratamiento mostró un perfil cromatográfico con una única especie (t_R : 6,0 min y pureza 95%) y el espectro de masas evidenció señales correspondientes a las especies esperadas ($[\text{M}+\text{nH}]^{n+}$ n: 4-9, con masa experimental M_{exp} de 3341,8406 uma). Luego de 3 horas de tratamiento del péptido con pepsina; el perfil cromatográfico mostró la aparición de dos nuevas señales con t_R 5,4 y 6,1 min (Figura 12a). Por LC-MS se pudo determinar que la especie con t_R : 5,4 min con M_{exp} de 1132,5948 uma, la cual corresponde al péptido RRWQWRF, mientras que la otra especie formada (t_R : 6,1 min) tenía una M_{exp} de 2265,3744 uma, correspondiente al fragmento complementario RRWQWRFKKLK-K(GLKK)-Ahx.

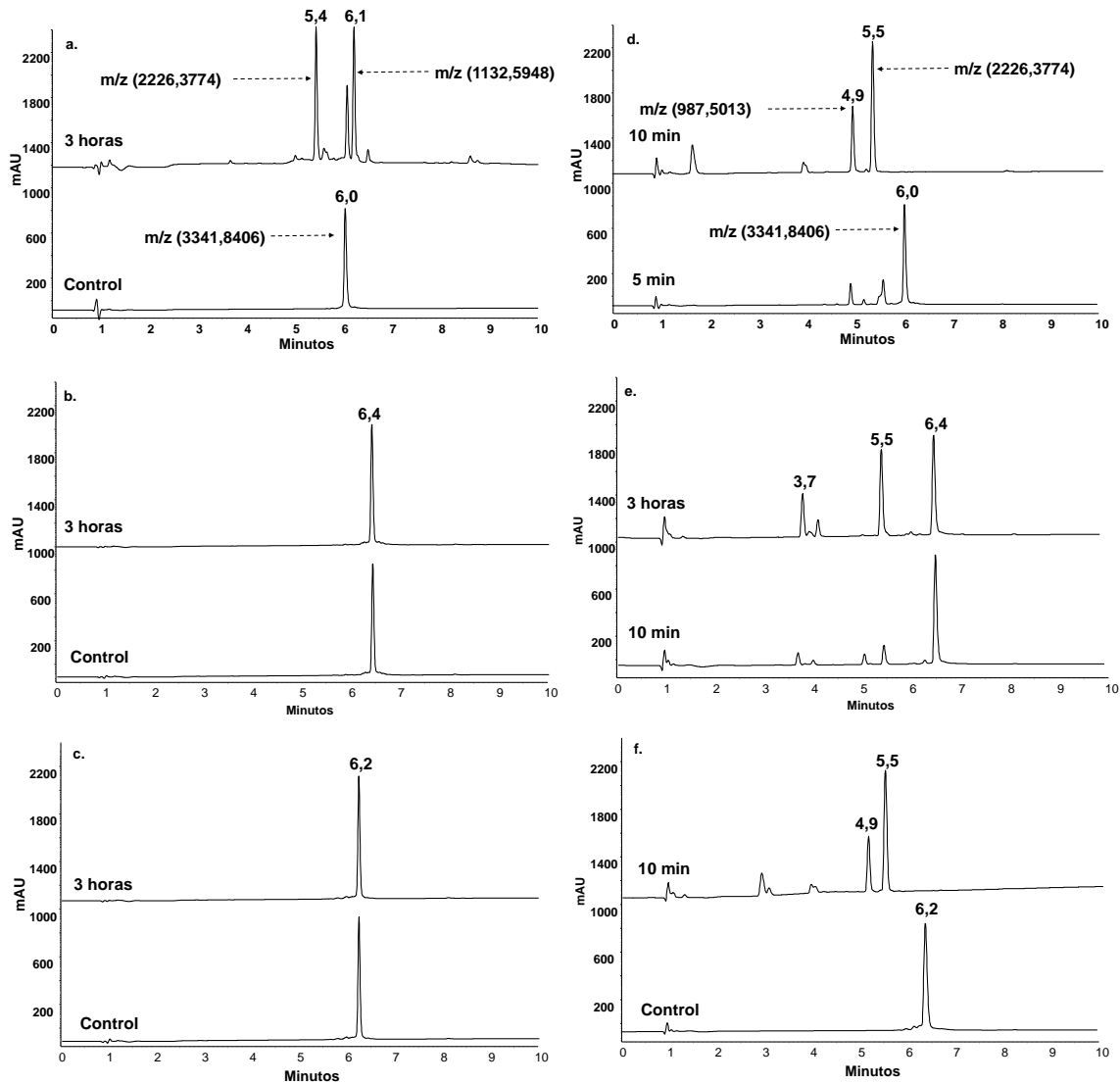


Figura 12. Digestión con pepsina y tripsina de los péptidos diméricos. Izquierda: Tratamiento de a. 26 [F], b. 26 [1-Nal], y c. 26 [hF] con pepsina. Derecha: Tratamiento de d. 26 [F], e. 26 [1-Nal] y f. 26 [hF] con tripsina.

Estos resultados sugieren que el péptido dimérico 26 [F] se fragmentó en dos partes y el clivaje ocurrió únicamente en una de las ramas del dímero; entre los residuos 26 F y 27 K. Estos resultados fueron sorprendentes, ya que se esperaba la generación de múltiples fragmentos, teniendo en cuenta que la pepsina es una proteasa digestiva que corta cadenas proteicas por el enlace peptídico de aminoácidos hidrofóbicos como Trp, Phe o Tyr, los cuales se encuentran dentro de la secuencia: en el dímero existen seis posibles sitios de corte (4 Trp y 2 Phe) y la enzima únicamente reconoció uno. Esto sugiere que la

presentación dimérica de esta secuencia podría estar generando protección parcial a la degradación por pepsina.

Para el caso de la tripsina, en la secuencia dimérica existen once posibles sitios de corte (6 Arg y 5 Lys) por lo cual se esperaba una degradación enzimática bastante significativa. Cuando el péptido $^{26}\text{[F]}$ fue tratado con tripsina por 5 minutos se observó la aparición de dos fragmentos. El primero corresponde al fragmento RRWQWR (t_R : 4,9 min, M_{exp} : 987,5013 uma) y el segundo corresponde al fragmento RRWQWRFKKG-K(FGLKK)-Ahx (t_R : 5,5 min, M_{exp} : 2226,3774 uma) (Figura 12D). Los resultados muestran que, a los 5 minutos de tratamiento, la tripsina reconoce el primer sitio de corte y genera la hidrólisis en el enlace entre los residuos ^{25}R y ^{26}F de una de las cadenas del dímero. A los 10 minutos, el pico inicial de t_R 6,0 min, correspondiente al péptido intacto, ha desaparecido completamente, y a las 3 horas de tratamiento con la enzima, todas las señales del perfil cromatográfico desaparecen (datos no mostrados). Esto indica que, tal y como se esperaba, el péptido es más susceptible a la degradación por tripsina que a la degradación por pepsina, y que los aminoácidos centrales de la secuencia son los más propensos a la degradación.

Con respecto a los péptidos $^{26}\text{[hF]}$ y $^{26}\text{[1-Nal]}$, en los cuales la posición 26 fue modificada con aminoácidos no naturales, se encontró un perfil cromatográfico antes del tratamiento enzimático con una única especie mayoritaria de t_R 6,2 y 6,4 min, respectivamente y una pureza superior al 95%. Cuando ambos péptidos fueron sometidos a tratamiento con pepsina por 3 horas, se puede observar que el perfil cromatográfico permanece inalterado, lo que indica que esta enzima no genera degradación proteolítica para ninguno de estos dos péptidos (Figura 12b-c). Estos resultados tienen bastante concordancia con los resultados obtenidos para el péptido $^{26}\text{[F]}$ ya que se observó que la pepsina únicamente reconocía como sitio de corte el aminoácido central Phe; al cambiar este aminoácido por uno no natural, posiblemente se pierde el reconocimiento conformacional enzima-sustrato del único sitio por el que la enzima puede cortar y por esta razón no se observó la degradación. En conclusión, los péptidos $^{26}\text{[1-Nal]}$ o $^{26}\text{[hF]}$ fueron resistentes a la pepsina, sugiriendo que la incorporación de los aminoácidos 1-Nal, y hF en la posición 26 de la secuencia incrementa la resistencia a la proteólisis causada por esta enzima.

En cuanto a la tripsina, tratar el péptido $^{26}\text{[hF]}$ con esta enzima durante 10 minutos generó la aparición de dos nuevas especies: RRWQWR (t_R : 4,9 min) y RRWQW-hF-KKLG-K(FGLKK)-Ahx (t_R : 5,5 min) y la especie correspondiente al péptido $^{26}\text{[hF]}$ intacto (t_R 6,2 min) desapareció por completo (Fig 12f). Estos resultados sugieren que la tripsina corta el dímero por una de sus cadenas entre los residuos ^{25}R y ^{26}hF , de manera similar a como lo hace con el dímero $^{26}\text{[F]}$. Se observó que el péptido $^{26}\text{[hF]}$ es susceptible a la degradación enzimática causada por esta enzima. Por el contrario, el péptido $^{26}\text{[1-Nal]}$ tratado con tripsina por 10 minutos mostró un menor grado de degradación, conservando como especie mayoritaria el dímero intacto (t_R : 6,4 min). Cuando este péptido fue tratado con tripsina por 3 horas, el perfil cromatográfico mostró dos nuevas especies con t_R : 3,7 y 5,4 min; sin embargo, la señal del péptido $^{26}\text{[1-Nal]}$ (t_R : 6,4 min) aún se observó (Figura 12e). Estos resultados muestran que la modificación de la posición 26 con 1-Nal aumenta la resistencia del dímero a la degradación por tripsina. Esto podría ser atribuido a la voluminosidad de la cadena lateral de 1-Nal, que por impedimento estérico podría estar dificultando que la enzima reconozca los residuos de Arg y Lys presentes en el dímero.

Conclusiones del capítulo 6.2: Los péptidos diméricos tuvieron mayor susceptibilidad a la degradación por tripsina que por pepsina. El péptido $^{26}\text{[F]}$ presentó susceptibilidad a la degradación causada por ambas enzimas, evidenciando un corte por la posición 26 para el caso de la pepsina y una degradación total para el caso de la tripsina. La incorporación del aminoácido no natural hF en la posición 26 aumentó la resistencia a la degradación causada por pepsina, pero no para la degradación causada por tripsina; mientras que la incorporación de 1-Nal en la posición 26, aumentó la resistencia a la degradación causada por ambas enzimas, siendo esta modificación la más promisoría en los ensayos de estabilidad enzimática.

Los estudios de degradación no estaban contemplados dentro de los objetivos específicos de esta tesis doctoral por lo que estos resultados son un logro adicional. Parte de los resultados obtenidos en este capítulo fueron sometidos en la revista RSC Advances (Para mayor información, ver anexo A-1.8).

6.3 Estudios de selectividad y toxicidad

Una de las grandes ventajas de los péptidos como agentes terapéuticos es que ejercen un efecto selectivo contra las células cancerosas; es decir, las moléculas peptídicas suelen afectar en mayor medida a las células cancerosas que a las células normales. Este fenómeno ha sido atribuido principalmente a su mecanismo de acción, que involucra en primera medida un acercamiento a la célula a través de interacciones electrostáticas entre las cadenas laterales cargadas positivamente en el péptido y moléculas con carga negativa presentes en la superficie celular, como fosfatidilserina, ácido siálico y o-glicosilaciones, entre otros⁶⁷. Varios estudios sugieren que una vez se da esta interacción electrostática entre el péptido y la célula; el siguiente paso consiste en una interacción entre la cara hidrofóbica del péptido y la bicapa lipídica de la célula; lo que se refleja en la formación de poros y/o la activación de diferentes rutas de muerte celular⁶⁸. Las células cancerosas se caracterizan por tener una carga neta negativa mayor que las células normales lo que favorece una mayor interacción electrostática con la cara polar del péptido. Adicionalmente, se ha reportado que las células de cáncer tienen por lo general una menor proporción de colesterol en su membrana, y un mayor número de microvellosidades, lo que facilita las interacciones lipofílicas entre la cara hidrofóbica del péptido y la bicapa lipídica, que posteriormente conducen a la muerte celular⁶⁹. Es por esta razón, que los péptidos catiónicos tienen un mayor efecto citotóxico sobre las células de cáncer en comparación con las células normales o no cancerosas.

Dentro de este contexto, una vez identificada una molécula promisoriosa que tiene efecto citotóxico contra células de cáncer; es importante evaluar su efecto contra líneas celulares normales, con el fin de establecer su selectividad, la cual puede ser estimada calculando el índice de selectividad $IS = (IC_{50} \text{ células no cancerosas}) / (IC_{50} \text{ células cancerosas})$. Un valor de IS por encima de 1 indica que la molécula es selectiva, mientras que un IS igual o menor a 1 indica que la molécula no logra discriminar entre las líneas celulares cancerosas y no cancerosas. Las células empleadas por excelencia en los estudios de selectividad *in vitro* son los eritrocitos (ensayo de hemólisis); ya que independientemente de la ruta de administración, para que un fármaco llegue a su sitio de acción, debe ser absorbido y entrar al torrente sanguíneo. Un compromiso de los eritrocitos deriva en liberación de hemoglobina; lo que puede provocar irritación vascular, anemia, falla renal e incluso la muerte. Varios estudios establecen que una formulación farmacéutica con menos de 10% de hemólisis es considerada segura; mientras que una con un porcentaje de hemólisis

mayor al 25% es considerada de alto riesgo⁷⁰. Por otra parte, se han empleado otras líneas celulares normales para evaluar selectividad, como células inmortalizadas derivadas de diferentes órganos del cuerpo humano o fibroblastos primarios, entre otros^{58,71-73}. En este capítulo se evaluó la selectividad *in vitro* de los péptidos promisorios ²⁶[F], ²⁶[hF]y ²⁶[1-Nal] contra las líneas celulares HEK-293, fibroblastos primarios humanos y eritrocitos humanos.

Los resultados de selectividad *in vitro* se presentan en la Figura 13. Como se puede observar, los tres péptidos evaluados no tienen efecto citotóxico significativo en los eritrocitos; ya que ninguno de ellos presentó un porcentaje de hemólisis mayor al 10% en todo el rango de concentración evaluada, mientras que para la línea celular de cáncer de mama MCF-7 se observa un drástico efecto citotóxico en el mismo rango de concentración, llegando a valores de viabilidad celular cercanas al 20% en todos los casos. Este es un resultado bastante interesante, ya que sugiere que los tres péptidos diméricos son selectivos por las células cancerosas y pueden ser considerados promisorios en una ruta de administración sistémica.

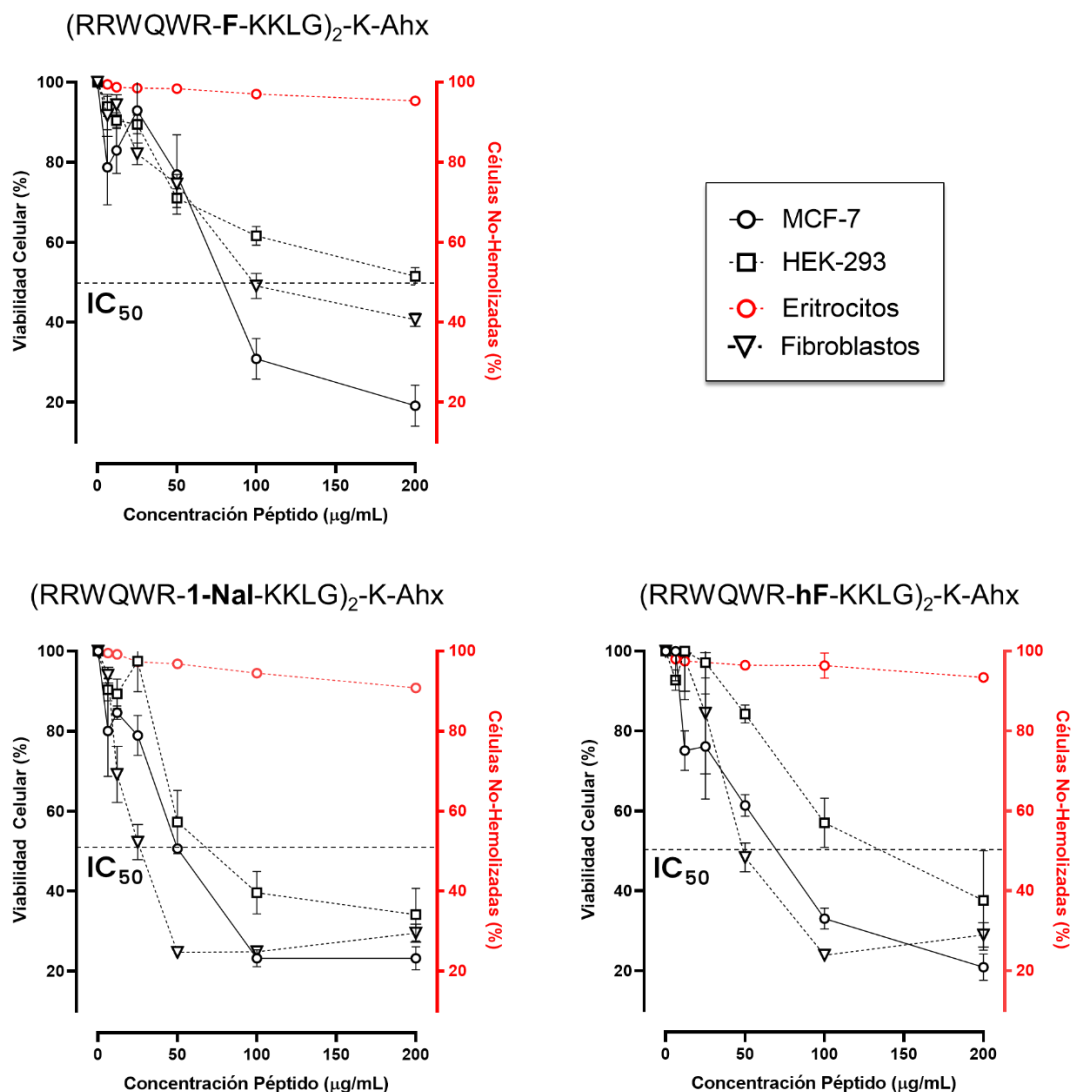


Figura 13. Ensayos de selectividad de péptidos diméricos. MCF-7 (Línea sólida negra —○—); HEK-293 (Línea sólida punteada —□—); fibroblastos (Línea sólida punteada —▽—) y eritrocitos (Línea sólida roja —●—). Los datos representan el promedio \pm SE. Tres experimentos independientes con $n=4$ cada uno. (ANOVA, test Sidak's de comparaciones múltiples, $p \leq 0.05$).

Con respecto a las otras dos líneas celulares evaluadas (HEK-293 y fibroblastos), se observó en general una menor selectividad. Como se puede apreciar en la Tabla 6, el péptido $^{26}[F]$ fue el más selectivo de los tres, ya que presentó para las tres líneas celulares IS superiores a 1,0. Seguido del péptido $^{26}[hF]$ que presentó un IS de 2,2 para HEK-293 pero no fue selectivo frente a fibroblastos con un IS de 0,9. Y finalmente el péptido con menor selectividad fue $^{26}[1-Nal]$ encontrando los menores valores de IS. Cabe destacar que los péptidos con modificaciones no naturales obtuvieron valores de IS incluso menores

a 1,0 para los fibroblastos, lo que indica que estos péptidos afectan en mayor medida a esta línea celular no cancerosa con respecto a la línea de cáncer. Sin embargo, los resultados en eritrocitos hacen que, pese a la baja selectividad en fibroblastos, los tres péptidos evaluados sean prometedores.

Tabla 6. Índice de selectividad de péptidos diméricos frente a fibroblastos, HEK-293 y eritrocitos en comparación con la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

Péptido	Índice de Selectividad (IC ₅₀ célula no cancerosa /IC ₅₀ MCF-7)		
	Fibroblastos	HEK-293	Eritrocitos
²⁶ [F]: (RRWQWRFKKLG) ₂ -K	1,5	2,6	>2,5
²⁶ [1-Nal]: (RRWQWR-1-Nal-KKLG) ₂ -K	0,6	1,8	>4,1
²⁶ [hF]: (RRWQWR-hF-KKLG) ₂ -K	0,9	2,2	>3,3

Teniendo en cuenta los promisorios resultados de selectividad *in vitro*, particularmente para los eritrocitos; se decidió pasar a hacer estudios preliminares de toxicidad en el modelo *in vivo*. El estudio con animales vertebrados, particularmente el modelo murino, ha sido desde principios del siglo XX el principal y más empleado en estudios preclínicos, dada la alta similitud entre la especie humana y los roedores en términos de metabolismo, temperatura corporal y respuesta inmune innata; lo que lo convierte en una herramienta invaluable para la predicción de información relacionada con mecanismos de acción, eficacia y toxicología. Sin embargo; una mayor conciencia ética, los elevados costos y el riguroso control global de ensayos en vertebrados, ha llevado a la comunidad científica a buscar nuevas alternativas, más económicas y con menor impacto ético, que permitan obtener la mayor información posible antes de pasar a un modelo en mamíferos; con el objetivo de que en este último se realicen la menor cantidad de experimentos posibles. Dentro de este contexto, han venido surgiendo de manera exponencial investigaciones en modelos invertebrados. Entre los más recientes se encuentran el modelo *Galleria mellonella*, el cual es un insecto de la familia *Galleriinae*. Recientemente, el estado larval de este insecto ha sido ampliamente empleado en estudios de patogénesis, mecanismos de virulencia, respuesta inmune y toxicología; ya que tiene tiempos de vida cortos, comparte varias estrategias con el sistema inmune innato de los mamíferos y crece a temperatura fisiológica (37°C) lo cual le confiere una gran correlación con el cuerpo humano. Además, ofrece grandes ventajas como estudios más rápidos, económicos y éticos⁷⁴.

Por lo descrito anteriormente, el modelo *Galleria mellonella* fue escogido en primaria instancia para evaluar de manera preliminar la toxicidad generada por $^{26}\text{[F]}$, $^{26}\text{[hF]}$ y $^{26}\text{[1-Nal]}$. Los péptidos fueron administrados a una concentración 2, 3 y 4 veces mayor a la máxima evaluada en el modelo *in vitro* (400, 600 y 800 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) y se monitoreó la supervivencia de las larvas durante diez días. Para todos los casos la supervivencia fue mayor al 50% por lo cual no se pudo determinar la dosis letal 50 (LD_{50}), indicando que los péptidos no son significativamente tóxicos en este modelo. Como ejemplo, en la Figura 14, se ilustran los resultados de supervivencia a la máxima concentración evaluada. Como se puede observar, el péptido más tóxico fue $^{26}\text{[F]}$ (55% de supervivencia), el cual había sido el más selectivo en los estudios *in vitro*. Para el caso de $^{26}\text{[F]}$ en el día 2 hubo una disminución de la supervivencia hasta un 70% y llegó al 60% al día 10; mientras que para los péptidos $^{26}\text{[hF]}$ y $^{26}\text{[1-Nal]}$ se observó un efecto mucho menor y se llegó a una supervivencia del 80% de las larvas para ambas moléculas al finalizar el ensayo.

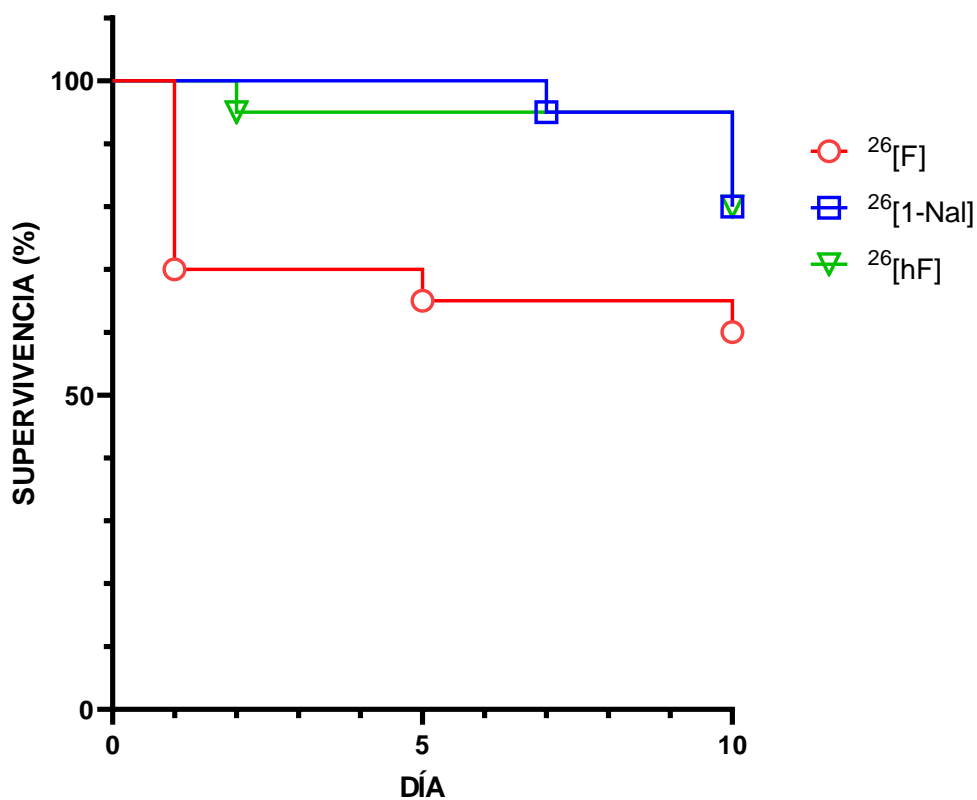


Figura 14. Gráfica de supervivencia de *Galleria Mellonella* tratada con los péptidos $^{26}\text{[F]}$ en rojo, $^{26}\text{[1-Nal]}$ en azul y $^{26}\text{[hF]}$ en verde, a una concentración de 800 $\mu\text{g/mL}$.

Luego se realizaron estudios preliminares de toxicidad en el modelo murino. Teniendo en cuenta las consideraciones éticas y económicas enmarcadas anteriormente para modelos vertebrados; se decidió continuar en esta etapa únicamente con dos péptidos: (i) el candidato más promisorio de las modificaciones con aminoácidos naturales $^{26}\text{[F]}$ y (ii) el candidato más promisorio de las modificaciones con aminoácidos no naturales $^{26}\text{[1-Nal]}$. Es importante destacar que este último es el que ejerce el efecto citotóxico más potente contra la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y además es el más resistente a la degradación por enzimas digestivas; sin embargo, también es el que mostró mayor toxicidad en fibroblastos y HEK-293.

Al no tener un punto de partida referente a las dosis empleadas en este tipo de péptidos diméricos en el modelo murino, se decidió realizar una primera exploración usando el test de Irwin. Este test es empleado para evaluar de manera cualitativa los efectos de la administración del péptido sobre funciones motoras, comportamiento, fisiología y seguridad farmacológica en roedores. Como una primera aproximación, algunos autores sugieren iniciar con una dosis entre 100-300 veces mayor que la dosis efectiva *in vitro*³², por lo que en este primer ensayo (experimento 1) se empleó una dosis de 70,0 mg de péptido/kg del roedor, lo que corresponde a una concentración aproximadamente 140 veces mayor que los valores de IC_{50} encontrados para MCF-7. Los resultados de supervivencia son resumidos en la Tabla 7.

Tabla 7. Experimentos preliminares de toxicidad en ratones machos y hembras para los péptidos $^{26}\text{[F]}$ y $^{26}\text{[1-Nal]}$. *ip: intraperitoneal, **sc: subcutánea.

Experimento 1 (Machos)				
Péptido	Supervivencia (%)		Número de Ratones	Dosis (mg/kg)
	ip*	sc**		
$^{26}\text{[F]}$: (RRWQWRFKKLG) ₂ -K	100	100	6	70
Control	100	100	6	0
$^{26}\text{[1-Nal]}$: (RRWQWR-1-Nal-KKLG) ₂ -K	33	100	6	70
Control	100	100	6	0
Experimento 2 (Hembras)				
Péptido	Supervivencia (%)		Número de Ratones	Dosis (mg/kg)
	ip			

$^{26}\text{[F]}$: (RRWQWRFKKLG) ₂ -K	0	4	140
Control	100	4	0
	100	3	70
$^{26}\text{[1-Nal]}$: (RRWQWR-1-Nal-KKLG) ₂ -K	100	3	35
	100	3	17,5
	100	3	8,8
Control	100	3	0

Al inocular los ratones con ambos péptidos vía subcutánea (sc) (Tabla 6. Experimento 1) se evidenciaron comportamientos similares. Transcurridos 30 minutos, los ratones mostraron una disminución en sus funciones motoras y manifestación de piloerección. Después de 24 horas, todos los ratones retornaron a su estado normal y la tasa de supervivencia fue del 100%, lo que sugiere que esta vía de administración es segura a las dosis evaluadas.

En el caso de los ratones administrados vía intraperitoneal (ip) (Tabla 6. Experimento 1) con ambos péptidos, los ratones mostraron disminución de sus funciones motoras después de los 30 minutos; y también presentaron contorciones abdominales, posiblemente atribuido a irritación localizada y enrojecimiento de cola y ojerías, lo que puede estar asociado a vasodilatación periférica. Después de 24 horas, los ratones tratados con $^{26}\text{[F]}$ recobraron por completo su estado basal y tuvieron una tasa de supervivencia de 100% después de 1 semana de observación. Por otra parte, los ratones inyectados con $^{26}\text{[1-Nal]}$ mostraron señales de enfermedad y 2 de 3 individuos fallecieron después de 8 horas de administración del péptido. El individuo remanente se recuperó y sobrevivió después de una semana de observación. Estos resultados sugieren que la administración ip muestra mayor grado de toxicidad con respecto a sc y adicionalmente el péptido $^{26}\text{[1-Nal]}$ es más tóxico que $^{26}\text{[F]}$ vía ip, ya que presentaron una tasa de supervivencia de 33% y 100%, respectivamente.

A partir de los resultados obtenidos en el experimento 1, se planteó un segundo experimento en el cual el péptido $^{26}\text{[F]}$ fue administrado al doble de la concentración (140 mg/kg) con el fin de evaluar si se puede aumentar la dosis manteniendo una baja toxicidad. Con respecto al péptido $^{26}\text{[1-Nal]}$ como ya se había visto mortalidad a la dosis evaluada en el experimento 1, se decidió no aumentarla más y realizar una curva dosis respuesta

haciendo diluciones en base 2 desde la concentración de 70 mg/kg (Tabla 6. Experimento 2). Adicionalmente, este segundo experimento fue realizado en hembras y únicamente por la vía ip ya que sólo por esta vía se evidenciaron efectos adversos significativos. Después de 30 minutos de inoculación del péptido 26 [F] (140 mg/kg) se observó una disminución de las funciones motoras, contracciones abdominales, irrigación excesiva, ataxia y pérdida de coordinación. Después de 4 horas de tratamiento todos los individuos fallecieron, lo que indica que la LD₅₀ de este péptido se encuentra entre 70-140 mg/kg. No se realizaron análisis adicionales para determinar el valor exacto de LD₅₀ por consideraciones éticas. En el caso del péptido 26 [1-Nal] se encontró un resultado bastante interesante, la concentración más alta evaluada (70 mg/kg) que había mostrado un porcentaje de supervivencia del 33% en individuos machos, mostró una tasa de supervivencia del 100% en hembras después de una semana, además de efectos adversos similares, pero mucho menos intensos. Todas las demás diluciones evaluadas también presentaron una tasa de supervivencia del 100% como era de esperarse. Este es un resultado muy particular, ya que sugiere que el péptido tiene un efecto menor en hembras, lo cual es muy interesante en el ámbito de un tratamiento para el cáncer de mama, que afecta en su gran mayoría a mujeres. En estudios recientes se ha demostrado que el péptido LfcinB presenta un efecto antitumoral en ratones xenoinserados NOS-SCI-Gamma; en los cuales se indujo la generación de tumores con las líneas celulares de cáncer de mama HTB-132 y HTB-26, a una dosis de 5 mg/kg⁷⁵. Teniendo en cuenta que los dímeros presentaron mayor efecto citotóxico *in vitro* contra las líneas de cáncer de mama evaluadas que el péptido LfcinB; es posible que para los ensayos de eficacia se necesiten dosis iguales o menores a 5 mg/kg para obtener un efecto antitumoral; valor que está muy por debajo de las dosis tóxicas encontradas de manera preliminar en el modelo murino.

Finalmente, teniendo en cuenta los costos de producción y la disponibilidad, se escogió el péptido 26 [F] para evaluar la toxicidad en el modelo zebrafish. El uso de este modelo *in vivo* ha venido creciendo en las últimas décadas, ya que ofrece ventajas interesantes como bajos costos, manipulación sencilla, menos impacto ético dado que en la fase embrionaria, no hay desarrollo del sistema nervioso central, una alta correlación con modelos mamíferos como el murino y una piel translúcida que permite ver con claridad procesos de disminución, crecimiento y/o diseminación o metástasis de células cancerígenas^{76,77}. El ensayo se realizó en colaboración con la Universidad de los Andes siguiendo

rigurosamente los lineamientos éticos y experimentales establecidos por la OCDE. Los resultados del estudio de toxicidad se ilustran en la figura X. Se evaluaron concentraciones de péptido de entre 0,01 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se monitoreó la supervivencia de los embriones hasta 4 días post fecundación (dpf). Como control negativo se empleó solución salina normal 0,9% y como control positivo 4-nitroanilina. Como se puede apreciar, en el control negativo ningún individuo se ve afectado; mientras que en el control positivo hay una supervivencia cercana al 10% en 4 dpf, lo cual le da validez al ensayo. Con respecto a los resultados obtenidos con el péptido $^{26}\text{[F]}$, en concentraciones de 0,01 hasta 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se presenta un efecto leve y supervivencias mayores al 50% en todos los casos; posteriormente, a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se aprecia supervivencias cercanas al 50% en todos los días evaluados y finalmente, a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se aprecia una mortalidad del 100%; lo cual indica que el valor LD_{50} en el modelo zebrafish para el péptido $^{26}\text{[F]}$ es aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Realizando una comparación con tablas de clasificación establecidas por la OCDE, se encuentra que el péptido estaría categorizado como “ligeramente tóxico”, lo cual es un resultado bastante destacable ya que tiene una toxicidad mucho menor a medicamentos oncológicos aprobados para uso humano actualmente como la doxorubicina⁷⁸.

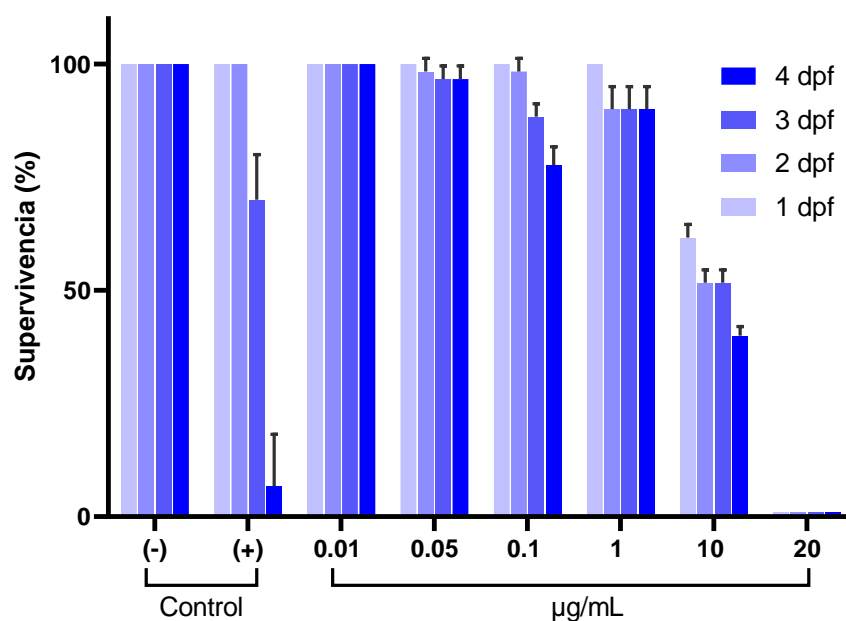


Figura 15. Estudio de toxicidad del péptido $^{26}\text{[F]}$ en el modelo zebrafish.

Conclusiones del capítulo 6.3: Estudios de selectividad *in vitro* demostraron que los dímeros 26 [F]-, 26 [hF] y 26 [1-Nal] son selectivos frente a eritrocitos humanos. El péptido con mayor selectividad *in vitro* fue 26 [F] con valores de IS superiores a 1,5 en todos los casos, mientras que el menos selectivo fue 26 [1-Nal]. El modelo *in vivo* con *G. Mellonella* evidenció que ninguno de los tres péptidos tiene una toxicidad mayor al 50% en un rango de concentraciones de 400-800 μ g/MI (aproximadamente 40-80 veces el valor Ic_{50} obtenido en los ensayos de citotoxicidad en las células MCF-7). El modelo murino mostró que los péptidos 26 [F] y 26 [1-Nal] son menos tóxicos por la vía subcutánea que por la vía intraperitoneal. 26 [F] tiene una LD_{50} entre 70-140 mg/kg vía ip y 26 [1-Nal] resultó ser más tóxico que 26 [F] con tasas de supervivencia de 33% y 100%, respectivamente, a una dosis de 70 mg/kg. El modelo zebrafish mostró un valor LD_{50} de 10 μ g/mL clasificado según la OCDE como ligeramente tóxico.

Los resultados de selectividad *in vitro* responden al objetivo específico 3 de esta tesis doctoral, y los ensayos en los modelos *in vivo* murino y *G. Mellonella* y zebrafish no están involucrados dentro de los objetivos por lo que son un logro adicional. Parte de los resultados de este capítulo fueron publicados en la revista Royal Society Open Science (Para mayor información, ver anexo A 1-8).

6.4 Estudio del tipo de muerte celular ejercido por péptidos diméricos sobre la línea celular de cáncer de Mama MCF-7

Estudios sobre el tipo de muerte celular (células eucariotas), han sugerido que la manera en que se genera la muerte celular puede estar relacionada con efectos colaterales. Por ejemplo, la necrosis está asociada a muerte celular desorganizada y accidental induciendo inflamación exacerbada, daño de tejidos aledaños, infecciones, entre otros. Por otro lado, la muerte celular mediada por apoptosis es un tipo de muerte celular programada altamente selectiva y organizada, por lo que genera menos efectos adversos⁷⁹. Adicionalmente, este tipo de muerte está relacionada con el equilibrio de la homeostasis celular. En la carcinogénesis suele afectar la muerte celular programada por lo que las células crecen y se multiplican descontroladamente. Varias investigaciones han mostrado que algunos péptidos tienen la capacidad de inducir apoptosis por diferentes mecanismos

y de manera selectiva en células de cáncer; por lo que son promisorios para el desarrollo de agentes terapéuticos^{73,80-82}.

Teniendo en cuenta los resultados previos, se escogieron los péptidos ²⁶[F]: (RRWQWRFKCLG)₂-K y ²⁶[1-Nal]: (RRWQWR-1-Nal-KKCLG)₂-K para el estudio preliminar del tipo de muerte celular que ejercen sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Inicialmente, se monitoreó la morfología celular después del tratamiento con ²⁶[F] y ²⁶[1-Nal] encontrando características similares en los cambios a nivel morfológico generado por ambos dímeros. En la Figura 15, a manera de ejemplo, se muestra el efecto sobre la morfología celular de MCF-7 causada por el péptido ²⁶[F], a diferentes horas de tratamiento. Las células sin tratar presentaron características morfológicas normales, con formas poligonales, aplanadas y elongadas, y la presencia de axones largos y definidos (Figura 15A). Después de 5 minutos de tratamiento con el péptido, la mayoría de las células mantienen su morfología; sin embargo, algunas de ellas empiezan a redondearse y encogerse, como se señala con las flechas en la Figura 15B. Después de 90 minutos, todas las células adquieren una forma redondeada y se evidencia un encogimiento, pasando de un tamaño promedio de 100,27 μm a 39,38 μm. Sin embargo, la morfología celular es definida y la integridad de la membrana aparentemente no se ve comprometida, lo que sugiere que el efecto citotóxico de este péptido puede involucrar procesos apoptóticos⁸³, y esta morfología se mantiene a las 4 horas de tratamiento (Figura 15C-D). Transcurridas 24 horas de tratamiento, se evidencia la aparición de pequeñas vacuolas (ver flechas rojas), presumiblemente asociado a eventos de apoptosis tardía (Figura 15E). Finalmente, se observa que el efecto del péptido sobre las células se mantiene hasta por 48 horas de tratamiento, ya que transcurrido este tiempo no se aprecia una recuperación de la morfología celular (Figura 15F).

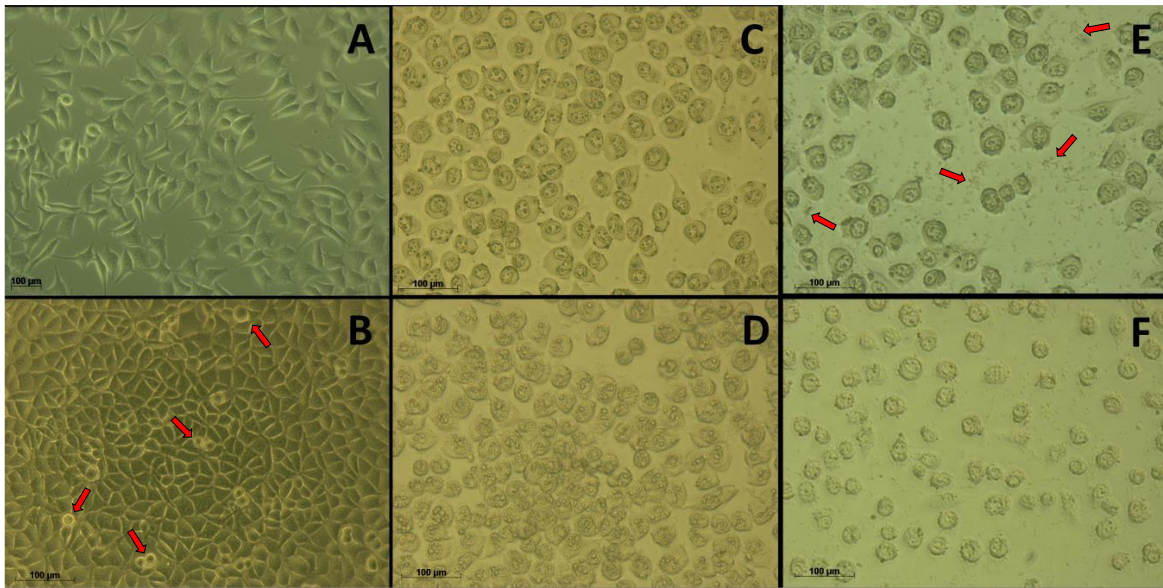


Figura 16. Micrografía de células MCF-7 tratadas con el péptido $^{26}[F]$ a $100 \mu\text{g/mL}$. Las células fueron cultivadas en ausencia (A) y presencia de péptido a (B) 5 min (Las flechas señalan células redondeadas), (C) 90 min, (D) 4 horas, (E) 24 horas (Las flechas señalan posible formación de vacuolas) y (F) 48 horas a 37°C . El tamaño celular fue determinado como el promedio de 100 medidas, usando una cámara AxioCam ICc1 (40x).

Para determinar el tipo de muerte celular asociada al efecto citotóxico generado por $^{26}[F]$ y $^{26}[1\text{-Nal}]$ en las células MCF-7, estas se incubaron con los péptidos a su concentración IC_{50} por 24 h, luego se tiñeron con los fluoróforos de anexina V y PI, y se analizaron por citometría de flujo (Figura 16A). Los resultados mostraron que el tratamiento con ambos péptidos desplazó la población celular principalmente a eventos de apoptosis. El péptido $^{26}[F]$ indujo un desplazamiento principalmente hacia apoptosis temprana (Q3: 75,3 %), mientras que $^{26}[1\text{-Nal}]$ indujo en mayor medida apoptosis tardía (Q2: 74,6%). Estos resultados son interesantes, ya que sugieren que el cambio puntual en la posición 26, de la Phe por 1-Nal en la secuencia dimérica podría modular el tipo de muerte celular generada en MCF-7, posiblemente acelerando el efecto citotóxico sobre las células de cáncer. El efecto de ambos péptidos contra MCF-7 generó mayor desplazamiento de la población celular hacia eventos apoptóticos, lo cual está de acuerdo con lo observado por microscopía (Figura 15): cambios en la morfología celular como encogimiento, la aparición de debris y una baja afectación de la integridad de la membrana citoplasmática.

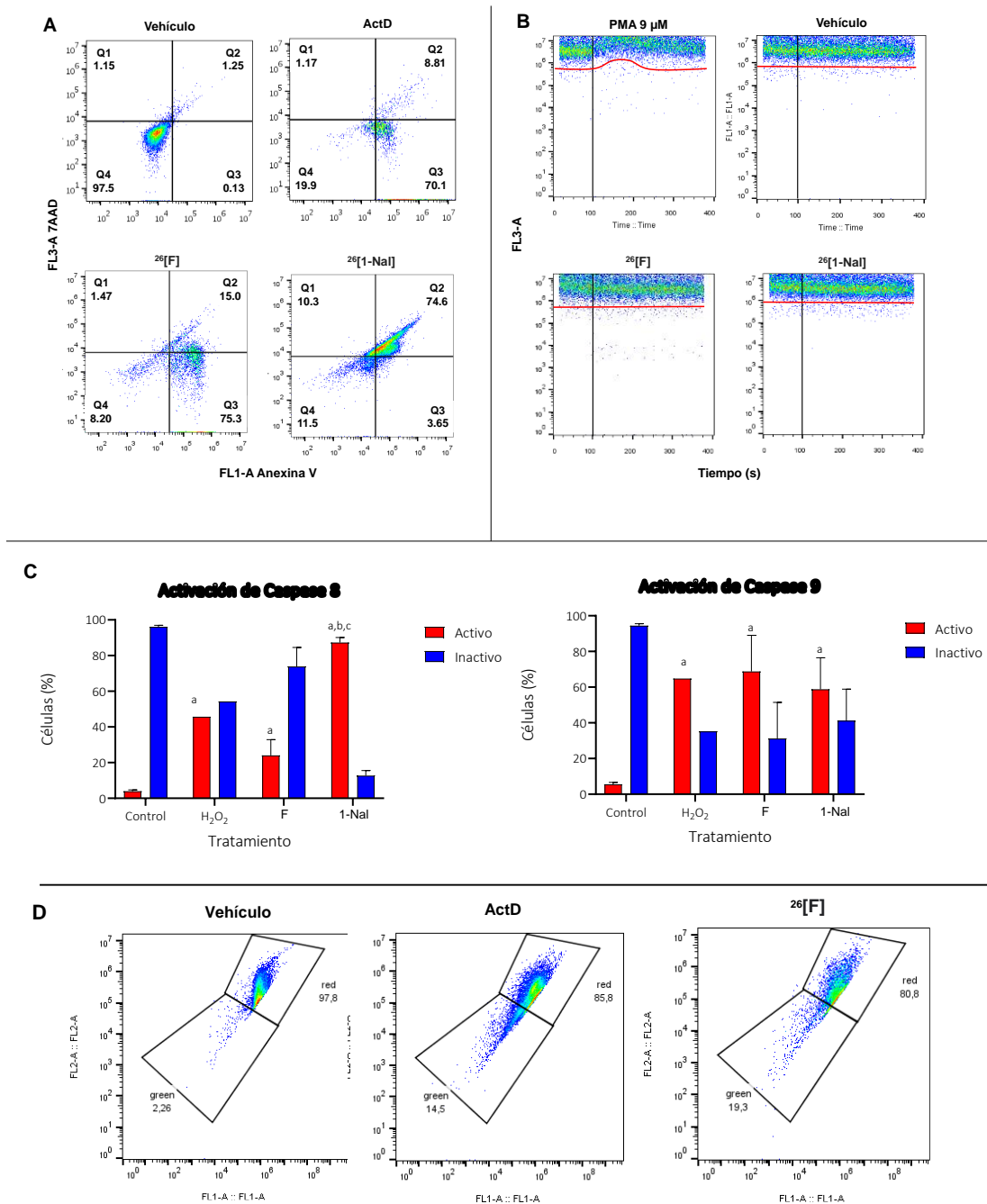


Figura 17. Ensayos de citometría de flujo en la línea celular MCF-7 tratadas con ²⁶[F] y ²⁶[1-Nal] en su concentración IC₅₀. **A.** Ensayo de Anexina V/ 7AAD. Control negativo: células sin tratar, control positivo: ActD 0,5 μ M. **B.** Ensayo de flujo de calcio citosólico extracelular. Control negativo: células sin tratar, control positivo: PMA 9 μ M. **C.** Ensayo de activación de caspasas 8 y 9. Control negativo: células sin tratar, control positivo: H₂O₂. **D.** Ensayo de potencial de membrana mitocondrial empleando fluoróforo JC-1 para el péptido ²⁶[F]. Control negativo: Células sin trata, control positivo: ActD 0,5 μ M. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las células sin tratamiento y las células tratadas con los péptidos. (Test Anova Sidak's de comparaciones múltiples). Los datos representan la medida \pm SE. Un ensayo independiente con n=3. Para todos los ensayos se empleó la concentración IC₅₀ de los péptidos determinada por ensayos de MTT.

Los péptidos también fueron analizados mediante ensayos de liberación de calcio intracelular (Figura 16B). Este es un ensayo cualitativo que se enfoca en la identificación de procesos de necrosis, ya que una liberación rápida de calcio del retículo endoplásmico hacia el citoplasma de la célula puede estar directamente relacionada con un compromiso significativo de las membranas internas y una desregulación de la homeóstasis iónica. Para este análisis se realizó el registro de la fluorescencia de la célula sin tratamiento durante 100 segundos con el fin de definir una línea base y posteriormente se adicionó el tratamiento y se monitoreó su comportamiento. Una perturbación en la línea base indica liberación de calcio extracelular y por ende necrosis, como en el caso del control positivo (PMA 9 μ M). Como se puede observar, no se evidenció un cambio en la fluorescencia al adicionar los dímeros a las células MCF-7 lo que sugiere que estos no causan procesos de necrosis de manera significativa. Este resultado está en concordancia con los estudios de apoptosis/necrosis y con las imágenes de morfología celular descritas anteriormente.

El bajo desplazamiento hacia eventos de necrosis, la morfología celular observada por microscopía y los resultados en los ensayos de liberación de calcio, sugieren que posiblemente el tipo de muerte celular que ejercen estos péptidos contra la línea celular MCF-7 no sea de tipo membranolítico; es decir, no hay una disrupción total o parcial de la bicapa lipídica mediante la formación de poros como se ha descrito para péptidos similares, ya que el desplazamiento celular hacia eventos de necrosis es bajo, no hay liberación de calcio intracelular y no se evidencia pérdida de la integridad de la membrana. Es por esto, que sugerimos que el tipo de muerte celular generada por estos péptidos está asociada a otro tipo de mecanismos como la formación de microporos transitorios y en consecuencia permitirían la internalización del dímero sin comprometer la integridad de la membrana. Una vez atravesada la membrana, el péptido puede inducir una muerte celular programada, ya sea mediante la disrupción de la membrana mitocondrial o mediante la fragmentación del ADN del núcleo; lo cual puede estimular diferentes cascadas de caspasas apoptóticas⁸⁴.

Para verificar esta hipótesis, se evaluaron por citometría las rutas específicas de apoptosis generada por los dímeros mediante la medición de caspasas 8 y 9 (Figura 16C) las cuales están relacionadas con las dos vías principales de activación de apoptosis mediada por caspasas. La caspasa 9 está relacionada con una apoptosis intrínseca, que puede ser generada por un estímulo interno como alto estrés oxidativo e hipoxia, liberación del

citocromo-C debido a la formación de poros en la mitocondria o daño en el ADN⁶³. Mientras que la caspasa 8 está relacionada con una apoptosis extrínseca, que involucra la estimulación de diferentes cascadas de señalización y receptores de muerte a nivel de membrana. Como se puede apreciar en la figura 16C, la muerte causada por ²⁶[F] induce principalmente la expresión de caspasa 9 (70%) lo cual podría estar asociado a una internalización del péptido y el posterior daño al ADN o a la membrana mitocondrial. Para el dímero ²⁶[F] fue posible realizar un ensayo adicional, que consiste en evaluar el potencial de membrana mitocondrial mediante el fluoróforo JC-1 (Figura 16D). Este es un fluoróforo catiónico que se acumula en la membrana mitocondrial cuando esta se encuentra sin afectaciones y conserva su potencial de membrana, y al estar acumulado dentro de la mitocondria forma conglomerados con fluorescencia de color rojo. Si la membrana mitocondrial fue afectada, pierde su potencial de membrana y el fluoróforo JC-1 no se acumula dentro de esta, por lo que adquiere una fluorescencia de color verde que obedece a la forma monomérica de JC-1. Como se puede observar en la figura 16D, como control negativo se emplearon células sin tratar con un desplazamiento a la fluorescencia verde de 2,26% y como control positivo se empleó ActD que generó un desplazamiento hacia la fluorescencia verde de 14,5%. Al hacer el ensayo con el dímero ²⁶[F] se evidencia un desplazamiento hacia la fluorescencia verde de 19,3% el cual es incluso mayor que el control positivo. Esto sugiere que posiblemente el dímero penetra la célula y que además genera poros en la membrana mitocondrial desencadenando la liberación del citocromo-C y la subsecuente activación de la ruta de apoptosis intrínseca.

Por otro lado, se encontró que ²⁶[1-Nal] induce la activación de ambas caspasas (caspasa 8: 90% y caspasa 9: 60%). Estos resultados sugieren que ²⁶[1-Nal] involucra dos rutas de activación de apoptosis en su efecto citotóxico contra MCF-7. Por un lado, tiene una elevada activación de caspasa 9 lo cual está indicando una posible internalización del péptido y generación de algún estímulo interno que induce la muerte celular programada, como ya se ha descrito anteriormente. Por otro lado, ²⁶[1-Nal] induce en un alto porcentaje la activación de caspasa 8, que está relacionada con la señalización de receptores de membrana que desencadenan la apoptosis extrínseca. Esto está en concordancia con investigaciones previas que muestran que la proteína completa LFB y el péptido LfcinB pueden activar varias vías de señalización al mismo tiempo, incluidas apoptosis por receptores de membrana FAS, señalización de p53 y arresto del ciclo celular en diferentes líneas de cáncer humano como HT-29, Colo-35, Jurkat y MCF-7 entre otros⁸⁵. Los

resultados de activación de caspasas obtenidos al tratar las células MCF-7 con $^{26}[1\text{-Nal}]$ evidenciaron que esta molécula posiblemente activa ambas vías de apoptosis, intrínseca y extrínseca, lo cual podría conducir a una muerte más acelerada con respecto al efecto de $^{26}[F]$. Esta hipótesis explicaría los resultados de Anexina V/7AAD (Figura 16A), donde se observa que bajo las mismas condiciones experimentales (entre estas el tiempo de tratamiento), $^{26}[F]$ genera un desplazamiento de la población celular hacia apoptosis temprana mientras que $^{26}[1\text{-Nal}]$ lo hace hacia apoptosis tardía.

Conclusiones del capítulo 6.4: La observación de la morfología celular y los estudios de citometría permiten concluir que los dímeros $^{26}[F]$ y $^{26}[1\text{-Nal}]$ generan un tipo de muerte celular principalmente mediada por apoptosis que no involucra procesos membranolíticos; este es un resultado promisorio, ya que es el tipo de muerte deseado para un posible fármaco, debido a que se caracteriza por ser un proceso altamente selectivo, más organizado y con menos efectos colaterales como inflamación o daño a tejidos. Mediante el kit de Anexina y medición de caspasas se pudo establecer que el péptido dimérico $^{26}[F]$: $(\text{RRWQWRFKKG})_2\text{K-Ahx}$ desplaza la población celular hacia apoptosis temprana y activa en mayor medida caspasa 9; mientras que $^{26}[1\text{-Nal}]$: $(\text{RRWQWR-1-Nal-KKLG})_2\text{K-Ahx}$ desplaza la población celular en mayor proporción hacia apoptosis tardía y activa tanto caspasa 8 como caspasa 9. Los resultados de este capítulo están enmarcados dentro del objetivo específico número 4. Parte de los resultados de este capítulo fueron publicados en la revista International Journal of Molecular Sciences y sometidos en la revista RSC Advances (Para mayor información ver anexo A-1.5 y A-1.8).

6.5 Escalamiento sintético: Obtención y caracterización de 1 g de $^{26}[F]\text{-LfcinB (20-30)}_2$

Esta tesis doctoral está enmarcada dentro de un macroproyecto que busca aproximarse a la fase preclínica de un medicamento contra el cáncer de mama. Para ello, una vez encontrada una molécula promisoriosa en ensayos *in vitro*, el siguiente paso consiste en realizar ensayos biológicos *in vivo* o *ex vivo* que normalmente demandan grandes cantidades de péptido (más de 100 mg). Por esta razón, dentro del macroproyecto se planteó un escalamiento sintético que consiste en pasar de la obtención de 10 mg de producto, que es la cantidad de péptido aproximada que se obtiene en el protocolo de síntesis estandarizado dentro del grupo SAMP, a la obtención de una cantidad mayor. En

este trabajo se abordó el primer paso de escalamiento que consiste en la obtención de 1 g de producto (dímero); los objetivos de este escalamiento son: (i) evaluar si es posible obtener una mayor cantidad del dímero promisorio en una sola síntesis, (ii) verificar mediante caracterización analítica que se obtenga un producto con las mismas propiedades fisicoquímicas y (iii) evidenciar si es posible optimizar el consumo de reactivos y solventes al producir cantidades mayores de la molécula. En los resultados previamente descritos se identificaron dos moléculas promisorias, $^{26}\text{[F]}$: (RRWQWRFKCLG)₂K-Ahx y $^{26}\text{[Nal]}$: (RRWQWR-1-Nal-KCLG)₂K-Ahx. La molécula escogida como modelo para el escalamiento fue el péptido dimérico $^{26}\text{[F]}$ debido a que, al no tener una modificación con un aminoácido no natural, su costo de producción es menor.

El primer lote del péptido $^{26}\text{[F]}$ obtenido para los estudios *in vitro* mostrados previamente, se sintetizó a partir de 0,1 g de resina, para mayor facilidad en la lectura, este se denominará de ahora en adelante “Lote 1”. Para el primer paso de escalamiento se planteó aumentar 10 veces la cantidad de resina inicial con respecto al Lote 1, para ello se partió de 1,0519 g de resina Rink Amide AM Resin de Novabiochem® Lot: S7537830 901, lo que corresponde a aproximadamente 10 veces más que lo empleado en el Lote 1, por facilidad el producto obtenido en la síntesis en la cual se partió de 1,0519 g de resina se denominará Lote 2. Con el fin de mejorar la trazabilidad del proceso y disminuir la probabilidad de errores sistemáticos, se estandarizó un documento para el protocolo de síntesis, optimizado a partir del que se ha venido empleando dentro del grupo de investigación SAMP. En este documento se adicionó el registro del volumen de solvente medido en cada paso de la síntesis, tiempo y tipo de agitación tanto en los pasos de reacción de acople como en los pasos de desprotección, peso teórico y experimental de los activadores y aminoácidos empleados; y se realizó la prueba de Kaiser por triplicado. Además, se llevó un registro fotográfico de los test de Kaiser realizados y del reactivo (Fmoc-aminoácido) pesado (Ver anexo C).

Para la síntesis de péptidos, se emplea una resina polimérica que tiene una sustitución en mEq/g de grupos amino disponibles para la incorporación del primer aminoácido; esta sustitución fue suministrada por el proveedor con un valor de 0,46 meq/g, sin embargo, este valor puede cambiar de lote a lote y también después de incorporar el primer aminoácido. Teniendo en cuenta la gran cantidad de resina que se empleó para la obtención del Lote 2, es importante determinar con exactitud esta sustitución con el fin de optimizar la cantidad de aminoácido y activadores adicionados en cada acople. Para ello,

se determinó por espectrofotometría UV la sustitución de la resina antes y después del primer acople de acuerdo a reportes previos⁵⁰. Mediante la ecuación de Lambert-Beer se determinó la sustitución en cada peso de resina (5, 8, 12 y 15 mg de resina), encontrando un valor promedio de 0,47 mEq de grupo amino/g resina para antes del primer acople y 0,43 mEq de grupo amino /g resina después del primer acople (Figura 17), este último valor fue empleado para el cálculo de los excesos de aminoácido y activadores.

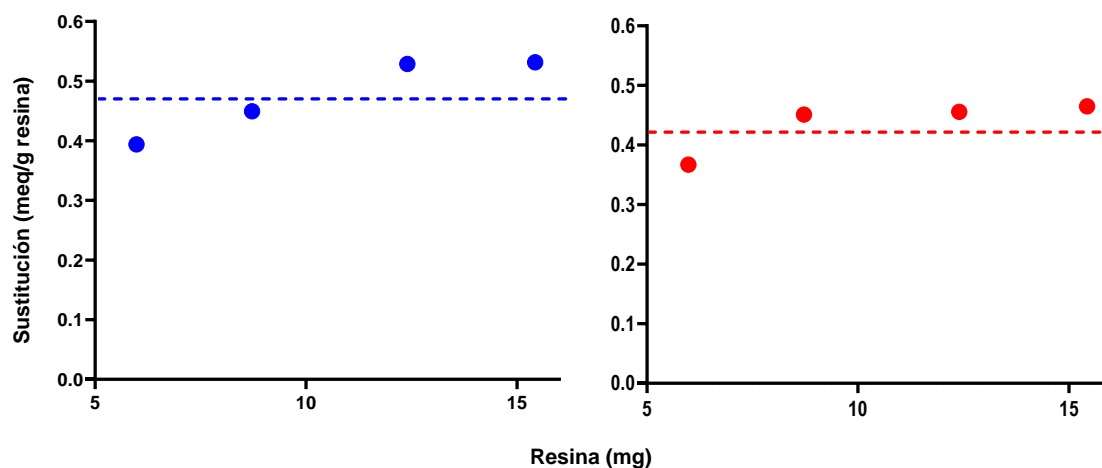


Figura 18. Cálculo de sustitución de la resina Rink Amide AM mediante espectroscopía UV. Azul: Antes del primer acople. Rojo: Después del primer acople.

Como estrategia de activación, para la obtención del Lote 2 (1,0 g de resina), se empleó DCC/6-Cl-HOBt; como se hizo en el Lote 1 (0,1 g de resina). Sin embargo, al trabajar con 5 excesos se formó gran cantidad del derivado de N-Acílúrea del Fmoc-aminoácido, que es un subproducto de reacción poco soluble, que dificultó considerablemente la filtración y exigió lavados con consumo elevado de disolventes. Por esta razón, se optimizaron las condiciones de activación, disminuyendo la cantidad de Fmoc-Aminoácido, hasta bajar a 1,5 excesos, respecto a la sustitución de la resina. Esto disminuyó la formación de N-Acílúrea y adicionalmente, permitió emplear una cantidad de reactivos mucho menor, lo cual redujo considerablemente los costos de obtención del péptido.

El comportamiento sintético de los Lotes 1 y 2 de ²⁶[F] se ilustra en la Figura 18, en donde se presenta el número de ciclos de acople para cada residuo. Cabe mencionar que la síntesis se realiza del extremo C al N-terminal, y en este contexto el primer residuo introducido a la resina fue el ácido 6-(Fmoc-amino)hexanoico (Ahx), y el aminoácido Fmoc-Lys(Fmoc)-OH fue el segundo residuo acoplado, en la Figura 18 estos dos residuos fueron

representados por X y K₂, respectivamente. Para la síntesis del Lote 1 se emplearon 5 excesos de aminoácido, respecto a la sustitución de la resina; esta síntesis mostró un comportamiento muy favorable, ya que la mayoría de los residuos necesitaron un único ciclo para la reacción de acople. Se presentó dificultad moderada en la introducción de los aminoácidos Phe y Arg (residuos 7 y 8), que requirieron tres y dos ciclos de acople, respectivamente. En la síntesis del Lote 2, se presentó el siguiente comportamiento: (i) en los primeros cinco residuos se empleó un solo ciclo para el acople; a pesar de usar sólo 1,5 excesos de Fmoc-aminoácido activado. (ii) Para unir los residuos de las posiciones 6 y del 9 al 13 se necesitaron dos ciclos de reacción (3 excesos en total), para cada uno. (iii) Los residuos 7 y 8 (Phe y Arg) fueron el paso crítico de la síntesis, ya que requirieron 3 y 4 ciclos de acople, respectivamente.

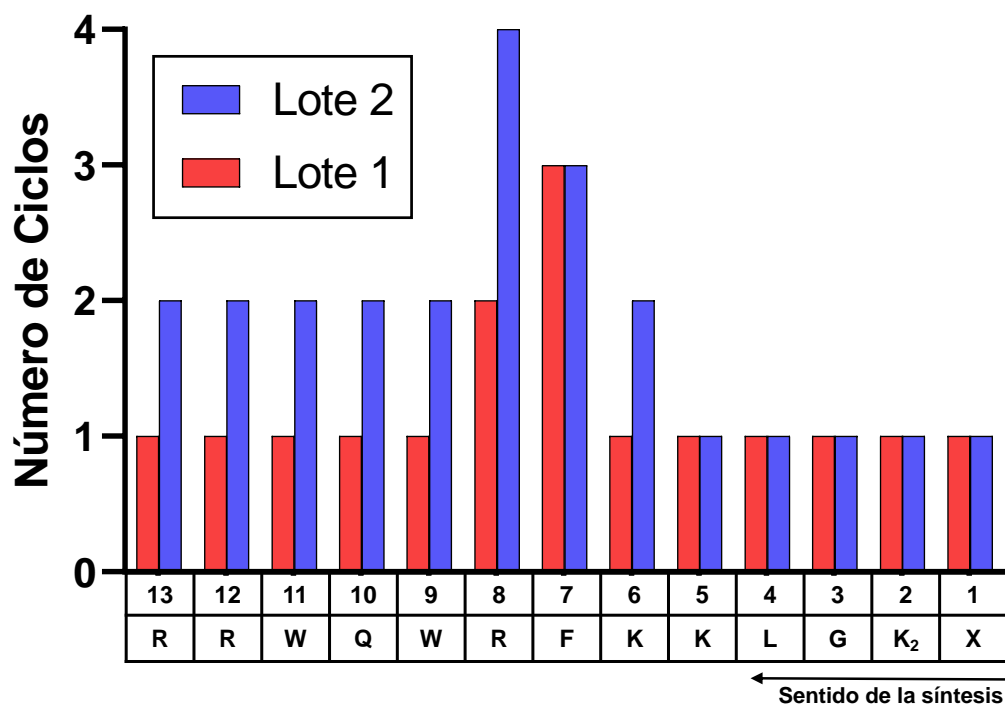


Figura 19. Comportamiento de la síntesis del péptido (RRWQWRFKKLG)₂K-Ahx. . Lote 1: 100 mg de resina, Lote 2: 1000 mg de resina. (X: Ácido 6-(Fmoc-amino)hexanoico, K₂: Fmoc-Lys(Fmoc)-OH). La síntesis se realiza del extremo C al N-terminal, correspondientes a X y R, respectivamente.

Las cantidades empleadas de solventes y reactivos para la obtención de los Lotes 1 y 2 se reportan en la tabla 6. Como se puede apreciar, para el Lote 1 se obtuvieron 0,1224 g de péptido crudo, con un rendimiento del 77%; mientras que para el Lote 2 se obtuvieron 1,8755 g de producto crudo con un rendimiento de 112%. El rendimiento es

significativamente superior en el Lote 2; posiblemente atribuido a que la resina que se emplea en el test de Kaiser es menos representativa cuando se trabajó con cantidades mayores. Para poder comparar las cantidades de aminoácidos y solventes consumidos en la producción de cada lote, se realizó una normalización empleando la relación: Cantidad de insumo (aminoácido o solvente) / gramos de producto obtenido. Con respecto a la cantidad de aminoácidos gastado (suma de todos los aminoácidos), para el Lote 1 se requirieron 3,4 g de aminoácido para obtener 0,1224 g de producto crudo lo que da una relación de 28 g de aminoácido/ g de producto crudo; mientras que para el Lote 2 se requirieron 17,5 g de aminoácido para obtener 1,8755 g de producto crudo, lo que se traduce en una relación de 9,3 g de aminoácido/g de producto crudo. Si se comparan estas relaciones, se puede concluir que para el Lote 2 se requirió aproximadamente la mitad de aminoácido por gramo de producto crudo con respecto al Lote 1. Por otro lado, la cantidad de solventes empleado en el Lote 1 fue de 0,8 L (6,5 L de solvente/ g de producto crudo); mientras que para el Lote 2 se requirieron 1,6 L (0,85 L de solvente/ g de producto crudo). En el caso de los solventes, el ahorro también es bastante significativo, ya que en el Lote 2 se empleó una cantidad hasta 7 veces menor por gramo de producto obtenido con respecto al Lote 1.

Tabla 8. Cantidad de reactivos empleados para la obtención de dos lotes del péptido $^{26}\text{[F]}$ -LfcinB (20-30)₂. **Lote 1:** 100 mg de resina, **Lote 2:** 1000 mg de resina. *Rendimiento calculado a partir de la cantidad de péptido crudo esperado teóricamente.

Reactivo	LOTE 1	LOTE 2
	Cantidad (g)	
DCC	1,5	6,8
6-Cl-HOBt	1,2	5,6
Ahx	0,1	0,5
K ₂	0,1	0,8
Arg	1,2	7,2
Trp	0,5	2,9
Gln	0,3	1,7
Phe	0,5	1,6
Lys	0,4	1,9
Leu	0,2	0,5
Gly	0,1	0,4
DMF	450,4	1035,0
DCM	412,9	640,0

Piperidina	1,1	9,2
Total AA (g)	3,4	17,5
Total Solvente (L)	0,8	1,6
Crudo obtenido (g)	0,1224	1,8755
Rendimiento* (%)	77	112

Se realizó un análisis comparativo de los productos obtenidos en los Lotes 1 y 2 por RP-HPLC y espectrometría de masas de alta resolución HRMS ESI-Q/TOF (Figura 19). Como se puede apreciar, el Lote 1 y Lote 2 poseen un perfil cromatográfico similar, con un pico mayoritario en un tiempo de retención de 6,0 min. Por HRMS se obtuvo un valor de masa experimental de $3341,9736 \pm 0,0017$ uma para el Lote 1 y $3341,9721 \pm 0,0020$ uma con lo cual se verifica que la identidad química de ambos lotes es la misma.

La Figura 19A corresponde al producto puro del Lote 1 después de 6 meses de almacenamiento a -20°C . Como se puede apreciar, transcurrido este tiempo se conserva un pico mayoritario en t_R 6,0 min; sin embargo, se observan subproductos y la pureza cromatográfica es del 70%. Es importante mencionar que inicialmente este péptido se había obtenido con una pureza cromatográfica del 91% por lo es evidente la degradación del mismo en las condiciones de almacenamiento descritas. La figura 19B corresponde al perfil cromatográfico del péptido crudo obtenido para el Lote 2. Se evidencia un pico mayoritario también en t_R 6,0 min y una pureza cromatográfica del 72%, cabe destacar que, para el producto crudo, este perfil cromatográfico se mantiene exactamente igual después de 6 meses de almacenamiento, por lo que se concluyó que la mejor opción era almacenar el Lote 2 en su forma cruda e ir purificando de acuerdo a las necesidades experimentales. Finalmente, la figura 19C corresponde al producto del Lote 2 purificado. Como se observa aparece principalmente un único pico mayoritario en 6,0 min con una pureza de 95%; para esta purificación se partió de 100,22 mg de péptido crudo y se obtuvo el un rendimiento de purificación del 57,1%, correspondiente a 57,42 mg de dímero puro. Además, los productos puros obtenidos de los lotes 1 y 2 presentaron el mismo efecto citotóxico contra las líneas celulares evaluadas sugiriendo que el escalamiento no afectó las propiedades anticancerosas del péptido.

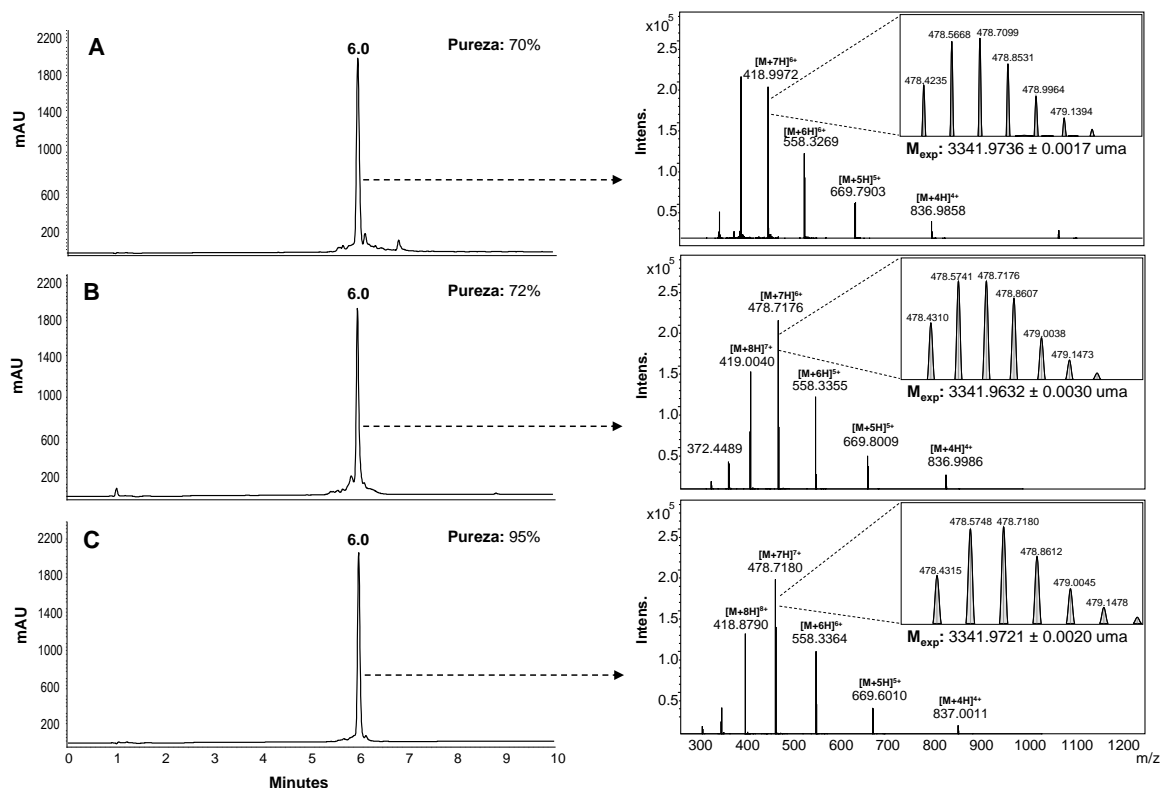


Figura 20. Caracterización analítica de los Lote 1 y 2 por RP-HPLC y HRMS ESI-Q /TOF. **A.** Lote 1 puro, **B.** Lote 2 crudo, **C.** Lote 3 puro.

Conclusiones del capítulo 6.5: Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que fue posible obtener una cantidad de hasta 1,8755 g de ²⁶[F] empleando la estrategia de activación DCC/6-Cl-HOBt. Sin embargo, al utilizar una cantidad de resina 10 veces mayor es necesario emplear una menor cantidad de excesos para los activadores y los aminoácidos empleados; esto permite mejorar considerablemente las condiciones experimentales, ya que es más sencillo filtrar los subproductos y se requiere menor cantidad de solvente para los lavados. Mediante HPLC y HRMS se logró evidenciar que la identidad química del Lote 1 y el Lote 2 fue la misma y finalmente fue posible optimizar considerablemente la cantidad de reactivos y solventes empleados en la obtención del Lote 2, disminuyendo la cantidad de aminoácidos empleado a la mitad y la cantidad de solvente a la séptima parte.

7. CONCLUSIONES

Once péptidos análogos a la secuencia ($^{20}\text{RRWQWR}\underline{\text{M}}\text{KKLG}^{30}$)₂-K-Ahx fueron sintetizados en fase sólida (SPPS) usando la estrategia Fmoc/tBu, en estas moléculas la posición 26 fue reemplazada puntualmente por: (i) Aminoácidos naturales (K, D, A, L y F) y (ii) aminoácidos no naturales (Dip, Bpa, 1-Nal, hF, 2-Abz y 4-Abz). Se encontró que la posición 26 juega un rol crítico en el efecto citotóxico que ejercen los dímeros contra las líneas celulares humanas derivadas de cáncer de Mama MCF-7 y HTB-132; nuestros resultados sugieren que el aumento en la hidrofobicidad de esta posición, causa un incremento en el efecto citotóxico del péptido contra las células de cáncer.

Los péptidos más potentes contra MCF-7 fueron $^{26}\text{[F]}$: (RRWQWREKKLG)₂-K-Ahx y $^{26}\text{[1-Nal]}$: (RRWQWR-1-Nal-KKLG)₂-K-Ahx, ambos mostraron un efecto citotóxico rápido y dependiente de la concentración. $^{26}\text{[F]}$ fue más selectivo en ensayos *in vitro*, ya que afectó en mayor medida a las células de cáncer con respecto a las líneas normales HEK-293 y fibroblastos primarios. Es de resaltar que ninguno de los dos péptidos fue hemolítico ni presentó toxicidad significativa en el modelo *G. Mellonella*, también fueron seguros en el modelo murino en dosis de hasta 70 mg/kg (140 veces mayor a la concentración efectiva *in vitro*). Por otra parte, $^{26}\text{[1-Nal]}$ fue más resistente a la degradación enzimática, conservando una especie mayoritaria correspondiente al péptido intacto hasta por 3 horas de tratamiento con pepsina o tripsina.

Los resultados de citometría de flujo mostraron que ambos péptidos actúan por rutas de apoptosis y no comprometen la membrana citoplasmática en el tipo de muerte celular que ejercen contra MCF-7. El péptido dimérico $^{26}\text{[F]}$ desplaza la población celular hacia eventos de apoptosis temprana y activa principalmente caspasa 9, relacionada con la ruta de activación de la apoptosis intrínseca; mientras que $^{26}\text{[1-Nal]}$ desplaza la población celular hacia la apoptosis tardía y activa tanto caspasa 8 como caspasa 9, lo que sugiere que en el tipo de muerte celular que ejerce, activa ambas rutas de muerte celular (apoptosis intrínseca y apoptosis extrínseca).

Finalmente, se logró obtener el primer paso del escalamiento de una molécula promisoría contra el cáncer de mama. Se obtuvieron cerca de 1,9 g del dímero $^{26}\text{[F]}$, el cual fue caracterizado por RP-HPLC y HRMS. Se optimizaron las condiciones sintéticas ahorrando en consumo de reactivos y solventes; y con un rendimiento alto hasta el producto crudo. La purificación del producto se realizó usando columnas (cartuchos) de SPE en fase reversa y con elución con gradiente; esta metodología permitió obtener $^{26}\text{[F]}$ con una pureza cromatográfica del 95% y con un rendimiento del 57%.

Los resultados de este trabajo son promisorios para el futuro desarrollo de un medicamento contra el cáncer de mama; siendo las moléculas más interesantes los dímeros $^{26}\text{[F]}$: $(\text{RRWQWRFKKG})_2\text{-K-Ahx}$ y $^{26}\text{[1-Nal]}$: $(\text{RRWQWR-1-Nal-KKLG})_2\text{-K-Ahx}$ ya que ambas ejercen un efecto citotóxico *in vitro* potente contra células de cáncer de mama y ninguna de ellas es hemolítica. $^{26}\text{[F]}$ tiene menor resistencia a la degradación proteolítica pero mayor selectividad y es más económica al no poseer un aminoácido no natural en la posición 26; mientras que $^{26}\text{[1-Nal]}$ posee menor selectividad *in vitro* pero mayor potencia contra las líneas de cáncer y mayor resistencia a la degradación.

8. APORTES ACADÉMICOS

Parte de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral fueron publicados en las siguientes modalidades: (i) Ocho (8) publicaciones en revista científica indexada (7 publicados, 1 sometido), (ii) cuatro (4) presentaciones de póster en congreso científico internacional y (iii) tres (3) presentaciones orales en congreso científico internacional.

Los artículos científicos y certificados de participación, fueron consignados en el anexo A de la siguiente manera:

1. Artículos científicos:

1.1. **Título del artículo:** Designing Short Peptides: A Sisyphean Task?

Revista: Current Organic Chemistry

Estado: Publicado (2020)

Descripción: Artículo de revisión como parte del estado del arte de esta investigación. En este, se plantean las posibles estrategias químicas que pueden ser empleadas para potenciar la actividad biológica de los péptidos sintéticos.

1.2. **Título del artículo:** Efficient Fmoc Group Removal Using Diluted 4-Methylpiperidine: An Alternative for a Less-Polluting SPPS-Fmoc/tBu Protocol

Revista: International Journal of Peptide Research and Therapeutics

Estado: Publicado (2019)

Descripción: En este artículo se reporta la síntesis eficiente de péptidos en fase sólida, disminuyendo la concentración de piperidina en la desprotección de 25% a 2,5% lo cual contribuye a una síntesis de péptidos más económica y amigable con el medio ambiente.

- 1.3. **Título del artículo:** The k^* Concept Applied to Method Development of Peptide Analysis by RP-HPLC
Revista: ACS Omega
Estado: Publicado (2022)
Descripción: En este artículo se reporta el proceso de desarrollo y optimización del método de análisis de péptido por RP-HPLC empleando el concepto de factor de retención en el gradiente (k^*)
- 1.4. **Título del artículo:** Synthetic Peptide Purification via Solid-Phase Extraction with Gradient Elution: A Simple, Economical, Fast, and Efficient Methodology
Revista: Molecules
Estado: Publicado (2019)
Descripción: En este artículo se reporta el nuevo método para purificación de péptidos por RP-SPE que se desarrolló como parte de esta investigación y que fue empleado para la purificación de todos los dímeros sintetizados.
- 1.5. **Título del artículo:** Peptides Derived from (RRWQWRMKKLG)₂-K-Ahx Induce Selective Cellular Death in Breast Cancer Cell Lines through Apoptotic Pathway
Revista: International Journal of Molecular Sciences
Estado: Publicado (2020)
Descripción: En este artículo se reportan los estudios de efecto citotóxico y tipo de muerte celular de los dímeros análogos a ²⁶[M]LfcinB(20-30)₂ en los cuales la posición 26 se reemplazó por los aminoácidos naturales: K, D, A, L y F.
- 1.6. **Título del artículo:** The Nonapeptide RWQWRWQWR: A Promising Molecule for Breast Cancer Therapy
Revista: ChemistrySelect
Estado: Publicado (2020)
Descripción: Este es un trabajo paralelo en donde se realizaron experimentos similares a los presentados por los dímeros estudiados en esta investigación, pero en la secuencia palindrómica RWQWRWQWR.
- 1.7. **Título del artículo:** LfcinB-Derived Peptides: Specific and punctual change of an amino acid in monomeric and dimeric sequences increase selective cytotoxicity in colon cancer cell lines

Revista: Arabian Journal of Chemistry

Estado: Publicado (2022)

Descripción: Investigación complementaria donde se evidencia que el péptido dimérico $^{26}\text{[F]LfcinB(20-30)}_2$ también tiene efecto citotóxico contra las líneas celulares humanas derivadas de cáncer de colon Caco-2 y HCT-116.

- 1.8. **Título del artículo:** The incorporation of Non-Natural Amino Acids to LfcinB Derived Peptides Prevents Proteolytic Degradation and Increases the Cytotoxic Effect Against Breast Cancer Cells

Revista: ROYAL SOCIETY OPEN SCIENCE

Estado: Publicado (2023)

Descripción: En este artículo se reportan los resultados de citotoxicidad contra líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y cáncer cervicouterino HeLa, selectividad, estabilidad y toxicidad preliminar en modelo murino, obtenidos para las modificaciones puntuales con aminoácidos no naturales hidrofóbicos en la posición 26 del dímero $^{26}\text{[F]}$.

2. Presentaciones orales:

- 2.1. **Título de la presentación Oral:** PÉPTIDOS DERIVADOS DE LACTOFERRICINA BOVINA (LFCINB) CON ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA RÁPIDA Y SELECTIVA CONTRA CÁNCER DE MAMA
Congreso: 34° Congreso Latinoamericano de Química
Lugar y año: Cartagena, 2020.
Descripción: En esta presentación oral se presentaron los estudios de efecto citotóxico y tipo de muerte celular de los dímeros análogos a $^{26}[M]LfcinB(20-30)_2$ en los cuales la posición 26 se reemplazó por los aminoácidos naturales: K, D, A, L y F.
- 2.2. **Título de la presentación Oral:** AGENTES CITOTÓXICOS SELECTIVOS CONTRA CÉLULAS CaCo-2 DERIVADOS DE PÉPTIDOS CORTOS ANALÓGOS DE LACTOFERRICINA
Congreso: 34° Congreso Latinoamericano de Química
Lugar y año: Cartagena, Colombia (2020)
Descripción: En esta presentación oral se presentaron los estudios donde se evidencia que el péptido dimérico $^{26}[F]LfcinB(20-30)_2$ también tiene efecto citotóxico contra las líneas celulares humanas derivadas de cáncer de colon Caco-2 y HCT-116.
- 2.3. **Título de la presentación Oral:** Desarrollo de métodos cromatográficos para el análisis y purificación por RP SPE de péptidos sintéticos.
Congreso: III Workshop de Péptidos terapéuticos para bioaplicaciones
Lugar y año: Valparaíso, Chile (2021)
Descripción: En esta presentación oral se expusieron los detalles para el desarrollo de métodos para el análisis de péptidos por RP-HPLC, así como el nuevo método de purificación por RP-SPE desarrollado como parte de esta investigación. Este trabajo obtuvo el premio al mejor trabajo de la sección Nuevos Doctores.

3. Pósters

- 3.1. **Título del póster:** Una metodología simple, rápida y eficiente para la separación de péptidos sintéticos
Congreso: II Congreso de Química del Caribe
Lugar y año: Barranquilla, Colombia (2019)
Descripción: En este póster se presentaron parte de los resultados del desarrollo del método de purificación de péptidos por RP-SPE.
- 3.2. **Título del póster:** Degradación en sangre de péptidos derivados de la Lactoferricina Bovina
Congreso: II Congreso de Química del Caribe
Lugar y año: Barranquilla, Colombia (2019)
Descripción: Este póster es un estudio complementario, en el cual se presentaron los estudios de degradación de diferentes péptidos derivados de LfcinB en suero de sangre.
- 3.3. **Título del póster:** OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS POR RP-HPLC EMPLEANDO COLUMNAS Core-Shell
Congreso: II Congreso de Química del Caribe
Lugar y año: Barranquilla, Colombia (2019)
Descripción: En este póster se presentó un trabajo paralelo a esta investigación en donde se desarrolló un método para el análisis de péptidos por RP-HPLC, pero empleando columnas Core-Shell en vez de columnas monolíticas.
- 3.4. **Título del póster:** SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS DE UNA MEZCLA COMPLEJA: DISEÑO, DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR RP-HPLC UTILIZANDO UNA COLUMNA MONOLÍTICA
Congreso: 34° Congreso Latinoamericano de Química
Lugar y año: Cartagena, Colombia (2020)
Descripción: En este póster se presentaron parte de los resultados del desarrollo de métodos para el análisis de péptidos por RP-HPLC.

Bibliografía

- 1 R. L. Siegel, K. D. Miller and A. Jemal, *CA. Cancer J. Clin.*, 2019, **69**, 7–34.
- 2 World Human Organization (WHO), <http://www.who.int/cancer/en/>, (accessed 22 May 2018).
- 3 Globocan, <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>, (accessed 5 May 2019).
- 4 L. Wilkinson and T. Gathani, *Br. J. Radiol.*, 2022, **95**, 7–9.
- 5 A. G. Waks and E. P. Winer, *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, 2019, **321**, 288–300.
- 6 D. Gaspar, A. Salomé Veiga and M. A. R. B. Castanho, *Front. Microbiol.*, 2013, **4**, 1–16.
- 7 É. de O. Mello, G. B. Taveira, A. de O. Carvalho and V. M. Gomes, *Int. J. Nanomedicine*, 2019, **14**, 407–420.
- 8 Y. Hao, N. Yang, D. Teng, X. Wang, R. Mao and J. Wang, *BioMetals*, 2018, **31**, 331–341.
- 9 A. Ochoa-Zarzosa, M. Báez-Magaña, J. J. Guzmán-Rodríguez, L. J. Flores-Alvarez, M. Lara-Márquez, B. Zavala-Guerrero, R. Salgado-Garciglia, R. López-Gómez and J. E. López-Meza, *Plant Foods Hum. Nutr.*, 2021, **76**, 133–142.
- 10 M. R. Felício, O. N. Silva, S. Gonçalves, N. C. Santos and O. L. Franco, *Front. Chem.*, 2017, 5.
- 11 Y. Qin, Z. D. Qin, J. Chen, C. G. Cai, L. Li, L. Y. Feng, Z. Wang, G. J. Duns, N. Y. He, Z. S. Chen and X. F. Luo, *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.*, 2019, **14**, 70–84.
- 12 M. E. Drago-Serrano, R. Campos-Rodriguez, J. C. Carrero and M. de la Garza, *Curr. Pharm. Des.*, 2018, **24**, 1067–1078.
- 13 D. Pulido, M. V. Nogús, E. Boix and M. Torrent, *J. Innate Immun.*, 2012, **4**, 327–336.
- 14 N. Shagaghi, E. A. Palombo, A. H. A. Clayton and M. Bhave, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, **32**, 1–10.

-
- 15 S. Sharma, M. Sinha, S. Kaushik, P. Kaur and T. P. Singh, *Biochem. Res. Int.*, 2013, **2013**, 1–8.
 - 16 N. D. J. Huertas Méndez, Y. Vargas Casanova, A. K. Gómez Chimbi, E. Hernández, A. L. Leal Castro, J. M. Melo Diaz, Z. J. Rivera Monroy and J. E. García Castañeda, *Molecules*, 2017, **22**, 1–10.
 - 17 N. de J. Huertas, Z. J. Rivera Monroy, R. Fierro Medina and J. E. García Castañeda, *Molecules*, , DOI:10.3390/molecules22060987.
 - 18 Y. Vargas Casanova, J. A. Rodríguez Guerra, Y. A. Umaña Pérez, A. L. Leal Castro, G. Almanzar Reina, J. E. García Castañeda and Z. J. Rivera Monroy, *Molecules*, 2017, **22**, 1–11.
 - 19 C. Pucci, C. Martinelli and G. Ciofani, *Ecancermedicalscience*, , DOI:10.3332/ECANCER.2019.961.
 - 20 P. Eroles, A. Bosch, J. Alejandro Pérez-Fidalgo and A. Lluch, *Cancer Treat. Rev.*, 2012, **38**, 698–707.
 - 21 Instituto Nacional del Cáncer, “Cancer de seno (mama) Aspectos generales, <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno>, (accessed 3 February 2019).
 - 22 A. Prat, J. S. Parker, C. Fan, M. C. U. Cheang, L. D. Miller, J. Bergh, S. K. L. Chia, P. S. Bernard, T. O. Nielsen, M. J. Ellis, L. A. Carey and C. M. Perou, *Ann. Oncol.*, 2012, 1–8.
 - 23 J. Kao, K. Salari, M. Bocanegra, Y. Choi, L. Girard, J. Gandhi, A. Kevin, T. Hernandez-boussard, P. Wang, A. F. Gazdar, J. D. Minna and J. R. Pollack, *PLoS One*, 2009, **4**, 1–16.
 - 24 K. D. Voduc, M. C. U. Cheang, S. Tyldesley, K. Gelmon and T. O. Nielsen, *J. Clin. Oncol.*, , DOI:10.1200/JCO.2009.24.9284.
 - 25 A. Hartman, R. R. Kaldate, L. M. Sailer, L. Painter and C. E. Grier, *Cancer*, 2011, 1–9.
 - 26 A. Satija, S. Ahmed, R. Gupta, A. Ahmed, S. Pratap, S. Singh, S. Mishra and S. Bhatnagar, *Indian J Med Res*, 2014, **139**, 216–225.
 - 27 D. Taylor, *Transformation of an icon*, Manassas, 1st edn., 2016.
 - 28 M. Lacroix and G. Leclercq, *Breast Cancer Res. Treat.*, 2004, **83**, 249–89.
 - 29 A. Giangaspero and A. Sandri, L., Tossi, *Eur J Biochem.*, 2001, **268**, 5589–5600.
 - 30 K. A. Brogden, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, **3**, 238–250.
 - 31 M. Zhu, P. Liu and Z. W. Niu, *Chinese Chem. Lett.*, 2017, **28**, 703–708.

- 32 S. Riedl, D. Zweytschik and K. Lohner, *Chem. Phys. Lipids*, 2011, **164**, 766–781.
- 33 H. P. Hsieh, Y. T. Wu, S. T. Chen and K. T. Wang, *Bioorganic Med. Chem.*, 1999, **7**, 1797–1803.
- 34 D. S. Lee, S. J. Kim, G. W. Choi, Y. B. Lee and H. Y. Cho, *Molecules*, , DOI:10.3390/molecules23040909.
- 35 M. Zoghi, S. A. Nosrati, F. Rogni and S. Rajabifar, *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 2018, **61**, 903–911.
- 36 R. S. Weinberg, M. O. Grecco, G. S. Ferro, D. J. Seigelshifer, N. V. Perroni, F. J. Terrier, A. S??nchez-Luceros, E. Maronna, R. S??nchez-Marull, I. Frahm, M. D. Guthmann, D. Di Leo, E. Spitzer, G. N. Ciccica, J. Garona, M. Pifano, A. V. Torbidoni, D. E. Gomez, G. V. Ripoll, R. E. Gomez, I. A. Demarco and D. F. Alonso, *Springerplus*, , DOI:10.1186/s40064-015-1217-y.
- 37 R. Roudi, N. L. Syn and M. Roudbary, *Front. Immunol.*, 2017, **8**, 15–18.
- 38 L. T. Nguyen, J. K. Chau, N. A. Perry, L. de Boer, S. A. J. Zaat and H. J. Vogel, *PLoS One*, 2010, **5**, 1–8.
- 39 J. L. Gifford, H. N. Hunter and H. J. Vogel, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, **62**, 2588–2598.
- 40 L. H. Vorland, H. Ulvatne, J. Andersen, H. Haukland, Ø. Rekdal and J. S. Svendsen, *Scand J Infect*, 1998, **30**, 513–517.
- 41 Gibbons, J. A., R. K. Kanwar and J. R. Kanwar, *Front Biosci.*, 2011, **3**, 1080–1088.
- 42 N. Bruni, M. T. Capucchio, E. Biasibetti, E. Pessione, S. Cirrincione, L. Girauda, A. Corona and F. Dosio, *Molecules*, 2016, **21**, 752–77.
- 43 J. S. Mader, A. Richardson, J. Salsman, D. Top, R. De Antueno, R. Duncan and D. W. Hoskin, , DOI:10.1016/j.yexcr.2007.05.015.
- 44 B. Deslouches and Y. P. Di, *Oncotarget*, 2017, **8**, 46635–46651.
- 45 V. A. Solarte, J. E. Rosas, Z. J. Rivera, M. L. Arango-rodríguez, J. E. García and J. Vernot, *Biomed Res. Int.*, 2015, **2015**, 1–13.
- 46 A. Solarte, P. Conget, J. Vernot, J. E. Rosas, M. L. Arango-rodri, J. Rivera and J. E. Garci, 2017, **12**, 1–17.
- 47 P. Lloyd-Williams, F. Albericio and E. Giralt, *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*, CRC Press, 1997.
- 48 E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger and P. I. Cook, *Anal. Biochem.*, 1970, **34**, 595–8.
- 49 C. F. Vergel Galeano, Z. J. Rivera Monroy, J. E. Rosas Pérez and J. E. García

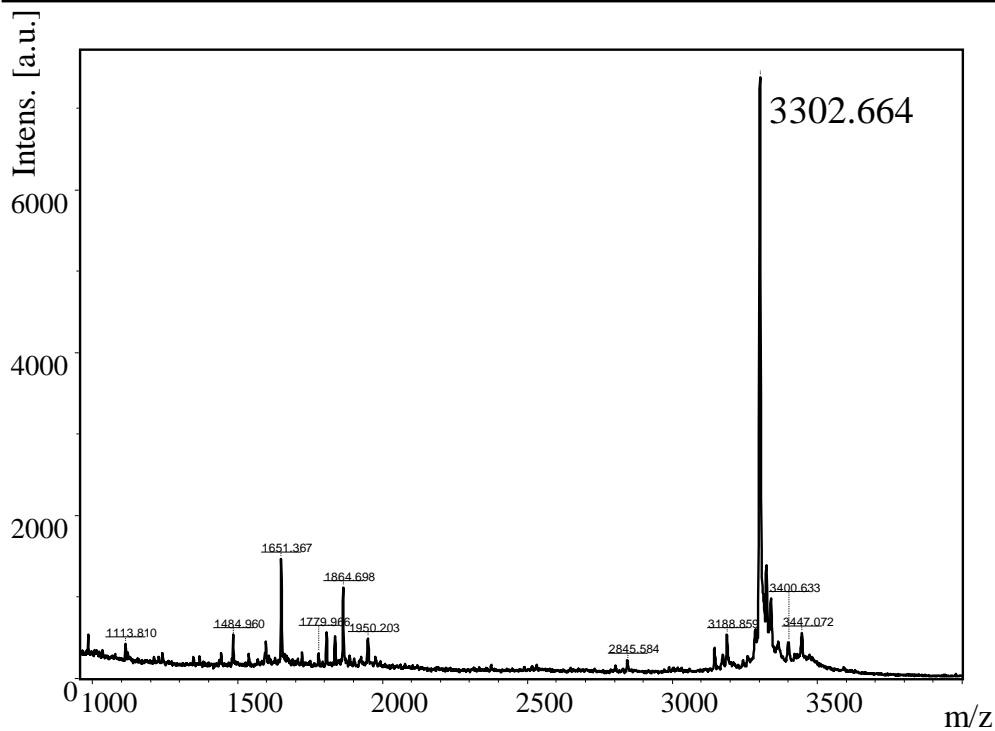
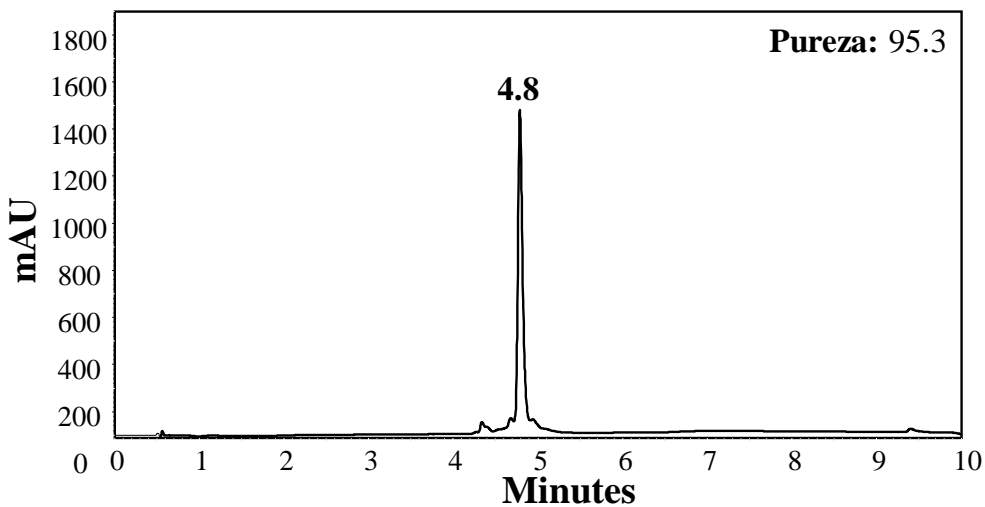
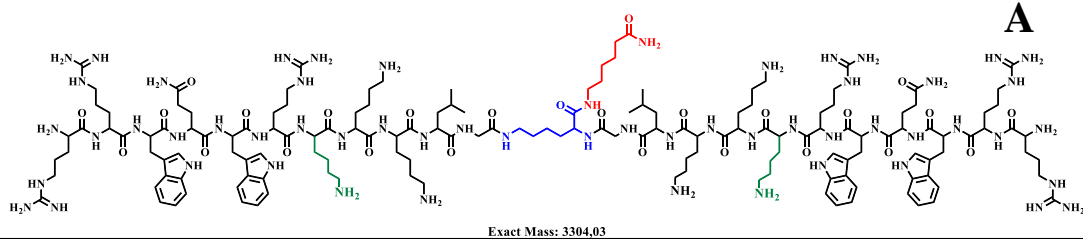
- Castañeda, *J. Mex. Chem. Soc.*, 2014, **58**, 386–392.
- 50 V. Rodríguez, H. Pineda, N. Ardila, D. Insuasty, K. Cárdenas, J. Román, M. Urrea, D. Ramírez, R. Fierro, Z. Rivera and J. García, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2019, 4–6.
- 51 T. Langan, K. Rodgers and R. Chou, *Methods Cell Sci.*, 2017, **1524**, 97–105.
- 52 A. Oddo and P. Hansen, *Methods Mol Biol.*, 2017, **1548**, 427–435.
- 53 S. Stains, *Mol. Biol. Cell*, 2003, **0**, 4–6.
- 54 P. Jiménez-Alcántar, R. López-Gómez, J. E. López-Meza and A. Ochoa-Zarzosa, *Front. Mol. Biosci.*, 2022, **9**, 1–14.
- 55 M. Chalamaiah, W. Yu and J. Wu, *Food Chem.*, 2018, **245**, 205–222.
- 56 D. S. Insuasty-Cepeda, M. Maldonado, J. E. García-Castañeda and Z. J. Rivera-Monroy, *RSC Adv.*, 2021, **11**, 4247–4255.
- 57 D. S. Insuasty Cepeda, H. M. Pineda Castañeda, A. V. Rodríguez Mayor, J. E. García Castañeda, M. Maldonado Villamil, R. Fierro Medina and Z. J. Rivera Monroy, *Molecules*, , DOI:10.3390/molecules24071215.
- 58 Y. Vargas Casanova, J. A. Rodríguez Guerra, Y. A. Umaña Pérez, A. L. Leal Castro, G. Almanzar Reina, J. E. García Castañeda and Z. J. Rivera Monroy, *Molecules*, 2017, **22**, 1–11.
- 59 A. Kulkarni, A. M. Stroup, L. E. Paddock, S. Hill, J. Plascak and A. Llanos, *Cancer Heal. Disparities*, 2019, **3**, e1–e17.
- 60 N. Howlader, A. Noone, M. Krapcho, D. Miller, A. Brest, M. Yu and J. Ruhl, *Natl. Cancer Inst.*
- 61 L. Yao, Y. Zhang, K. Chen, X. Hu and L. X. Xu, *PLoS One*, 2011, **6**, 1–13.
- 62 G. Schaftenaar and J. De Vlieg, *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, 2012, **26**, 311–318.
- 63 A. Cutone, L. Rosa, G. Ianiro, M. S. Lepanto, M. Carmela, P. Valenti and G. Musci, 2020, 1–26.
- 64 M. Arias, A. L. Hilchie, E. F. Haney, J. G. M. Bolscher, M. H. Eric, R. E. W. Hancock and H. J. Vogel, 2016, **95**, 91–98.
- 65 J. Kaur and P. K. Singh, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2020, **0**, 1–19.
- 66 H. M. Pineda-Castañeda, D. S. Insuasty-Cepeda, V. A. Niño-Ramírez, H. Curtidor and Z. J. Rivera-Monroy, *Curr. Org. Chem.*, 2020, **24**, 2448–2474.
- 67 D. Shi, *Nano Life*, 2017, **07**, 1771001.
- 68 M. Xie, D. Liu and Y. Yang, *Open Biol.*, , DOI:10.1098/rsob.200004.
- 69 G. Preta, *Front. Cell Dev. Biol.*, 2020, **8**, 1–10.

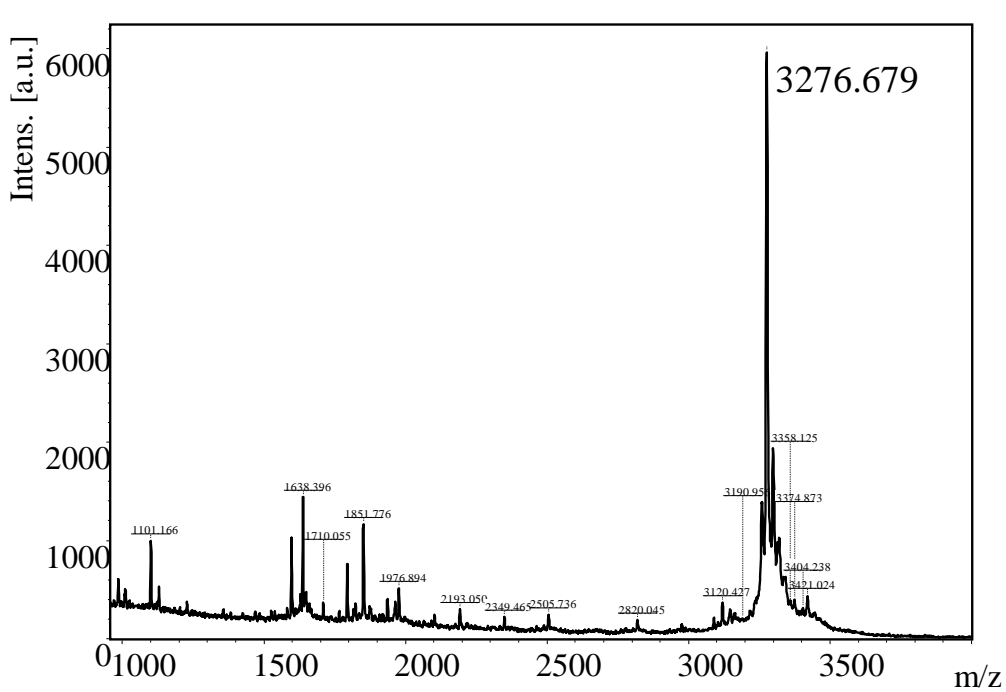
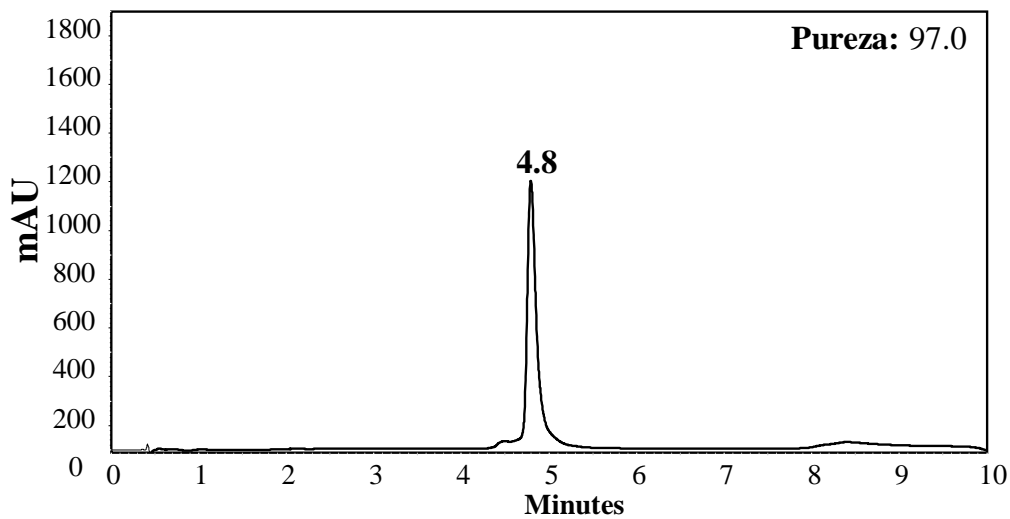
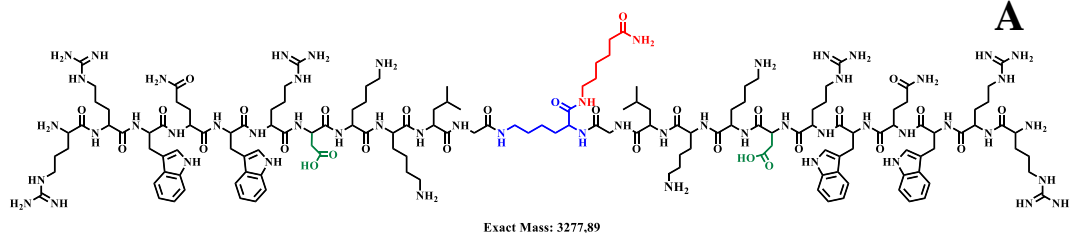
- 70 K. Amin and R.-M. Dannenfelser, *J. Pharm. Sci.*, 2006, **95**, 1173–1176.
- 71 A. Carolina Barragán-Cárdenas, D. Sebastián Insuasty-Cepeda, K. Johanna Cárdenas-Martínez, J. López-Meza, A. Ochoa-Zarzosa, A. Umaña-Pérez, Z. Jenny Rivera-Monroy and J. Eduardo García-Castañeda, *Arab. J. Chem.*, 2022, 103998.
- 72 Y. Chen, X. Xu, S. Hong, J. Chen, N. Liu, C. B. Underhill and K. Creswell, *Analysis*, 2001, 2434–2438.
- 73 A. Barragán-Cárdenas, D. S. Insuasty-Cepeda, V. A. Niño-Ramírez, A. Umaña-Pérez, A. Ochoa-Zarzosa, J. E. López-Meza, Z. J. Rivera-Monroy and J. E. García-Castañeda, *ChemistrySelect*, 2020, **5**, 9691–9700.
- 74 M. A. Cutuli, G. Petronio Petronio, F. Vergalito, I. Magnifico, L. Pietrangelo, N. Venditti and R. Di Marco, *Virulence*, 2019, **10**, 527–541.
- 75 R. Rahman, A. D. Fonseka, S. C. Sua, M. Ahmad, R. Rajendran, S. Ambu, F. Davamani, A. S. B. Khoo and E. Chitra, *J. Cell. Mol. Med.*, 2021, **25**, 7181–7189.
- 76 M. G. Morash, S. E. Douglas, A. Robotham, C. M. Ridley, J. W. Gallant and K. H. Soanes, *DMM Dis. Model. Mech.*, 2011, **4**, 622–633.
- 77 A. Eguiara, O. Holgado, I. Beloqui, L. Abalde, Y. Sanchez, C. Callol and A. G. Martin, *Cell Cycle*, 2011, **10**, 3751–3757.
- 78 C. Chang, S. L. Wu, X. D. Zhao, C. T. Zhao and Y. H. Li, *Biomed. Mater. Eng.*, 2014, **24**, 909–916.
- 79 S. L. Fink and B. T. Cookson, *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 1907–1916.
- 80 D. Barras and C. Widmann, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2011, **12**, 1153–1165.
- 81 J. R. Guerra, A. B. Cárdenas, A. Ochoa-Zarzosa, J. L. Meza, A. Umaña Pérez, R. Fierro-Medina, Z. J. Rivera Monroy and J. E. García Castañeda, *RSC Adv.*, 2019, **9**, 20497–20504.
- 82 A. C. Barragán-Cárdenas, D. S. Insuasty-Cepeda, K. J. Cárdenas-Martínez, J. López-Meza, A. Ochoa-Zarzosa, A. Umaña-Pérez, Z. J. Rivera-Monroy and J. E. García-Castañeda, *Arab. J. Chem.*, 2022, **15**, 103998.
- 83 Y. Zhang, X. Chen, C. Gueydan and J. Han, *Nat. Publ. Gr.*, 2017, **28**, 9–21.
- 84 A. A. Baxter, F. T. Lay, I. K. H. Poon, M. Kvensakul and M. D. Hulett, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2017, **74**, 3809–3825.
- 85 J. Rulian and B. Lonerdal, *Biochem. Cell. Biol.*, 2016, 1–42.

B. Anexo: Caracterización de Péptidos Diméricos Derivados de LfcinB (20-30)₂

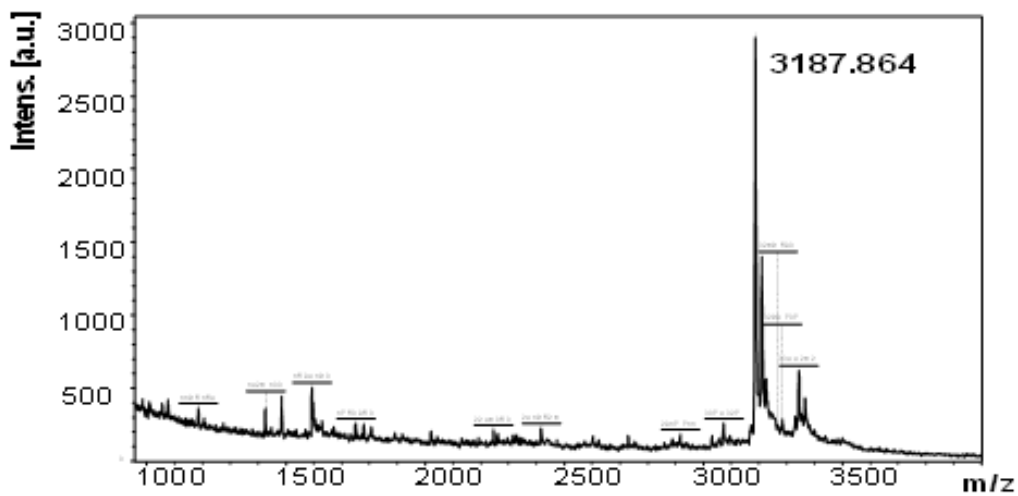
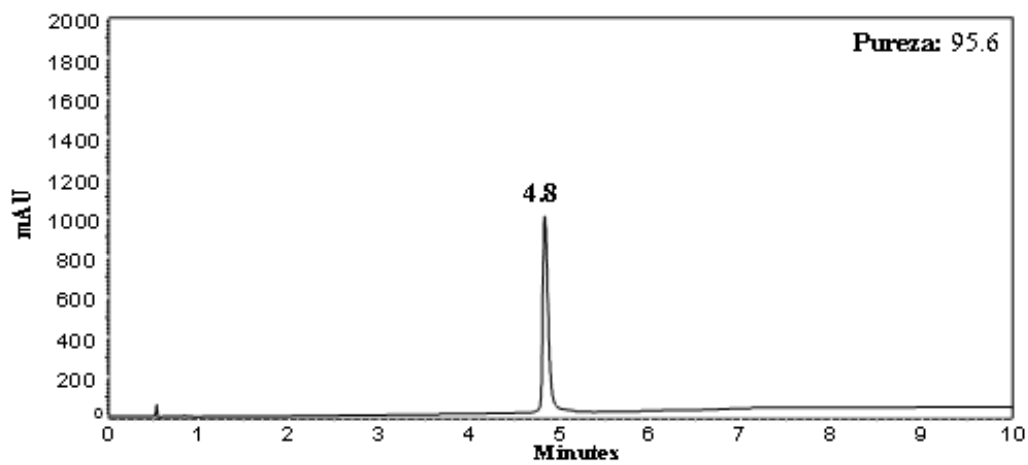
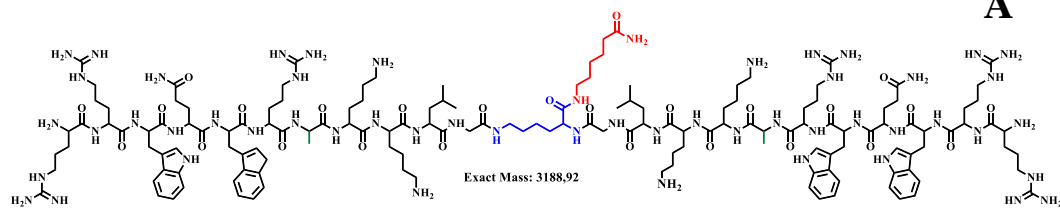
A continuación, se presenta la caracterización analítica por RP-HPLC y MS (MS MALDI-TOF o HRMS ESI-Q/TOF) de los 11 péptidos análogos sintetizados en esta investigación. Los resultados se disponen en paneles de la siguiente manera: Panel A. Estructura y masas exacta teórica del péptido, Panel B. Caracterización por RP-HPLC y pureza cromatográfica a 210 nm. C. Espectro de masas y valor experimental $[M+H]^+$ determinado.

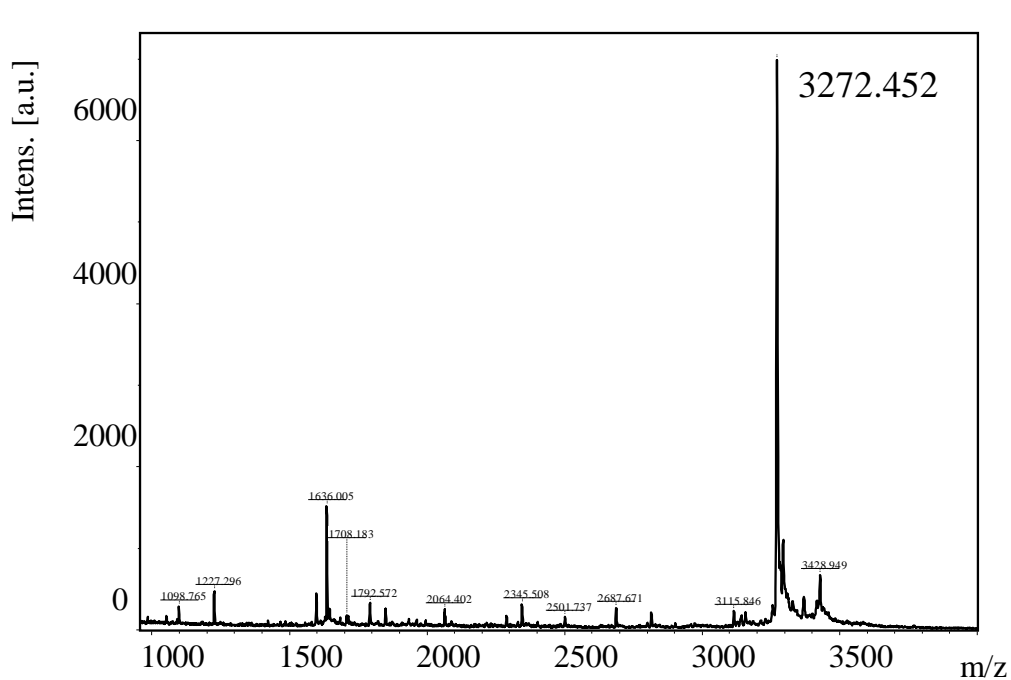
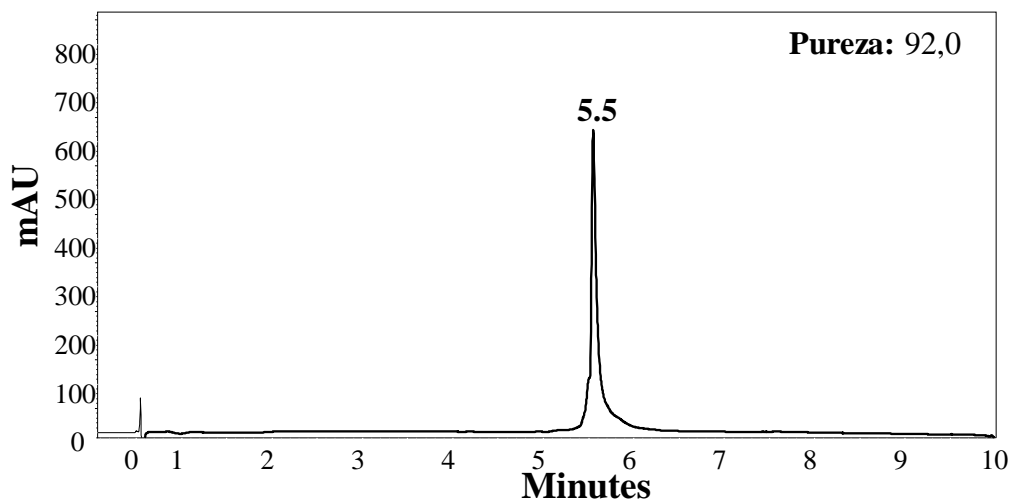
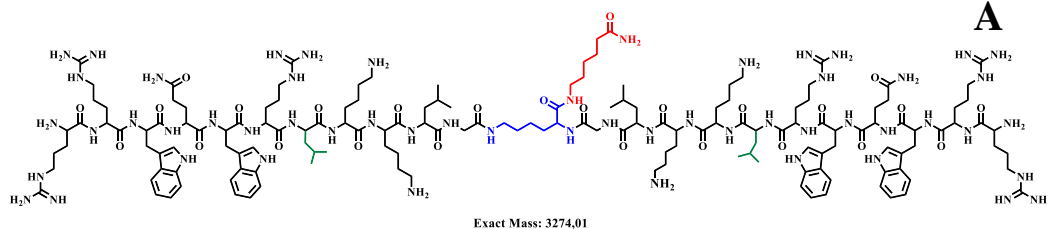
LfcinB (20-30)₂: (RRWQWRKKLG)₂KAhx



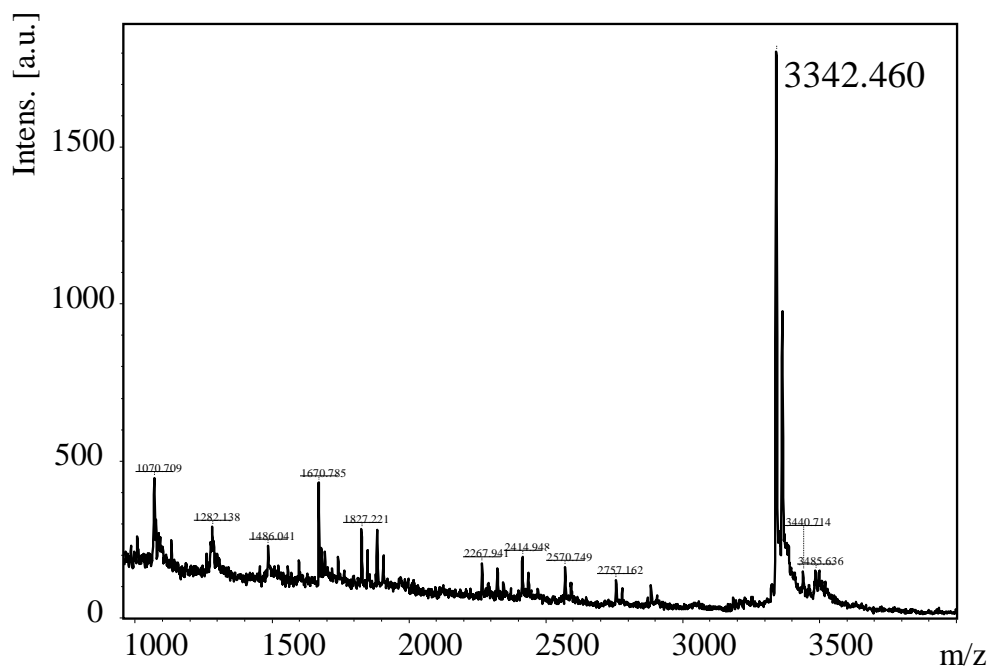
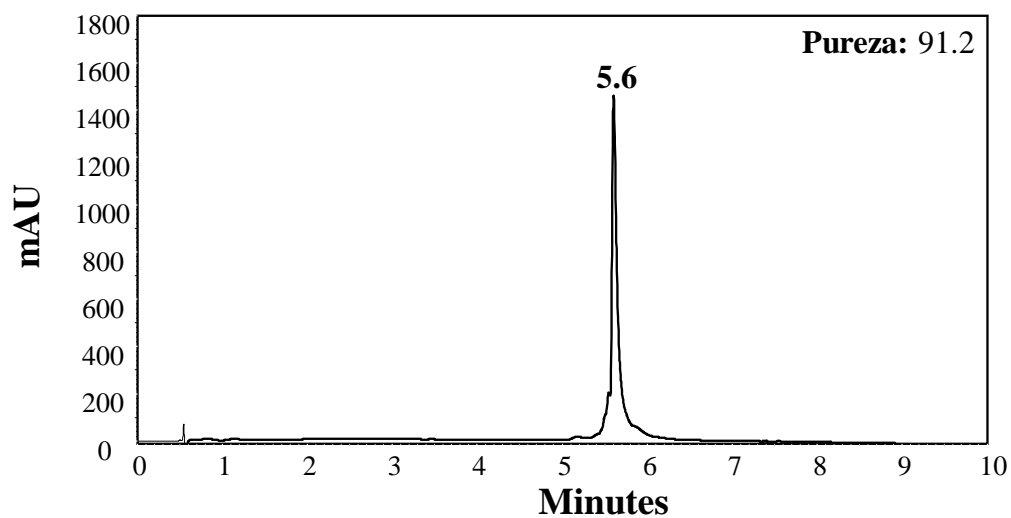
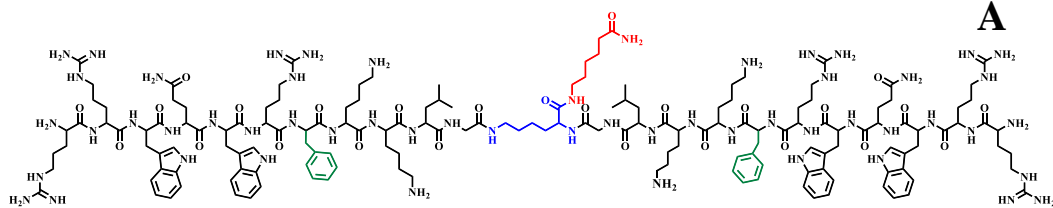
LfcinB (20-30)₂: (RRWQWRDKKLG)₂KAhx

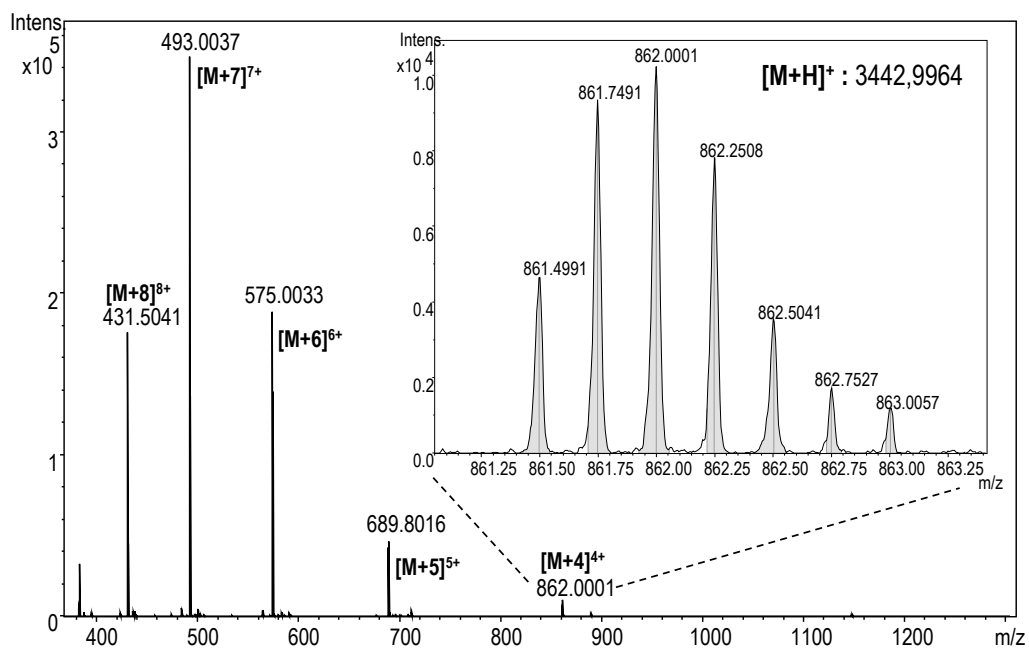
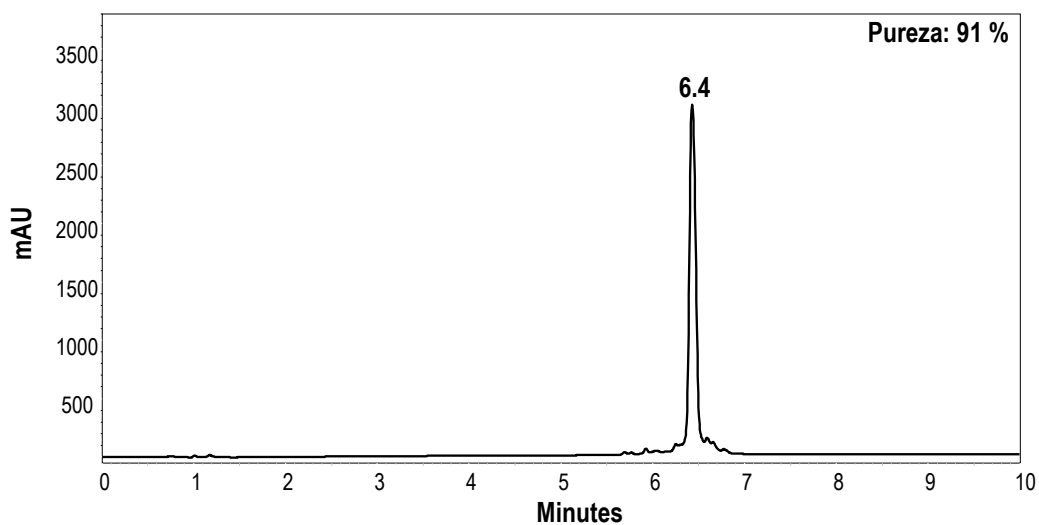
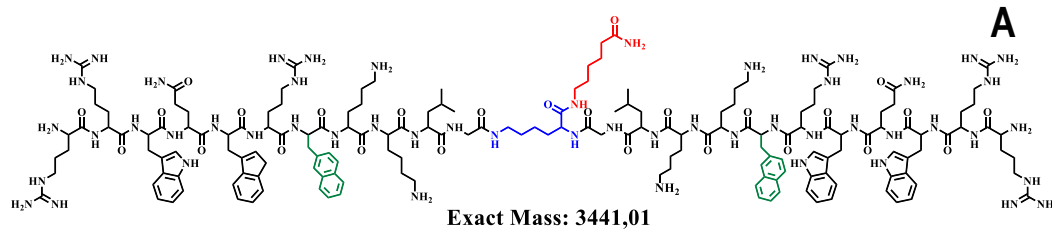
LfcinB (20-30)₂: (RRWQWR**A**KKLG)₂**K**Ahx



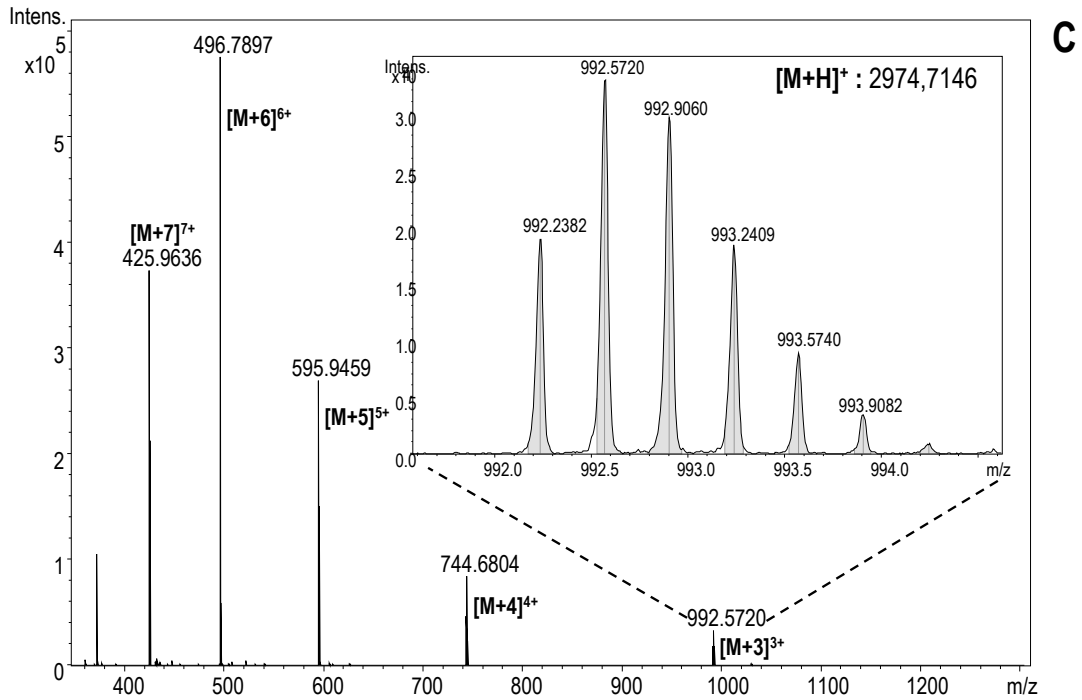
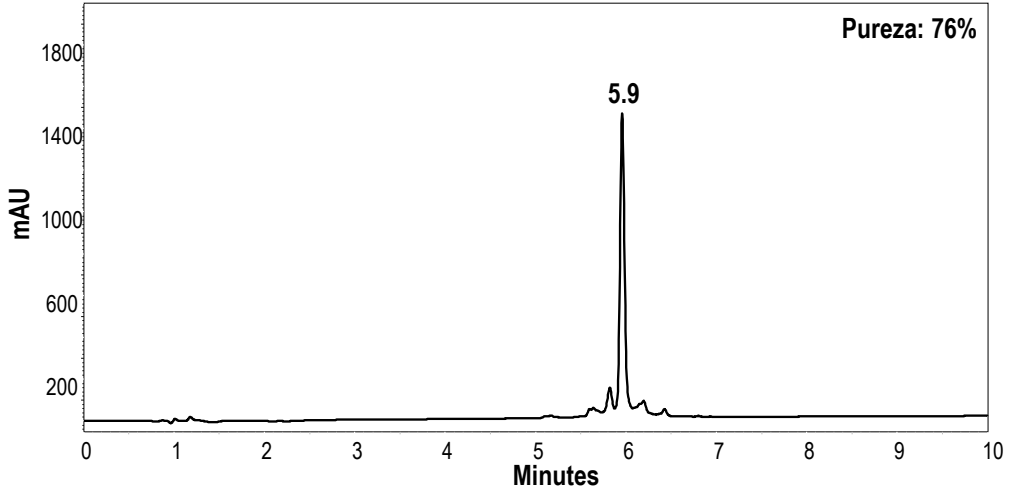
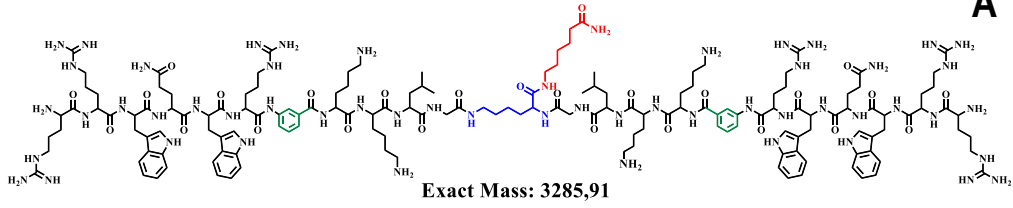
LfcinB (20-30)₂: (RRWQWRLK^LKL^G)₂KA^hh^x

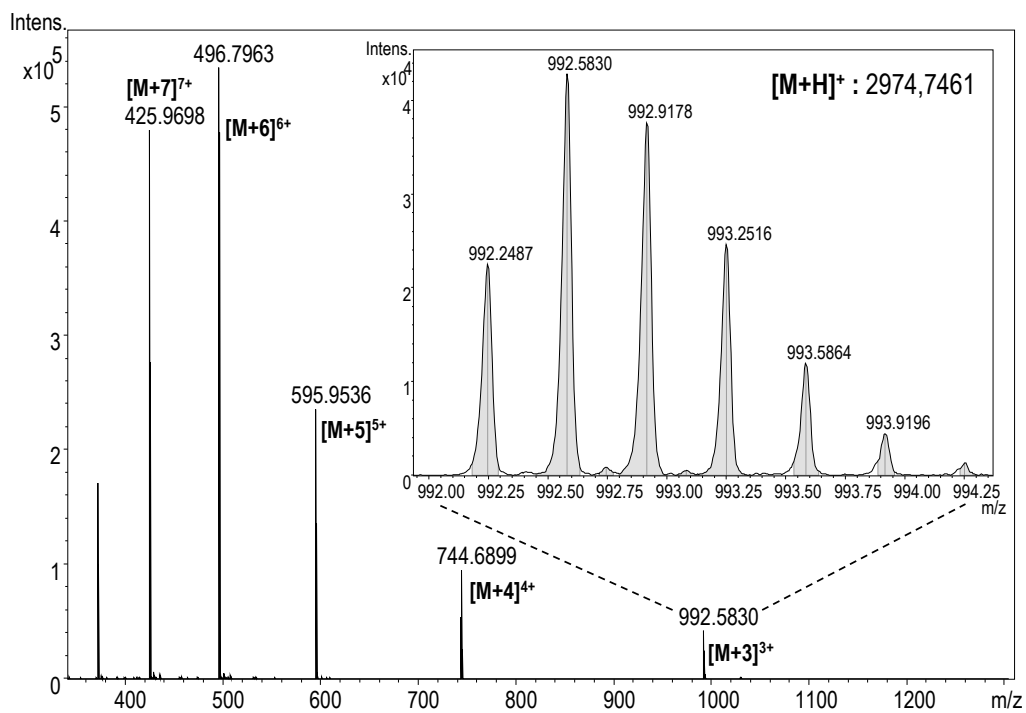
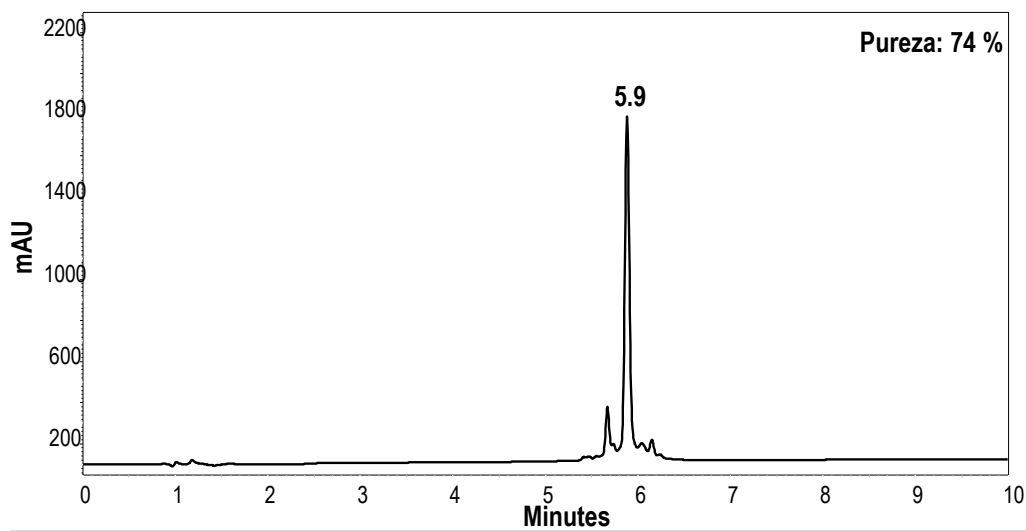
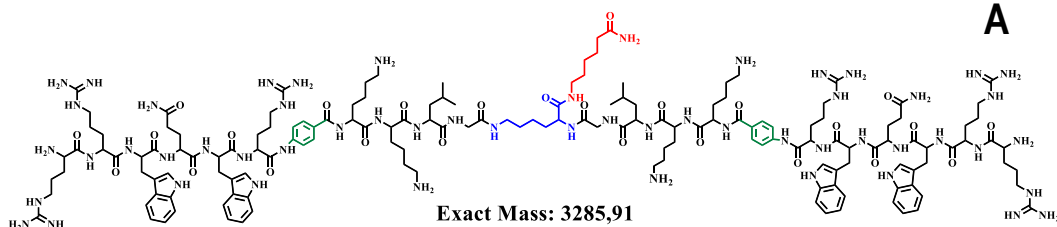
LfcinB (20-30)₂: (RRWQWR**F**KKLG)₂**K**Ahx



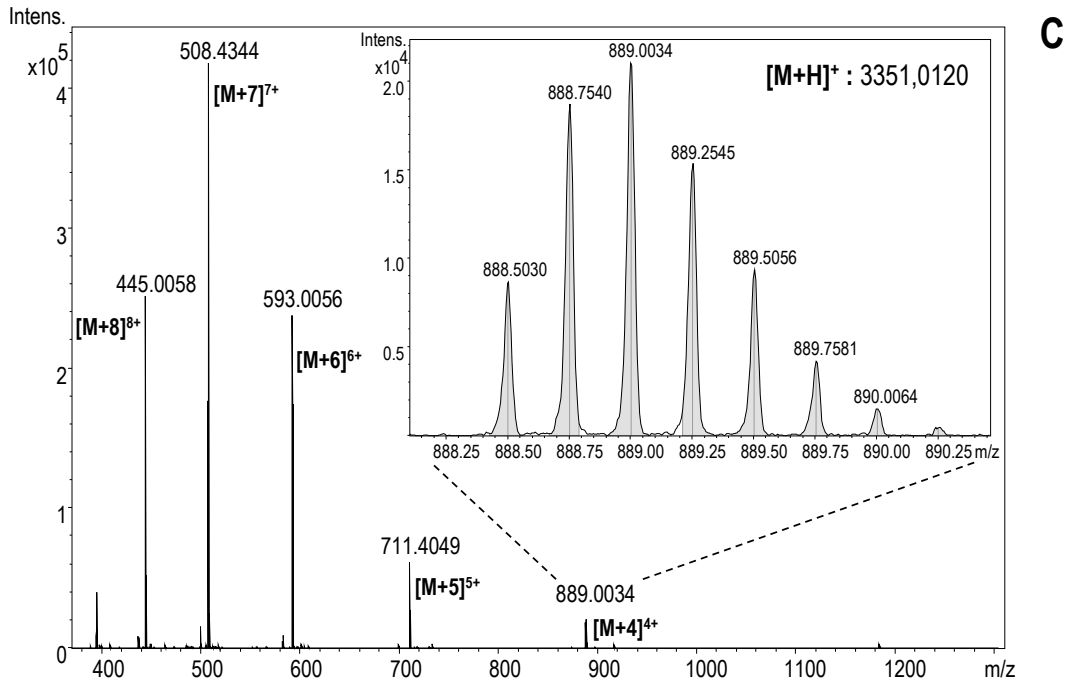
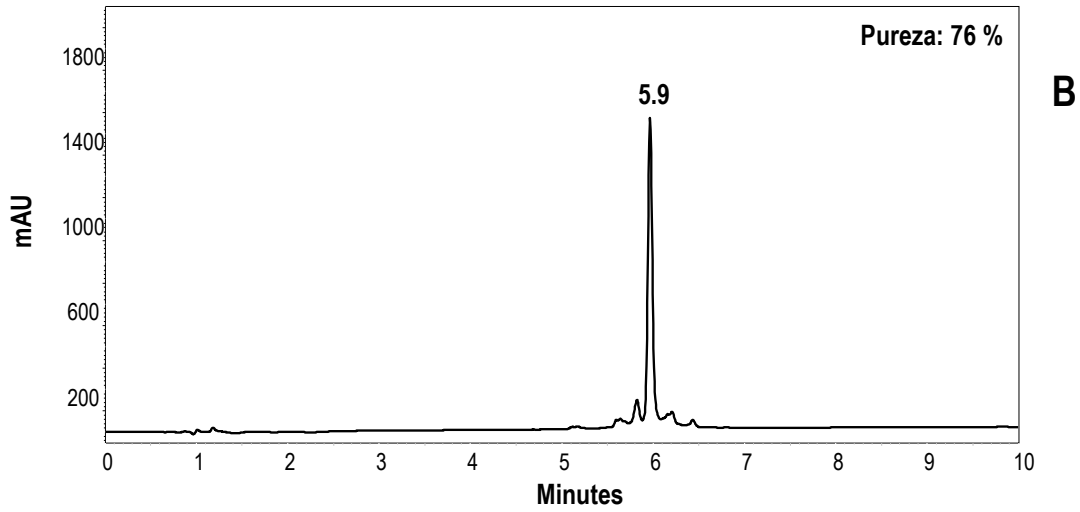
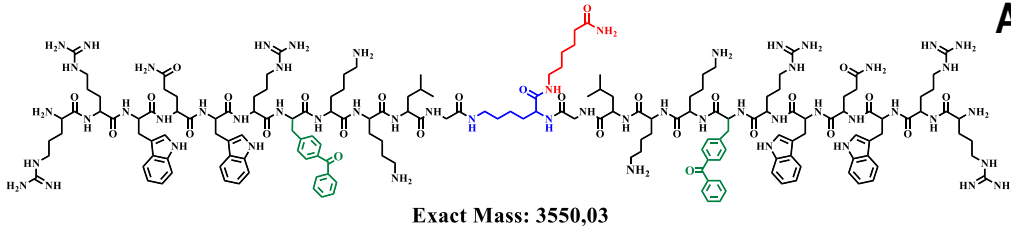
26 [1-Nal]: (RRWQWR-1-Nal-KKLG)₂KAhx

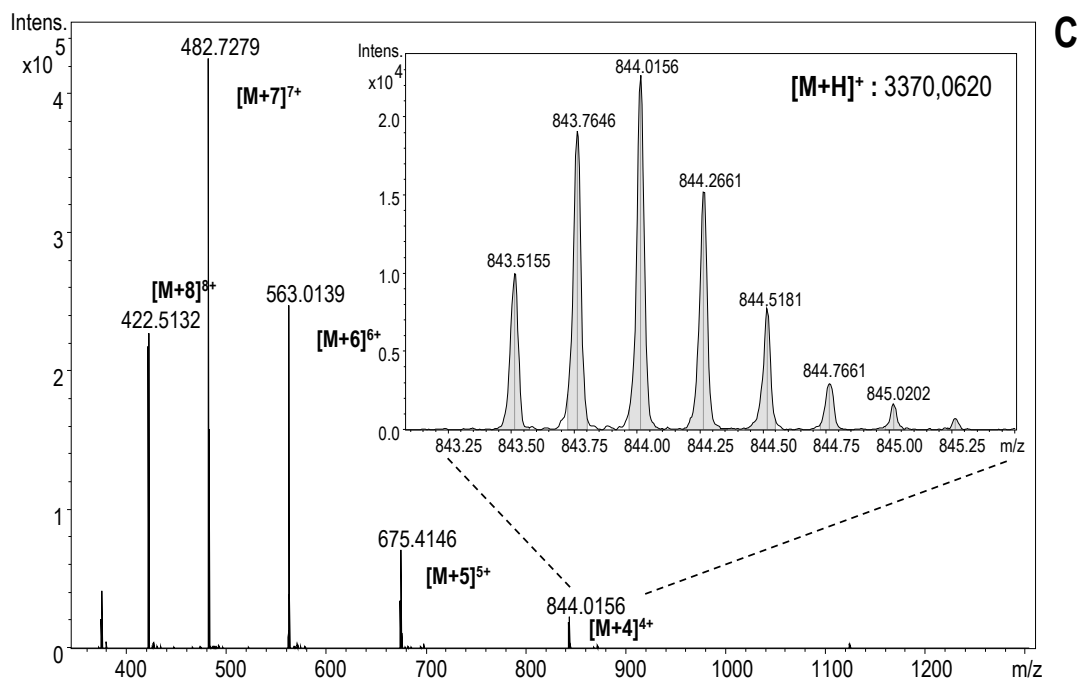
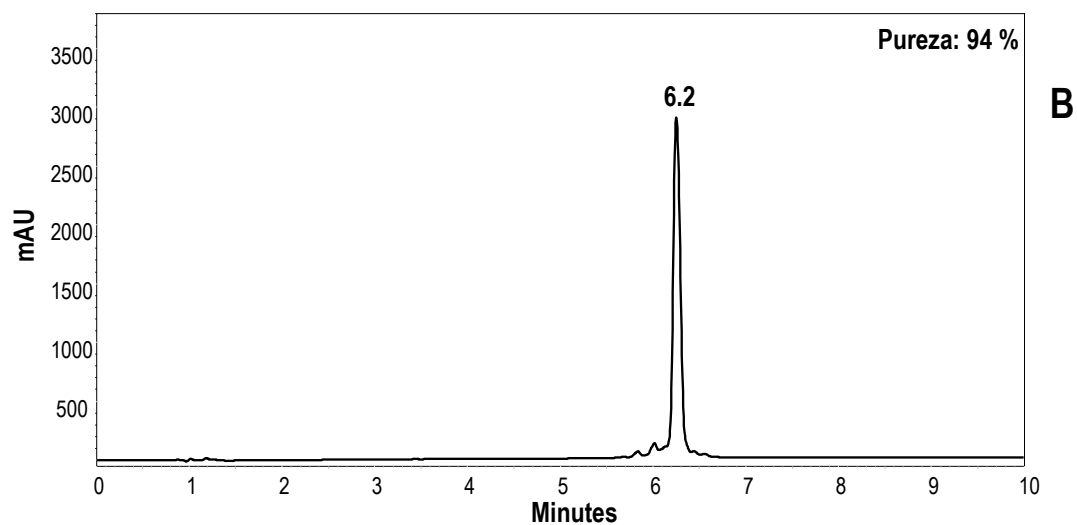
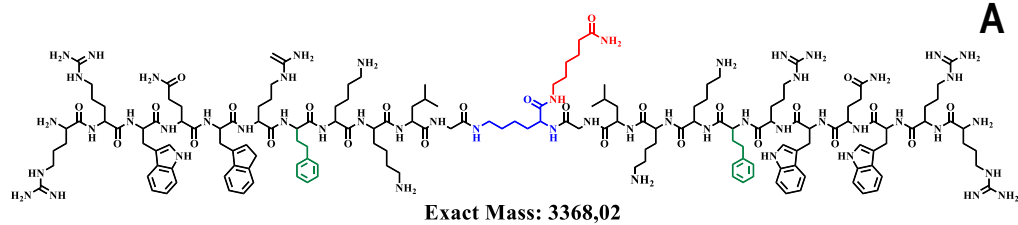
²⁶[2-Abz]: (RRWQWR-2-Abz-KKLG)₂KAhx



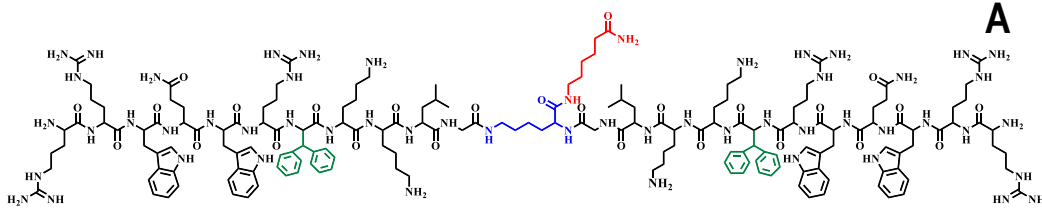
$^{26}[4\text{-Abz}]: (\text{RRWQWR-4-Abz-KKLG})_2\text{KAhx}$ 

26 [Bpa]: (RRWQR-Bpa-KKLG)₂KAhx

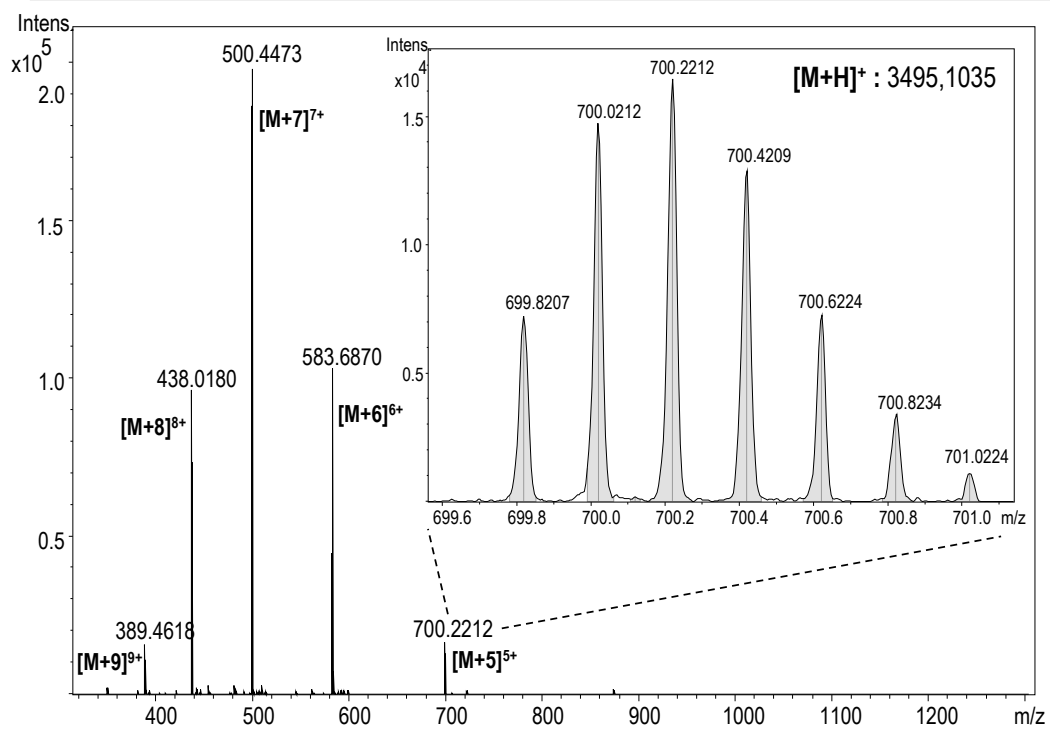
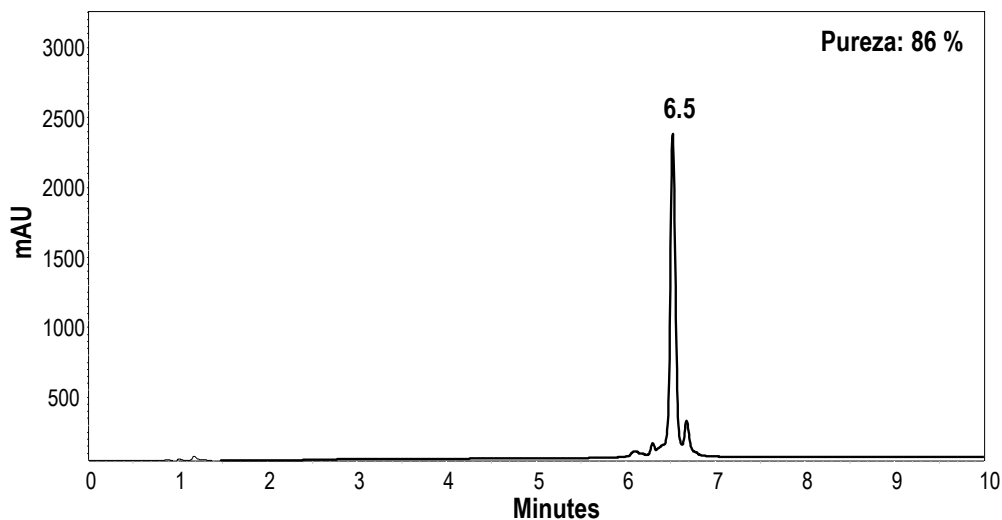


26 [HomoP]: (RRWQWR-hF-KKLG)₂KAhx

²⁶[Dip]: (RRWQR-Dip-KKLG)₂KAhx





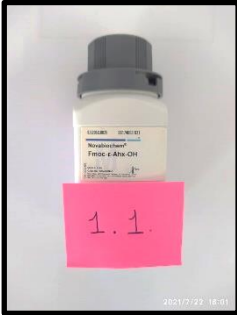


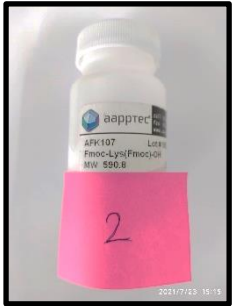
Exact Mass: 3494,04



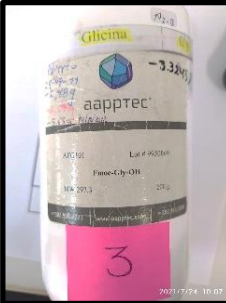





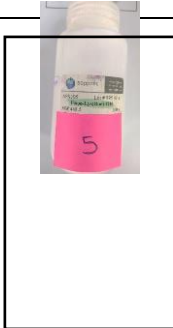





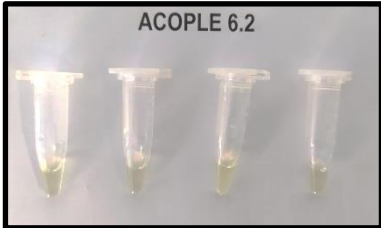


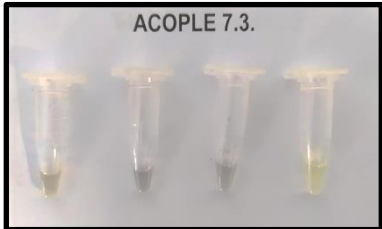




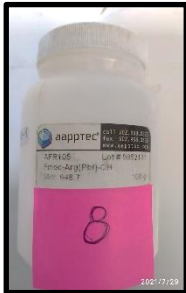
C. Anexo: Registro Fotográfico de Documentación Empleada en la Obtención de un lote de 1 g de ^{26}F LfcinB(20-30)₂


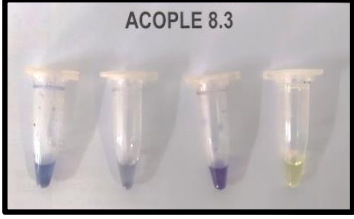


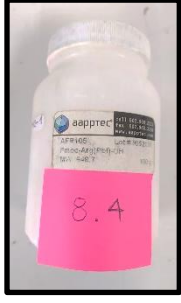

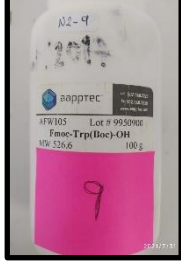
En esta anexo se encuentra el registro fotográfico de los test de Kaiser realizados por triplicado en cada ciclo de acople, así como el frasco pesado para la obtención del Lote 2 de ^{26}F LfcinB(20-30)₂.


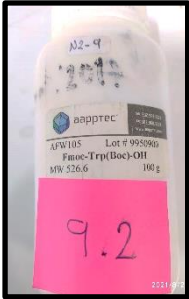

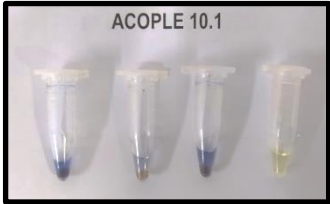


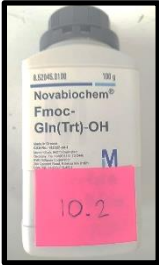



Tabla B1. Registro fotográfico de resultados Test de Kaiser de desprotección y acople y frascos de los aminoácidos pesados para la producción del lote de 1 g del péptido (RRWQWRFKCLG)2-K-Ahx.



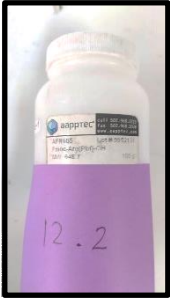



ACOPLE	TEST DE KAISER		AMINOÁCIDO
	DESPROTECCIÓN	ACOPLE	
1.1			
2.1			

3.1			
4.1			
5.1			
6.1			

6.2			
7.2			
7.3			
8.1			

8.2			
8.3			
8.4			
9.1			

9.2			
10.1			
10.2			
11.2			

12.2			
13.2			
14.1	