

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**SÍNTESIS Y CRIBADO DE PÉPTIDOS MODIFICADOS DERIVADOS
DE LACTOFERRICINA BOVINA COMO FÁRMACOS
CITOTÓXICOS CONTRA LÍNEAS DE CÁNCER DE COLON**

Karen Johanna Cárdenas Martínez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá D. C, Colombia
2024

**SÍNTESIS Y CRIBADO DE PÉPTIDOS MODIFICADOS DERIVADOS
DE LACTOFERRICINA BOVINA COMO FÁRMACOS
CITOTÓXICOS CONTRA LÍNEAS DE CÁNCER DE COLON**

Karen Johanna Cárdenas Martínez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctora en Ciencias Farmacéuticas

Director:

Javier Eduardo García Castañeda, PhD.
Universidad Nacional de Colombia

Codirectora:

Claudia Marcela Parra Giraldo, MSc., PhD.
Pontificia Universidad Javeriana

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá D.C., Colombia
2024

*“Legacy, what is a legacy?
It's planting seeds in a garden you never get to see
I wrote some notes at the beginning of a song someone will sing for me...”*

Leslie Odom Jr. / Lin-Manuel Miranda

Agradecimientos

A Dios, por sus múltiples bendiciones.

Este trabajo se forjó con el apoyo de diversas personas a las cuales les agradezco profundamente. En primer lugar, a mis padres, por su amor, por siempre brindarme fortaleza y claridad frente a los retos y posibilidades del camino, gracias a ellos y a las oportunidades que me brindaron, puedo avanzar en esta etapa de mi vida. A mi hermana, por ser la alegría de mi corazón y por mantenerme llena de vida y a Julián por su escucha, optimismo y apoyo constante.

Agradezco al profesor Javier García, por su guía, por esforzarse constantemente en la calidad, creer en la ciencia y en mí. Es un excelente director y maestro, sus enseñanzas me han permitido crecer personal y profesionalmente y le agradezco por la confianza brindada a lo largo de estos años.

A la profesora Zuly Rivera, por acompañar todo mi proceso de formación, por su dedicación, por sus consejos y apoyo en este trabajo.

Al grupo de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas, a cada uno de sus integrantes y especialmente, a las personas que me brindaron el entrenamiento y apoyo en cada una de las etapas de la tesis.

A la profesora Claudia Parra, quien me abrió las puertas de su grupo y me brindó herramientas valiosas que me han ayudado a lo largo de este camino. Y a los integrantes del grupo de investigación, la Unidad de Proteómica y Miosis Humanas, en donde desarrollé gran parte de mi tesis.

Al Profesor Vincent Jo. Davisson, quien me recibió en su grupo con amabilidad y compromiso, retándome a generar nuevas ideas y ser cada vez una mejor investigadora. A los integrantes de su grupo, quienes hicieron amena mi pasantía. A *Colombia-Purdue Partnership* y especialmente al Doctor Juan Diego Velásquez, quien apoyó inmensamente mi movilidad académica y mi estadía en Purdue.

A todas las personas que me brindaron su amistad durante estos años, por creer en mí y brindarme una recarga de energía cuando lo necesitaba.

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia y al Departamento de Farmacia, sus profesores y administrativos, quienes han sido mi casa académica por varios años.

A MinCiencias por la financiación del Proyecto- Contrato 845-2019.

A la Pontificia Universidad Javeriana y a la Universidad de Purdue, por su apoyo con los procesos de movilidad y por recibirme con los brazos abiertos.

Gracias a todos.

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.

Karen Johanna Cárdenas Martínez
Departamento de Farmacia
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia

Resumen

Síntesis y cribado de péptidos modificados derivados de lactoferricina bovina como fármacos citotóxicos contra líneas de cáncer de colon

La investigación en fármacos de origen peptídico anticancerígenos ha ganado interés debido a su potencia y selectividad. La Lactoferricina Bovina (LfcinB) y péptidos derivados han mostrado actividad citotóxica frente a cáncer de mama, por lo que se evaluó su efecto sobre cáncer de colon (líneas celulares Caco-2 y HT-29). Se identificaron dos péptidos hit, LfcinB (21-25)_{Pal} y ²⁶[F] LfcinB (20-30)₂, a partir de los cuales se construyeron librerías de péptidos monoméricos y diméricos para la obtención de 34 moléculas, cuyo efecto citotóxico se evaluó en líneas celulares de cáncer de colon. Este proceso permitió la identificación de aminoácidos clave y modificaciones de interés para mejorar la actividad. 15 moléculas mostraron concentraciones inhibitorias (IC₅₀) menores de 200 µg/mL frente a las líneas celulares de cáncer de colon, de los cuales 8 fueron considerados como péptidos optimizados por su actividad y selectividad mejorada. Algunos de estos péptidos también demostraron citotoxicidad en líneas de cáncer de próstata, cuello uterino y mama. Los péptidos optimizados con los mejores resultados **3**, **19** y el LfcinB (21-25)_{Pal} indujeron muerte celular en células HT-29 por la vía apoptótica principalmente, causando despolarización de la membrana mitocondrial, sobreexpresión de caspasas y cambios morfológicos como redondeamiento y contracción celular. La toxicidad de los péptidos optimizados **3**, **19**, LfcinB (21-25)_{Pal} y el LfcinB (21-25)_{Pal2} fue evaluada en *Galleria mellonella*, encontrando dosis letales (DL₅₀) >100mg/kg. Por otro lado, la toxicidad del péptido **19** fue evaluada en ratones CD1 mediante la prueba de Irwin, evidenciando que el péptido indujo efectos en el sistema nervioso central y la DL₅₀ está entre 70-140mg/kg. Por último, en el modelo de pez cebra se determinó que la CL₅₀ de este péptido está entre 20-25 µg/mL. Así mismo, se evidenció que este péptido optimizado presentó menor toxicidad *in vivo* que el péptido del que se derivó su secuencia (péptido hit). A partir de los resultados obtenidos se identificaron ocho péptidos optimizados, de los cuales se destacan los péptidos **3**, **19** y LfcinB (21-25)_{Pal} como candidatos para continuar en estudios para el desarrollo de tratamientos contra el cáncer de colon.

Palabras clave: Péptidos, Lactoferricina bovina, péptido hit, péptido optimizado, cáncer de colon, toxicidad, apoptosis, actividad anticancerosa.

Abstract

Synthesis and screening of modified peptides derived from bovine lactoferricin as cytotoxic drugs against colon cancer cell lines

Research on anticancer peptide drugs has gained interest due to their potency and selectivity. Bovine Lactoferricin (LfcinB) and derived peptides, have shown cytotoxic activity against breast cancer. Therefore, their effect on colon cancer was evaluated, specifically on Caco-2 and HT-29 cell lines. Two hit peptides, LfcinB (21-25)_{Pal} and ²⁶[F] LfcinB (20-30)₂, were identified. Libraries of monomeric and dimeric peptides were constructed from these, resulting in 34 molecules. Their cytotoxic effect was assessed on colon cancer cell lines. This process allowed the identification of key amino acids in the sequence necessary for cytotoxic activity and modifications of interest to enhance it. Fifteen molecules exhibited inhibitory concentrations (IC₅₀) below 200 µg/mL against colon cancer cell lines, with eight considered optimized peptides due to improved activity and selectivity. They remained active in colon cancer cell lines from 2 to 72 hours, showing cytotoxicity in prostate, cervical, and breast cancer lines. Optimized peptides, particularly **3**, **19**, and LfcinB (21-25)_{Pal}, induced cell death in HT-29 cells primarily through the apoptotic pathway, causing mitochondrial membrane depolarization, caspase overexpression, and morphological changes such as rounding and cell contraction. The toxicity of optimized peptides **3**, **19**, LfcinB (21-25)_{Pal}, and LfcinB (21-25)_{Pal2} was evaluated in *Galleria mellonella*, finding lethal doses (LD₅₀) >100mg/kg. Moreover, peptide **19** toxicity was assessed in CD1 mice through the Irwin test, revealing central nervous system effects with LD₅₀ between 70mg/kg and 140mg/kg. Lastly, the zebrafish model determined the CL₅₀ of this optimized peptide to be between 20-25 µg/mL. It was also found that this optimized peptide exhibited lower *in vivo* toxicity than the sequence-derived peptide (hit). Based on the results, eight optimized peptides were identified, with peptides **3**, **19**, and LfcinB (21-25)_{Pal} standing out as candidates for further studies in developing treatments for colon cancer.

Keywords: Peptides, bovine lactoferricin, hit peptide, optimized peptide, colon cancer, toxicity, apoptosis, anticancer activity.

Contenido

1	INTRODUCCIÓN.....	16
2	ASPECTOS TEÓRICOS.....	19
2.1	Cáncer de colon	19
2.2	Tratamiento.....	20
2.3	Subtipos moleculares de consenso (CMS) cáncer de colon	22
2.4	Características de las células de cáncer	24
2.5	Péptidos anticancerígenos.....	25
2.5.1	Inducción de muerte celular por péptidos anticancerígenos	26
2.5.2	Lactoferrina bovina	29
2.6	Lactoferrina bovina.....	30
2.6.1	Mecanismo de acción propuesto para la LfcinB.	31
2.7	Síntesis química de péptidos.....	32
2.7.1	Generalidades de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS).....	33
2.8	Optimización de péptidos anticancerígenos	37
2.8.1	Estudios preclínicos de toxicidad.....	42
2.9	Líneas celulares utilizadas en este estudio.....	43
2.10	Péptidos anticancerígenos de partida utilizados en este estudio.....	44
3	JUSTIFICACIÓN	46
4	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	47
5	HIPÓTESIS	48
6	OBJETIVOS.....	49
6.1	Objetivo general.....	49
6.2	Objetivos específicos	49
7	METODOLOGÍA	50
7.1	Diseño experimental	50
7.2	Síntesis de péptidos en fase sólida.....	53
7.3	Purificación de los péptidos	54
7.4	Caracterización de los péptidos	55
7.5	Cultivo celular.....	56
7.5.1	Descongelamiento de células	56
7.5.2	Subcultivo celular.....	56
7.5.3	Ensayo de viabilidad celular	57
7.5.4	Microscopía de contraste de fases.....	57
7.6	Citometría de flujo	57
7.6.1	Determinación del tipo de muerte celular apoptosis/necrosis.....	57
7.6.2	Determinación de la despolarización de la membrana mitocondrial	58
7.6.3	Determinación de multicaspasas (caspasas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9).....	59
7.7	Estudios de toxicidad en larvas de <i>Galleria mellonella</i>	59

7.8	Prueba de Irwin	59
7.9	Modelo de toxicidad en pez cebra (<i>Danio rerio</i>).....	60
7.10	Análisis estadístico	60
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
8.1	Etapa 1: Elección de péptidos hit.....	62
8.2	Etapa 2: Síntesis de la librería peptídica	77
8.2.1	Obtención de la librería del péptido hit LfcinB (21-25) _{Pal}	77
8.2.2	Obtención de la librería del péptido hit ²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	86
8.2.3	Viabilidad sintética de los péptidos.....	87
8.3	Etapa 3: Actividad <i>in vitro</i>	96
8.3.1	Péptidos de la librería derivada del péptido hit LfcinB (21-25) _{Pal}	96
8.3.2	Librería derivada del péptido hit ²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	109
8.4	Etapa 4 : Evaluación de la actividad citotóxica en función del tiempo.	115
8.5	Etapa 5: Tipo de muerte celular	125
8.6	Etapa 6: Ensayos <i>in vivo</i>	133
8.6.1	Toxicidad aguda de los péptidos evaluada mediante el modelo de <i>Galleria mellonella</i>	133
8.6.2	Prueba de Irwin: evaluación preliminar de la toxicidad de los péptidos en ratones.	136
8.6.3	Evaluación de toxicidad en el modelo de pez cebra.....	139
9	CONCLUSIONES.....	144
10	ANEXOS	147
10.1	Anexo 1: Caracterización de los péptidos.....	147
10.2	Anexo 2: Productos académicos	181
10.2.1	Artículos:	181
10.2.2	Congresos	181
10.2.3	Pasantías	182
11	REFERENCIAS	183

Lista de figuras

Figura 1. Esquema que ejemplifica la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS).....	34
Figura 2: Mecanismo de reacción de la activación del grupo carboxilo del aminoácido usando DIC y HOBt.....	35
Figura 3: Reacción entre la ninhidrina y una amina primaria para la formación del púrpura de Ruhemann.....	36
Figura 4: Diseño experimental desarrollado.....	50
Figura 5: Esquema general del proceso de síntesis del péptido (H ₂ N-R-Orn-WQWRFKKLG) ₂ K-Ahx-CONH ₂	54
Figura 6: Representación de los péptidos monomérico, dimérico y tetramérico que contienen el motivo mínimo RRWQWR.....	63
Figura 7: Perfiles cromatográficos y espectros de masas de los péptidos ²⁶ [F] LfcinB (20-30) ₂ y LfcinB(21-25) _{Pal}	64
Figura 8: Efecto citotóxico de los péptidos en la línea celular HT-29.....	67
Figura 9: Efecto citotóxico de los péptidos en las células no cancerosas (fibroblastos y HEK-293).....	70
Figura 10: Efecto citotóxico de los péptidos LfcinB (21-25) _{Pal} y ²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂ en las líneas celulares de cáncer de colon (Caco-2, HT-29 y HCT-116).....	74
Figura 11: Micrografía de células de cáncer de colon (HT-29, HCT-116, Caco-2) y células control (HEK-293 y fibroblastos normales) tratadas con los péptidos hit (200 µg/mL).....	75
Figura 12: Etapa 1: Elección de péptidos Hit.....	76
Figura 13: Ejemplificación del proceso de síntesis simultánea de los péptidos 1 (H ₂ N-Orn-WQWRWQWR-CONH ₂), 2 (H ₂ N-RWQW-Orn-WQWR-CONH ₂), 4 (H ₂ N- ^d RWQWRWQWR-CONH ₂), 5 (H ₂ N- ^d RWQW-Orn-WQWR-CONH ₂) y el péptido LfcinB (21-25) _{Pal}	78
Figura 14: Perfiles cromatográficos de los péptidos puros 3 (H ₂ N-RWQWRWQW-Orn-CONH ₂) y 6 (H ₂ N- ^d RWQWRWQW-Orn-CONH ₂).....	80
Figura 15: Número de ciclos de reacción requeridos para incorporar el Fmoc-aminoácido a la cadena peptídica creciente unida a la resina para los péptidos LfcinB (21-25) _{Pal} , 3 (H ₂ N-RWQWRWQW-Orn-CONH ₂) y 6 (H ₂ N- ^d RWQWRWQW-Orn-CONH ₂).....	81
Figura 16: Moléculas unidas al extremo N-terminal del péptido LfcinB (21-25) _{Pal} , la estructura corresponde a la molécula utilizada en síntesis.....	82
Figura 17: Perfiles cromatográficos de los péptidos puros 7 (H ₂ N-Ahx-RWQWRWQWR-CONH ₂), 8 (Biotina-Ahx-RWQWRWQWR-CONH ₂), 10 (Pam-RWQWRWQWR-CONH ₂) y 11 (miniPEG-RWQWRWQWR-CONH ₂).....	83
Figura 18: Perfiles cromatográficos de los péptidos diméricos LfcinB (21-25) _{Pal2} ((H ₂ N-RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂)y 13 ((H ₂ N-Ahx-RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂).....	85
Figura 19: Esquema del proceso de la síntesis simultánea de los péptidos 20 , 24 , 25 y ²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂ , utilizando la SPPS-Fmoc/tBu.....	86
Figura 20: Correlación entre la matriz interna y SAScore.....	94
Figura 21: Etapa 2: Síntesis de la librería peptídica.....	95
Figura 22: Efecto citotóxico de los péptidos LfcinB (21-25) _{Pal} y 3 en células HT-29 y Caco-2.....	99
Figura 23: Efecto citotóxico de los péptidos LfcinB (21-25) _{Pal} y el péptido 7 en las líneas HT-29 y Caco-2.....	102
Figura 24: Micrografía de células de cáncer de colon HT-29 y Caco-2 tratadas con péptidos a la concentración máxima de péptido (200 µg/ml) por 2h.....	104

Figura 25: Actividad hemolítica de los péptidos LfcinB (21-25) _{Pal} , 3 y 7 .	105
Figura 26: Efecto citotóxico de los péptidos LfcinB (21-25) _{Pal} , 3 y 7 en células no cancerosas.	107
Figura 27: Efecto citotóxico de los péptidos ²⁶ [F]LfcinB (20-30) ₂ , 18 ((Orn-RWQWRFKKL) ₂ -K-Ahx), 19 ((R-Orn-WQWRFKKL) ₂ -K-Ahx) y 20 ((RRWQW-Orn-FKKL) ₂ -K-Ahx).	111
Figura 28: Efecto citotóxico de los péptidos LfcinB (21-25) _{Pal2} , 24 ((Ahx-RRWQWRFKKL) ₂ -K-Ahx), 25 ((Biotina-Ahx-RRWQWRFKKL) ₂ -K-Ahx) y 26 ((Ac-Ahx-RRWQWRFKKL) ₂ -K-Ahx) en la línea celular HT-29.	112
Figura 29: Etapa 3: Evaluación de la actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de colon.	114
Figura 30: Crecimiento de las células HT-29 en función del tiempo.	115
Figura 31: Efecto citotóxico en el tiempo de los péptidos optimizados frente a la línea celular HT-29.	116
Figura 32: Efecto citotóxico en el tiempo del péptido 3 frente a la línea celular Caco-2.	117
Figura 33: Efecto citotóxico ante el re-tratamiento del péptido 3 en células HT-29.	119
Figura 34: Efecto citotóxico del péptido 3 en células HT-29 ante el cambio a medio suplementado	120
Figura 35: Viabilidad celular las células HT-29 tratadas con los lotes 01 y 02 de los péptidos 3 y 19 .	122
Figura 36: Etapa 4: Evaluación de la actividad citotóxica en función del tiempo y del tratamiento.	124
Figura 37: Micrografía de células de cáncer de colon HT-29 y Caco-2 tratadas durante dos horas con los péptidos a la concentración máxima (200 µg/ml) utilizando una cámara AxioCam ICc1.	125
Figura 38: Evaluación de la apoptosis en la línea celular HT-29 utilizando Muse™ Anexina V para los péptidos LfcinB (21-25) _{Pal} , 3 y 19 .	126
Figura 39: Efecto de los péptidos LfcinB (21-25) _{Pal} , 3 y 19 sobre multicaspasas en células HT-29.	128
Figura 40: Evaluación del efecto sobre el potencial de la membrana mitocondrial tras el tratamiento sobre la línea HT-29 utilizando el kit de ensayo Muse MitoPotential.	129
Figura 41: Evaluación de la apoptosis en la línea celular Caco-2 utilizando tinción con Anexina V y 7AAD para el péptido LfcinB (21-25) _{Pal} , ²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂ y el péptido 23 .	130
Figura 42: Evaluación de la despolarización de membrana en presencia del fluoróforo JC-1 en la línea celular Caco-2 para el péptido ²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂ .	131
Figura 43: Etapa 5: Estudio del tipo de muerte celular.	132
Figura 44: Fotografía de larvas de Galleria mellonella utilizadas en este estudio.	133
Figura 45: Curva dosis-respuesta para la prueba de toxicidad aguda de cisplatino en Galleria mellonella.	134
Figura 46: Evaluación de la toxicidad aguda de los péptidos en Galleria mellonella.	135
Figura 47: Resultados después de la inyección i.p del péptido 19 para ambos grupos de ratones macho CD-1.	137
Figura 48: Cambios morfológicos de larvas de paz cebra ante el tratamiento con el péptido 19 .	141
Figura 49: Comparación de la supervivencia encontrada a diferentes concentraciones para el péptido ²⁶ [F] LfcinB (20-30) ₂ y el péptido 19 .	142
Figura 50: Etapa 6: Ensayos de toxicidad In vivo.	143
Figura 51: Conclusiones del trabajo.	146

Lista de tablas

Tabla 1: Subtipos moleculares de consenso de cáncer colorrectal (CMS).....	23
Tabla 2: Efecto citotóxico (IC ₅₀) de péptidos derivados de LfcinB sobre líneas celulares de cáncer de mama	45
Tabla 3: Caracterización de los péptidos obtenidos en la etapa 1.	63
Tabla 5: Efecto citotóxico in vitro de los péptidos sobre las líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y Caco-2	66
Tabla 6: Efecto citotóxico de los péptidos sobre las líneas celulares no cancerosas fibroblastos y HEK-293	69
Tabla 7: Índice de selectividad para los péptidos derivados de la LfcinB.	71
Tabla 8: Efecto citotóxico de los péptidos hit en la línea celular derivada de cáncer de colon HCT 116.....	73
Tabla 9: Caracterización de las librerías de los péptidos hit LfcinB (21-25) _{Pal} y LfcinB (20-25). ..	77
Tabla 10: Caracterización de la librería del péptido hit ²⁶ [F] LfcinB(20-30) ₂	87
Tabla 11: Parámetros evaluados para la determinación de la viabilidad sintética experimental.	90
Tabla 12: Ejemplo de la determinación de la puntuación de la viabilidad sintética experimental para el péptido optimizado 19	91
Tabla 13: Valores de viabilidad sintética determinados mediante la matriz experimental y la plataforma ADMETLab.	92
Tabla 14: Actividad citotóxica de la librería del péptido LfcinB(21-25) _{Pal} contra las líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y Caco-2.....	97
Tabla 15: Efecto hemolítico de los péptidos LfcinB (21-25) _{Pal} , 3 y 7	105
Tabla 16: Índice de selectividad y efecto citotóxico de los péptidos en células HEK-293 y fibroblastos.	106
Tabla 17: Efecto citotóxico de péptidos diméricos en la línea celular de cáncer de colon HT-29.	108
Tabla 18: Efecto hemolítico, efecto citotóxico de los péptidos diméricos contra fibroblastos, e índice de selectividad	108
Tabla 19: Efecto citotóxico de péptidos con la secuencia RRWQWR en la línea celular de cáncer de colon HT-29.	108
Tabla 20: Efecto citotóxico de los péptidos diméricos de la librería de la secuencia ²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂ en líneas celulares de cáncer de colon.	110
Tabla 21: Actividad hemolítica, efecto citotóxico contra células HEK-293 y fibroblastos e índice de selectividad de los péptidos diméricos de la librería ²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	113
Tabla 22: Actividad citotóxica de péptidos contra la línea celular HT-29 a diferentes tiempos de determinación.	115
Tabla 23: Efecto citotóxico del péptido 3 en la línea celular Caco-2 a diferentes tiempos de tratamiento.....	117
Tabla 24: Actividad citotóxica del péptido 3 en la línea celular HT-29 en función del tiempo del segundo tratamiento.	118
Tabla 25: Actividad citotóxica del péptido 3 contra la línea celular HT-29 ante el cambio a medio suplementado (2h).....	119
Tabla 26: Actividad citotóxica de péptidos contra la línea celular DU-145.	121
Tabla 27: Actividad citotóxica de péptidos contra la línea celular MCF-7 y HeLa.....	123
Tabla 28: Clasificación de toxicidad aguda según Loomis & Hayes.	134

Tabla 29: Supervivencia a los 10 días para el ensayo de toxicidad aguda en <i>Galleria mellonella</i> a una dosis de 100mg/Kg.	135
Tabla 30: Resultados para la prueba de Irwin. La gráfica representa el número de ratones a los que se les administró el péptido 19 a una dosis de 70mg/Kg (grupo 1; n=3) o 140mg/Kg (grupo 2; n=3).	137
Tabla 31: Supervivencia final a los ocho días de la administración intraperitoneal de las moléculas.	139
Tabla 32: Concentraciones utilizadas para la evaluación de supervivencia de larvas de pez cebra (<i>Danio rerio</i>) ante la administración del péptido 19.	140
Tabla 33: Comparación de la supervivencia encontrada a diferentes concentraciones para el péptido ²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂ y el péptido 19	141

Lista de símbolos y abreviaturas

Término	Abreviatura/Sigla
Acetonitrilo	ACN
Ácido 6-aminohexanoico	Ahx
Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido fórmico	AF
Ácido mirístico	Amy
Ácido palmítico	Pam
Ácido ribonucleico	ARN
Ácido trifluoroacético	TFA
Alanina	Ala/A
American Type Culture Collection	ATCC
Arginina	Arg/R
Bromuro de 3-(3,4 -dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio	MTT
Cisteína	Cys/C
Cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo	Fmoc
Concentración inhibitoria 50	IC ₅₀
Concentración letal 50	CL ₅₀
Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa	RP-HPLC
Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia en fase reversa acoplada a espectrometría de masas con ionización por electrospray y analizador de cuadrupolo- tiempo de vuelo.	RP-UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS
Diciclohexilcarbodiimida	DCC
Diclorometano	DCM
Diisopropiletilamina	DIPEA
Dimetilsulfóxido	DMSO
Dosis letal 50	DL ₅₀
Especies reactivas de oxígeno	ROS
Espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo	Maldi-Tof
Etanoditiol	EDT
Extracción en Fase Solida en Fase Reversa	RP-SPE
Fenilalanina	Phe/F
Glutamina	Gln/Q
Histidina	His/H
Índice de selectividad	IS
Isoleucina	Ile/I
Lactoferricina Bovina	LfcinB
Lactoferrina	LF
Lactoferrina Bovina	LFB
Leucina	Leu/L
Lisina	Lys/K
Muerte celular inmunogénica	ICD
N,N'-diisopropilcarbodiimida	DIC
N,N-Dimetil formamida	DMF
N-metil pirrolidona	NMP
Ornitina	Orn
Péptidos anticancerígenos	PACs
Péptidos antimicrobianos	PAMs
Polietilenglicol	PEG

Síntesis de péptidos en fase sólida	SPPS
Subtipos moleculares de consenso	CMS
Tetrafluoroborato de 2- (1H-benzotriazol-1-il) -1,1,3,3-tetrametilaminio	HOBt
Triisopropilsilano	TIPS
Triptófano	Trp/W
Valina	Val/V
Virus del papiloma humano	VPH

1 Introducción

El cáncer se define como un grupo de enfermedades que se caracterizan por la proliferación indiscriminada de células anormales que forman tumores y tienen la capacidad de diseminarse a otros órganos¹. El cáncer es un problema de salud pública, ya que su morbilidad aumenta anualmente y es una de las principales causas de muerte en el mundo. El cáncer colorrectal en el 2022 fue la segunda causa de muerte combinada para hombres y mujeres en Estados Unidos, encontrándose un aumento progresivo en la incidencia para personas menores de 50 años^{2,3}. En Colombia en las cifras de mortalidad de cáncer para el 2022, el cáncer de colon ocupó la segunda y cuarta posición para hombres y mujeres respectivamente⁴, resaltando así su importancia epidemiológica.

Los tratamientos para este cáncer generalmente conducen a la resección quirúrgica de los tumores⁵, que en los estadios más avanzados puede ser combinada con terapia adyuvante^{6,7}, la cual presenta efectos adversos significativos, que pueden ir desde náuseas, mareo, diarrea, vómito hasta neurotoxicidad irreversible⁸. La intervención quirúrgica se asocia con la fuga anastomótica, la recurrencia tumoral^{9,10}, y pueden derivar en colostomías con altos impactos emocionales y sociales, que afectan la recuperación del paciente causando mortalidad temprana^{11,12}. La recurrencia y la alta mortalidad de este tipo de cáncer hacen necesario el desarrollo de nuevas terapias que utilicen fármacos selectivos, que no sean invasivas, generen baja afectación en la calidad de vida del paciente y que sean accesibles a toda la población.

En la búsqueda de nuevos tratamientos, se han estudiado diferentes tipos de moléculas como los péptidos anticancerígenos (PACs) los cuales han mostrado ser selectivos, eficaces, presentan baja probabilidad de generar resistencia, diversidad biológica y química, facilidad de síntesis, entre otras¹³⁻¹⁵. Sin embargo, antes de llegar al mercado deben superarse desventajas propias de los péptidos, como lo son la inestabilidad, susceptibilidad a la degradación proteolítica, baja biodisponibilidad oral, altos costos de manufactura y en algunos casos baja solubilidad¹⁵. Por este motivo, se han desarrollado diferentes estrategias para la optimización que son propias del desarrollo de fármacos, realizando modificaciones químicas, utilizando sistemas de entrega, procesos de obtención mejorados, etc. Ejemplos

exitosos de estas aproximaciones son péptidos que están involucrados en ensayos preclínicos o clínicos, como lo son los péptidos LTX-315, WT2725, ITK-1, entre otros¹⁶.

Dentro de los PACs más estudiados se encuentra la Lactoferrina Bovina (LfcinB); un péptido de 25 residuos (¹⁷FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF⁴¹) derivado de la Lactoferrina bovina (LFB), la cual posee actividad antibacteriana, antifúngica y anticancerígena¹⁷. La LfcinB ha presentado actividad antineoplásica contra cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, entre otros^{18,19}. A partir de la LfcinB se han diseñado secuencias cortas que contienen el motivo mínimo de actividad (RRWQWR) y que poseen actividad biológica de interés, dentro de los cuales resaltan los péptidos LfcinB (20-25): H₂N-RRWQWR-CONH₂, LfcinB (20-30)₂: (H₂N-RRWQWRMKKLG)₂K-Ahx-CONH₂²⁰, LfcinB (20-25)₄: (H₂N-RRWQWR)₄K₂-Ahx₂-C₂, LfcinB (20-25)₂: (H₂N-RRWQWR)₂K-Ahx-CONH₂, el péptido palindrómico LfcinB (21-25)_{Pal}: H₂N-RWQWRWQWR-CONH₂ y su respectivo dímero LfcinB (21-25)_{Pal2}: (H₂N-RWQWRWQWR)₂K-Ahx-CONH₂²¹⁻²³. Estos péptidos han presentado efecto citotóxico contra líneas celulares derivadas de cáncer de mama MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MCF-7, efecto que se ejerce en menos de dos horas, que es selectivo, dependiente de la concentración y que se mantiene hasta por 48 horas después del tratamiento, adicionalmente se ha descrito que la acción de estas moléculas está mediada por procesos apoptóticos^{20-22,24}. De la misma forma, algunos de estos péptidos tienen citotoxicidad frente a cáncer oral²⁵.

En este trabajo se seleccionaron péptidos derivados de LfcinB que previamente presentaron actividad citotóxica en otros tipos de cáncer y se estableció cuál o cuáles péptidos presentaron efecto citotóxico *in vitro* significativo y selectivo contra líneas celulares cancerosas derivadas de cáncer de colon. Los péptidos con los mejores resultados fueron definidos como moléculas hit a partir de las cuales se desarrollaron librerías de péptidos modificados a los cuales se les evaluó su actividad citotóxica contra las células cancerosas y no cancerosas. Los péptidos que presentaron el mayor efecto citotóxico selectivo contra las líneas celulares HT-29 y Caco-2 se clasificaron como moléculas promisorias (péptidos optimizados) y a algunos de estos se les determinó mediante citometría de flujo el tipo de muerte celular asociado a su

citotoxicidad. Por último, a una molécula optimizada se le determinó su toxicidad *in vivo* en el modelo de *Galleria mellonella*, en la prueba de Irwin en ratones CD-1 y en larvas de pez cebra.

Las librerías se generaron tomando las secuencias de las moléculas hit realizando las siguientes modificaciones químicas: (i) sustitución del L-aminoácido del extremo N-terminal por su respectivo D-aminoácido (ii) cambio secuencial de cada residuo de Arg por Orn, iii) N-acetilación, (iv) incorporación de la biotina en el extremo N- terminal, entre otras.

Este trabajo se enmarca en el proyecto titulado: “*Obtención de un prototipo peptídico promisorio para el desarrollo de un medicamento de amplio espectro para el tratamiento del cáncer de colon, cuello uterino y próstata*”, el cual es financiado por MinCiencias, código 110184466986, contrato 845-2019.

2 Aspectos teóricos

2.1 Cáncer de colon

En el 2020 se reportó que el cáncer colorrectal (CRC) es el cuarto cáncer con mayor incidencia y el tercero con mayor mortalidad en el mundo para ambos sexos, justo detrás del cáncer de seno, próstata y pulmón²⁶. En Colombia ocupó la cuarta y tercera posición en incidencia para hombres y mujeres respectivamente²⁷. En el mundo, la incidencia del CRC es aproximadamente tres veces mayor en países en vía de desarrollo, así como es más prevalente en hombres que en mujeres. El CRC abarca el cáncer de colon y al cáncer de recto, que se definen como un grupo heterogéneo de neoplasias desarrolladas en la zona colorrectal, en donde el cáncer de colon presenta el doble de la incidencia que el cáncer de recto^{28,29}.

El cáncer de colon se desarrolla a través de los años en una secuencia adenoma- carcinoma; proceso que inicia con la mutación del gen APC en las células madre intestinales y que lleva a la formación de criptas displásicas y del adenoma, que afecta principalmente a la vía de señalización Wnt/ β -catenina. Posteriormente se da la aparición de mutaciones (mínimo de 4 o 5 mutaciones) en algunos genes como: KRAS, NRAS, TP53, GNAS, AKT1 y SOX9, causando el desarrollo tumoral y posteriormente el desarrollo del carcinoma metastásico con tropismo principalmente por hígado y pulmón²⁹⁻³¹. De igual forma, se ha observado que la oncogénesis del cáncer de colon varía según el lugar del tumor primario, subdividiéndose en cáncer de colon proximal o de lado derecho (ciego, colon ascendente y transversal) y distal o izquierdo (colon descendente y sigmoideo). El cáncer de colon derecho se relaciona con mayor riesgo de metástasis sistémicas y el izquierdo con mayor supervivencia y respuesta al tratamiento^{29,32}.

Los factores de riesgo para desarrollar cáncer colorrectal son: la edad avanzada, ya que la incidencia de tener pólipos adenomatosos es mayor o igual al 40% en personas mayores de 60 años, la dieta (alimentación alta en grasa, elevado consumo de alcohol y carnes rojas), la obesidad, el consumo de tabaco y el sedentarismo^{28,33}, haber padecido de enfermedades intestinales inflamatorias como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn^{34,35}. Además, se ha reportado que el 7-10% de los casos tienen un origen hereditario³³. Teniendo en cuenta los

factores de riesgo, se recomiendan medidas de prevención primaria como la modificación de los hábitos de vida y de prevención secundaria, con la tamización a poblaciones de riesgo³⁵. Asimismo, la detección temprana se asocia con mayor supervivencia y en Colombia se busca realizar tamización (sangre oculta en heces y colonoscopia) a personas mayores de 50 años, lo cual se enmarca en el plan decenal para el control del cáncer en Colombia 2012-2021²⁷.

2.2 Tratamiento

La primera aproximación para el tratamiento del cáncer de colon consiste en la resección quirúrgica, ampliamente utilizada en los estadios iniciales de la enfermedad, en donde se asocia con alta supervivencia, sin embargo, el éxito de este tratamiento depende del diagnóstico temprano^{6,7}. Por otra parte, la cirugía es un procedimiento altamente invasivo que puede causar que las funciones gastrointestinales se deterioren y, por ende, se genere un cambio en la nutrición del paciente³⁶. Para para el año 2012 en Estados Unidos, 1 de cada 8 pacientes se les realizó la colostomía³⁷, causando un alto impacto socioeconómico y este procedimiento además genera en el paciente: depresión, ansiedad, problemas en su vida sexual, aislamiento social, angustia, trastorno de la imagen corporal, sentimiento de inutilidad e incapacidad crónica, así como complicaciones posteriores asociadas al manejo de la ostomía y cambios en la alimentación^{12,38-40}. Por otra parte, se ha reportado rechazo a la cirugía, lo que se ha asociado a diversos factores demográficos, como la edad, la raza, el sexo y el nivel socioeconómico. Esto genera un impacto negativo en la supervivencia y plantea la necesidad de desarrollar terapias con mayor efectividad y que sean menos invasivas⁴¹.

En los estadios más avanzados se hace uso de una terapia farmacológica de carácter neoadyuvante (antes de la cirugía) o adyuvante (posterior a esta). La quimioterapia se define según el estadio y las características del tumor, siendo la más utilizada 5-fluorouracilo o capecitabina oral y en los casos más avanzados se utiliza el esquema de tratamiento FOLFOX (ácido folínico, 5-fluorouracilo, oxaliplatino), FOLFIRI (ácido folínico, 5-fluorouracilo, irinotecan), XELOX (capecitabina, oxaliplatino) o combinaciones con medicamentos

biológicos como bevacizumab, cetuximab o pembrolizumab^{7,42}. Sin embargo, estos tratamientos poseen altos efectos adversos asociados a su baja selectividad; como lo son las parestesias, neutropenia, trombocitopenia, diarrea, vómito, entre otras⁴³, e incluso el oxaliplatino se asocia con neuropatía llevando a la interrupción del tratamiento⁴⁴.

En cuanto al mecanismo de acción de estos fármacos, el 5-fluorouracilo es un anti-metabolito tipo fluoropirimidina que actúa uniéndose irreversiblemente a la timidato sintasa (TS), afectando así la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) y del ácido ribonucleico (ARN) y suele conjugarse con ácido folínico para aumentar su efecto al favorecer la unión a TS. La combinación de 5FU en regímenes como FOLFOX o FOLFIRI aumenta la respuesta de los pacientes con estadios avanzados en hasta 50%⁴⁵, sin embargo, debido a sus efectos adversos, se realizó un estudio de su profármaco, la capecitabina, el cual es activado por la timidina fosforilasa, enzima expresada en mayor medida en algunos tumores⁴⁶. El oxaliplatino genera daño directo en el ADN, causado principalmente por entrecruzamiento al unirse a la guanina y/o adenina⁴⁷, y el irinotecan es un inhibidor de la topoisomerasa I, lo que causa la detención de la horquilla de replicación y la muerte celular⁴⁸.

Se han incluido tratamientos con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), con efecto sobre la angiogénesis para limitar el suministro de sangre al tumor. También se utiliza el bevacizumab, inhibidor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que disminuye el crecimiento del tumor y aumenta la apoptosis, proceso mediado por bloqueo de quinasas, como el cetuximab o anticuerpo monoclonales dirigidos contra PD-1 como el pembrolizumab⁴⁹⁻⁵². El cetuximab se recomienda para cáncer de colon metastásico KRAS nativo, mientras que el pembrolizumab aún no hace parte de la guía de práctica clínica para el tratamiento de cáncer de colon en Colombia⁶.

Lastimosamente, estos tratamientos no son efectivos en todos los casos⁷ y representan altos costos, por ejemplo, el bevacizumab, en un esquema de tratamiento de 3-4 semanas cuesta 90.000 dólares, afectando al sistema de salud y ejemplifica la llamada “*toxicidad financiera*”

de los tratamientos biológicos contra el cáncer⁵³⁻⁵⁵. En Colombia el bevacizumab se recomienda para cáncer de colon y recto metastásico como una aproximación efectiva⁶.

2.3 Subtipos moleculares de consenso (CMS) cáncer de colon

Con el fin de analizar el comportamiento genómico del cáncer colorrectal, el consorcio de subtipificación (Colorectal Cancer Subtyping Consortium -CRCSC) determinó cuatro subtipos de estratificación molecular (**Tabla 1**), que representan el comportamiento biológico de gran parte de los tumores de CRC y se han correlacionado con el resultado clínico de la enfermedad. Dicha clasificación es producto del estudio de más de 4000 muestras de tumores y contempla aproximadamente el 87% de los tumores evaluados, mientras que el restante son de muestras que poseen firmas de expresión genética heterogéneas. Igualmente, algunas de las líneas celulares de cáncer de colon se han estudiado y relacionado a los subtipos (CMS), siendo una herramienta de utilidad para el descubrimiento de fármacos, sin embargo, no todas las líneas celulares que se utilizan en investigación hacen parte de esta clasificación, debido a que poseen características heterogéneas, tal es el caso de la línea celular Caco-2 y HT-29⁵⁶⁻⁵⁹.

Subtipo de clasificación		Características	Frecuencia	Líneas celulares
CMS ₁	Subtipo con inestabilidad del microsatélite	Presenta hipermutación y mayor número de infiltrados de células inmune, generalmente se asocia a tumores de lado derecho en mujeres	14%	CW2, HT115, SNU1040, HCT15, SW48, HCT116, RKO, SNUC2A
CMS ₂	Subtipo canónico	Posee características epiteliales y presenta activación de las vías de señalización WNT y MYC. Se presenta principalmente en tumores del lado izquierdo.	37%	SW480, SW403, LS1034, SW620, SW1417
CMS ₃	Subtipo con desregulación metabólica	Se caracteriza por una desregulación metabólica asociada a procesos de oxidación de carbohidratos y ácidos grasos. Tiende a presentarse en el colon sigmoide y recto	13%	SW948, CL14, SNU1197, RCM1, NCIH508, CL40, T84, SKCO1
CMS ₄	Subtipo mesenquimal	Se evidencia regulación al alza de las vías de transición epitelial-mesenquimal (EMT), activación del factor de crecimiento β , regulación inmune, invasión del estroma y angiogénesis. CMS ₄ está relacionado con tumores estratificados en los estadios más avanzados y tiende a presentarse en el colon distal.	23%	OUMS23, SNU503, NCIH716

Tabla 1: Subtipos moleculares de consenso de cáncer colorrectal (CMS)⁵⁶⁻⁶⁰.

2.4 Características de las células de cáncer

Las células tumorales desarrollan procesos para sostener la división celular exacerbada, la formación tumoral y la metástasis, los cuales son la inmortalidad replicativa, la inestabilidad del genoma, la evasión de señales supresoras de crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la proliferación sostenida, el metabolismo alterado, la evasión de la destrucción inmune, la promoción de la inflamación y la angiogénesis^{61,62}.

Dentro de estos procesos la membrana celular es modificada con el fin de favorecer dicha malignidad. Las células tumorales con alta capacidad metastásica poseen mayor fluidez membranal, la cual se relaciona con una menor relación colesterol/fosfolípidos, en donde se aumenta el contenido de fosfolípidos insaturados al favorecer la deformabilidad de las células tumorales^{63,64}. Adicionalmente, la superficie de las células cancerosas se encuentra cargada negativamente debido a la pérdida de la distribución asimétrica de los fosfolípidos, específicamente se presenta la exposición de fosfatidilserina en la parte externa de la membrana celular^{63,65}. De igual forma, las células cancerosas poseen mayor expresión de microvellosidades, que aumentan el área superficial y a su vez, se relacionan con mayor agresividad y capacidad de metástasis^{66,67}. Se ha reportado que el contenido lipídico no solo se diferencia entre células normales y cancerosas, sino también entre los cánceres entre si y el estadio de desarrollo del cáncer⁶⁸. También se presentan diferencias en el potencial de membrana, en las células de cáncer se da un potencial de membrana despolarizado, menos negativo si se compara con las células normales, lo que indica que hay una carga relativa más positiva al interior de la célula, fenómeno que promueve la proliferación de las células madre de cáncer⁶⁹.

De igual forma, las células de cáncer presentan cambios morfológicos en comparación con las células normales, dentro de los cuales se incluyen: el agrandamiento nuclear, que a su vez posee una forma irregular y cambios en la distribución de la cromatina siendo esta una de las principales modificaciones. Igualmente, estas poseen un citoplasma escaso y vacuolado⁷⁰⁻⁷².

2.5 Péptidos anticancerígenos

Los péptidos anticancerígenos (PACs) provienen de los péptidos antimicrobianos (PAMs), ya que muchos de estos presentan actividad dual⁷³. Los PACs son péptidos catiónicos de cadena corta (de 10 a 60 residuos), que contienen principalmente residuos catiónicos e hidrofóbicos⁶⁵. Los PACs se han identificado como parte del sistema inmune innato, son menos propensos a generar resistencia, presentan alta especificidad por células de cáncer y buena penetración tumoral. Algunos PACs tienen la capacidad de actuar sobre células tumorales metabólicamente activas, de lento crecimiento y sobre cánceres multi-drogo resistentes, así como algunos de ellos se han asociado con propiedades inmunomoduladoras, anti metastásicas y anti angiogénicas^{14,73,74}. Gracias a sus propiedades farmacológicas y su efecto sobre diferentes características del cáncer, algunos de estos péptidos se encuentran en estudios clínicos^{74,75}.

Los PACs pueden clasificarse según su mecanismo de acción, actuando de forma directa, indirecta, o como péptidos transportadores de fármacos⁷³. Aquellos péptidos que actúan de forma directa pueden generar poros, se internalizan o unen a receptores celulares, procesos que conllevan a la muerte celular. Por otra parte, otros péptidos pueden ejercer su efecto mediante estimulación inmune u hormonal⁶⁵. El mecanismo de acción de los PACs catiónicos se asocia a la interacción electrostática entre los residuos catiónicos (Arg) sobre la membrana celular de carácter negativo. Gracias a que las células cancerosas poseen alta fluidez en su membrana, se favorece la disrupción celular inducida por los residuos hidrofóbicos como el Triptófano (Trp) lo que permite la formación de poros en la membrana o la internalización del péptido⁶⁵. Este mecanismo de acción no depende de la velocidad de replicación de las células, debido a que su efecto principal no es afectar la replicación celular, como sí se da en la quimioterapia convencional, estos PACs actúan sobre cánceres de lento crecimiento⁷⁶. Se han desarrollado PACs, contra tumores sólidos como el péptido LTX-315 (Oncopore™): (KKWKKWDipK) y péptidos utilizados en tratamientos para cáncer dependiente de hormonas, como el leuprolide, la buserelina, la goserelina, que son análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH)⁷⁷.

Cabe aclarar que el auge de los péptidos en el mercado se ha visto limitado por algunas desventajas; como el alto costo de manufactura, la degradación proteolítica, la baja biodisponibilidad oral, baja solubilidad y permeabilidad a través de membranas biológicas entre otras. Para suplir algunas de estas limitaciones se han obtenido y evaluado péptidos modificados que contienen D-aminoácidos, aminoácidos no naturales, péptidos cíclicos, dendrímeros, moléculas polivalentes, quimeras, péptidomiméticos y péptidos funcionalizados con moléculas no proteicas, entre otros. De igual forma, la investigación en mejorar los procesos de síntesis de fármacos peptídicos es un campo en constante crecimiento⁷⁸⁻⁸¹.

2.5.1 Inducción de muerte celular por péptidos anticancerígenos

Los mecanismos de acción de los fármacos anticancerígenos son diversos, sin embargo, como proceso final, tienden a ocurrir procesos como la apoptosis y/o la necrosis, los cuales pueden superponerse o tener relaciones dependientes de la concentración del quimioterapéutico^{55,82,83}. La apoptosis es una forma de muerte celular regulada, asociada a cambios morfológicos y a la activación de diversas enzimas (caspasas) que conlleva a la muerte celular sin efectos sobre tejidos cercanos. Mientras que la necrosis representa un panorama contrario, al ser un tipo de muerte celular no controlada que conlleva a daño e inflamación, lo que en tratamientos farmacológicos se relaciona con un mayor perfil de efectos adversos. Así mismo, los tratamientos que involucran mecanismos apoptóticos se asocian con menor posibilidad de generar resistencia⁸²⁻⁸⁴.

Los péptidos anticancerígenos se describen como moléculas que generan principalmente efectos apoptóticos y/o necróticos, sin embargo, para algunos péptidos, aún no se conoce a profundidad cuál es el mecanismo de acción^{85,86}. Se ha reportado que cambios específicos en la secuencia de aminoácidos pueden generar modificaciones en el mecanismo de acción^{87,88}, como un ejemplo de interés, se mencionan las modificaciones propuestas por Zhou et al, en donde el cambio de un solo residuo (Lys/Leu) en un péptido de 16 residuos derivado de mauriporina generó diferentes mecanismos de acción, obteniendo un péptido lítico y otro

pro-apoptótico que se internalizaba mediante endocitosis⁸⁷. En este apartado se resumen algunos aspectos generales de los tipos de muerte celular:

- **Apoptosis:**

La apoptosis es una muerte celular programada, en donde la célula se condensa y disminuye su tamaño, posteriormente se fragmenta y genera vesículas (cuerpos apoptóticos) que son reconocidas para una posterior fagocitosis. La apoptosis puede desarrollarse mediante dos vías, la intrínseca y la extrínseca: La vía intrínseca o mitocondrial, que bajo estímulos específicos provoca la liberación del citocromo C de la mitocondria hacia el citoplasma, efecto mediado por las proteínas pro y anti apoptóticas. Luego el citocromo C se une a Apaf-1 y a la pro-caspasa-9 para formar el apoptosoma, luego se activa a la caspasa 9 que a su vez activa las caspasas ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7) y genera la apoptosis. Por otro lado, la apoptosis extrínseca está mediada por estímulos externos (ligandos) que activan los receptores de muerte como el receptor Fas, DR4/DR5 o los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R), lo que posteriormente favorece la dimerización del receptor y el reclutamiento de proteínas adaptadoras que favorecen la unión y activación de las caspasas 8 o 10, que a su vez activan a las caspasas ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7) y genera la apoptosis^{89,90}.

Se prefiere que los nuevos tratamientos estén asociados a la apoptosis y se han identificado diversos blancos terapéuticos que son reguladores de este proceso. Actualmente existe la base de datos en línea ApInAPDB (Apoptosis-Inducing Anticancer Peptides Database) que incluye reportes de 818 péptidos con efectos apoptóticos, la cual puede ser consultada en: <http://bioinf.modares.ac.ir/software/ApInAPDB/>⁹¹. Los PACs pueden diseñarse enfocados a promover interacciones proteína-proteína o ligando/receptor, como es el caso de los péptidos de unión a receptores de muerte, que buscan estimular la apoptosis extrínseca, como el péptido FRAP-4 (WEWT) que mimetiza al ligando Fas. Adicionalmente, pueden considerarse proteínas de la familia Bcl-2, las cuales poseen funciones pro o anti apoptóticas y que son claves en la apoptosis intrínseca. Dentro de estas se resaltan las proteínas pro apoptóticas que contienen el dominio BH3, para

el cual se han desarrollado péptidos miméticos de BH3, tales como el péptido TLS (TLSGAFELSRDK)⁹⁰.

Existen algunos péptidos desestabilizantes de membrana dentro de los que se encuentran algunos AMPs o péptidos líticos sintéticos. La disrupción de membrana puede darse en la membrana celular o en la membrana mitocondrial. Se ha reportado que el cambio en la permeabilidad se puede dar a partir de tres vías: la de la membrana mitocondrial externa (OMM), la de la membrana mitocondrial interna (IMM) y el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP), siendo activadores de la apoptosis intrínseca (defensinas o la magainina). Se han desarrollado diversos análogos de estos PAMs, como el péptido KLAK o el LTX 315 los cuales generan desestabilización en la membrana mitocondrial^{90,92}.

- **Necrosis:** La necrosis es un proceso de muerte celular sin control, que se caracteriza por una inflamación de los organelos subcelulares, la pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática y la activación de respuestas inmunitarias que son de interés en el tratamiento del cáncer ^{93,94}. Comparado con la apoptosis, el número de péptidos necróticos es menor, sin embargo, debido que es factible que se genere resistencia a los tratamientos con efecto apoptótico, este mecanismo es igualmente interesante. Se ha reportado que los péptidos PFR o p53(15)Ant causan muerte celular inducida por necrosis^{95,96}. De igual forma, algunos péptidos que ejercen actividad mitocondrial pueden también causar necrosis, como lo es el péptido TU17: MTD⁹⁴ o péptidos que penetran la célula como TAT, R8 o Pep 1 que al inicio pueden generar apoptosis y bajo el uso crónico pueden generar necrosis⁹⁷.
- **Péptidos inmunogénicos inductores de muerte celular:** Independientemente de si los péptidos inducen necrosis o apoptosis, se han reportado péptidos inducen muerte celular inmunogénica (ICD por sus siglas en inglés). La ICD es un tipo de muerte celular asociada a liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs por sus siglas en inglés). Los DAMPs ejercen un efecto inmunológico en el tumor, al favorecer la presentación antigénica por parte de las células dendríticas, lo que

contribuye a restaurar el reconocimiento inmunológico y la destrucción de las células tumorales^{98,99}. Este tipo de muerte celular se considera de interés debido a que puede evitar la recurrencia tumoral. El péptido LTX 315 activa marcadores ICD como ATP, HMGB1 o CALR mientras que el péptido ACPP con efecto sobre cáncer de colon que activa la liberación de CALR y HMGB1, otros ejemplos son los péptidos RT53 y RL22¹⁰⁰.

- **Autofagia:** La autofagia es un mecanismo catabólico de degradación que permite controlar la eliminación de proteínas y organelos dañados. En cáncer, la autofagia puede promover la supervivencia celular, especialmente en el desarrollo inicial del tumor y posteriormente puede favorecer la supervivencia¹⁰¹, motivo por el cual, es de interés el uso de péptidos con efecto sobre este proceso. Cabe aclarar, que la inducción de apoptosis por moléculas anticancerígenas tiende a inducir también autofagia¹⁰², lastimosamente, esta inducción de autofagia puede relacionarse con resistencia al tratamiento¹⁰³, por lo que su efecto final debe ser cuidadosamente estudiado. El péptido FK-16, un derivado de la catelicidina LL-37, ha demostrado aumentar la autofagia pro-muerte en células de cáncer de colon¹⁰⁴. Este mismo efecto fue encontrado para el péptido Tat-beclin1, diseñado a partir de una proteína involucrada en la autofagia¹⁰⁵, demostrando la versatilidad del diseño de péptidos y sus aplicaciones. De forma contraria, se ha reportado que la LfcinB en una línea celular de cáncer gástrico, es capaz de inducir apoptosis e inhibir la autofagia desde las 2 horas del tratamiento¹⁰⁶.

2.5.2 Lactoferrina bovina

La lactoferrina (LF) es una glicoproteína de la familia de las transferrinas, presente en la leche, saliva, lágrimas, fluido seminal y otras secreciones. La lactoferrina bovina (LFB) es de interés gracias a su actividad antimicrobiana, quimiopreventiva y antineoplásica^{107,108}. La LF es una proteína catiónica de 80kD, en su extremo N-terminal se encuentran dos péptidos

catiónicos la Lactoferricina (Lfcin) y la Lactoferrampina (Lfpm), los cuales poseen las actividades biológicas asociadas a la LF¹⁰⁸.

La LFB mostró actividad anticancerígena cuando se administró vía oral a ratas con estadios iniciales de cáncer de colon, esófago, pulmón o vejiga. Igualmente, la administración de LFB sobre ratones con xenoinjerto de la línea celular Colo-26 indujo una disminución de la metástasis a pulmón en un 43%¹⁰⁹. Ligo et al, determinaron que la ingestión de 3 g/día de LFB, durante un año en pacientes con pólipos colorrectales <5mm, disminuyó su crecimiento y se relacionó con una mayor actividad inmune¹¹⁰. Se ha sugerido que el mecanismo de acción mediante el cual actúa LF está asociado con la modulación del ciclo celular, la promoción de la apoptosis, la inmunomodulación, entre otros¹⁰⁸.

El efecto de la LFB sobre las enfermedades inflamatorias relacionadas como factores de riesgo de padecer cáncer de colon¹¹¹. La LFB puede promover la remisión de la enfermedad de Crohn¹¹² y se ha sugerido que la proteína e incluso, péptidos derivados de esta, ejercen un papel modulador sobre la barrera protectora del intestino, la cual se ve afectada en la inflamación¹¹². La LfcinB y péptidos derivados poseen mayor actividad citotóxica que la LFB, por lo cual el desarrollo de fármacos se enfoca en estas moléculas peptídicas¹¹³.

2.6 Lactoferricina bovina

La LfcinB es un péptido catiónico de 25 residuos que tiene un enlace disulfuro entre las cisteínas 3 y 20¹¹⁴ y tienen una carga neta de +8 debido a los residuos Arg y Lys¹¹⁵. La LfcinB posee actividad antibacteriana, antifúngica y anticancerígena en líneas celulares de cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, entre otros¹⁷⁻¹⁹. Adicionalmente, este péptido es más efectivo que la LFB, debido probablemente a cambios conformacionales, en donde la región de LFB que contiene la LfcinB tiene una estructura hélice alfa y la LfcinB como péptido libre posee una estructura de hoja beta antiparalela¹¹⁶. Se ha descrito que el hexapéptido 20-25 (RRWQWR) es el motivo mínimo de actividad antimicrobiana y anticancerígena¹¹⁷.

2.6.1 Mecanismo de acción propuesto para la LfcinB

El mecanismo de acción propuesto para este péptido en bacterias puede ser similar al de células cancerosas e indica que las cadenas laterales con carga positiva interactúan electrostáticamente con la superficie celular de naturaleza negativa. Luego, los residuos de triptófano interactúan con la bicapa lipídica de la membrana causando su disrupción y/o internalización^{85,115}. Estos procesos se ven favorecidos gracias a las características de las membranas cancerosas asociadas a malignidad, como lo son; alto contenido de ácidos grasos insaturados y expresión de ácidos grasos de carga negativa en su exterior, lo que permite un efecto selectivo sobre las células de cáncer⁶⁵. Luego, se da la internalización del péptido que conduce a procesos apoptóticos o necróticos, lo que depende de la línea de cáncer y las concentraciones a las cuales se evalúan los péptidos¹¹⁴. Bajo simulaciones de dinámica molecular se ha sugerido que la LfcinB en contacto con una membrana de palmitoil oleoilfosfatidil glicerol (POPG) o membranas de fosfatidilcolina (POPC) es capaz de crear enlaces iónicos. Las uniones del péptido a membranas de POPC son más débiles, siendo estas similares a las células normales, mientras que las interacciones con membranas aniónicas como POPG, POPG/POPC (similares a células de cáncer) son más fuertes¹¹⁸.

Las líneas celulares de cáncer de mama han mostrado diferente sensibilidad ante la LfcinB, siendo el efecto dependiente de la línea, en donde se ha reportado mayor potencia siguiendo el orden SKBR3>MDA-MB-231>MDA-MB-468>MCF7 y en todos los casos la LfcinB indujo apoptosis¹¹⁹. La LfcinB igualmente presentó actividad en un modelo *in vivo* de xenoinjerto de ratón con la línea MDA-MB-231¹¹⁹ y mostró efectos positivos *in vitro* para la terapia combinada de LfcinB y el tamoxifeno¹²⁰. Igualmente, en cáncer de próstata se evidenció el efecto sinérgico que la LfcinB posee con docetaxel¹²¹ y en la línea celular altamente metastásica PC3 actúa sobre la V-ATPasa plasmática¹²², siendo un posible blanco farmacológico.

Por otro lado, se ha reportado que la LfcinB induce apoptosis y aumenta la autofagia en la línea celular de cáncer gástrico AGS con un IC₅₀ de 64 µM, con un efecto encontrado desde

las 2 a las 6 horas de actividad, sin embargo, a 12 y 24 horas se encontró que la apoptosis era el mecanismo principal¹⁰⁶.

Se ha demostrado que en células Jurkat la LfcinB causó apoptosis mediante la vía intrínseca, generando especies reactivas de oxígeno (ROS) y en presencia de inhibidores de caspasas no ejerció efecto citotóxico¹⁸. En estudios *in vivo* se encontró que la LfcinB en un fibrosarcoma generó disrupción en la membrana, lisis celular y necrosis hemorrágica¹²³. También se ha reportado que la LfcinB inhibe la infección del virus del papiloma humano (VPH) en VPH-5 y 16¹²⁴.

En cáncer de colon, se reportó la actividad antineoplásica de la LfcinB en la línea celular HT-29, se determinó su citotoxicidad y capacidad para promover apoptosis extrínseca e intrínseca mediante la regulación de la transcripción de genes de la vía de señalización de p53, el aumento de la expresión de la caspasa 8 y p21 y la inhibición de la vía de señalización de angiopoyetina¹²⁵. En células de cáncer de colon CaCo-2, la LfcinB prolongó la fase S del ciclo celular y la reparación del ADN, lo que podría relacionarse con el efecto preventivo en padecer de cáncer por el consumo de leche^{126,127}. Debido a los resultados promisorios de la LfcinB, se han identificado péptidos derivados cortos con efecto antineoplásico potenciado¹¹⁴.

El péptido LTX-315 (Oncopore™): (KKWKKWDipK), un nonapéptido inmunogénico derivado de la LfcinB, que ha presentado actividad anticancerígena, incluso sobre cánceres drogo-resistentes y que ejerce actividad membranolítica y la posterior liberación de DAMPs. Este péptido ha sido evaluado en estudios preclínicos y clínicos, estos últimos en pacientes con tumores sólidos, mediante inmunoterapia local intratumoral, en donde se determinó que posee un perfil de seguridad aceptable y que es capaz de inducir cambios en el microambiente tumoral¹²⁸.

2.7 Síntesis química de péptidos

La LfcinB puede obtenerse industrialmente mediante la hidrólisis de la LFB¹²⁹, sin embargo, los péptidos modificados se obtienen mediante otras estrategias, como la síntesis química. La

síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS por sus siglas en inglés) se reconoce como una estrategia versátil, ya que permite la automatización, creación de librerías peptídicas y obtención de péptidos conjugados, lo que la convierte en una valiosa herramienta para obtener gran variedad de moléculas que favorece estudios de relación estructura-actividad (REA). La SPPS puede ser aplicada en la síntesis secuencial de péptidos, síntesis convergente y la ligación química, entre otros^{80,130}.

2.7.1 Generalidades de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)

La síntesis procede sobre un soporte sólido, el cual permite el crecimiento controlado y secuencial de la cadena peptídica mediante la formación de enlaces amida entre el grupo alfa amino de un aminoácido y el grupo carboxilo de otro. La metodología fue desarrollada por Robert Merrifield en 1963, para la obtención de un tetrapéptido en un soporte sólido de poliestireno, lo que lo hizo merecedor del premio Nobel de química en 1984. La resina sobre la cual se desarrolla la reacción es un polímero químicamente estable, con capacidad de hinchamiento frente a los solventes de síntesis, la cual contiene el primer bloque de construcción, un *linker* (enlazador), que permite la unión del primer aminoácido, la posterior elongación de la cadena peptídica y la separación del péptido del soporte sólido. El soporte sólido es generalmente estable a gran cantidad de reacciones químicas y permite liberar el péptido sin afectarlo (**Figura 1**)¹³¹.

La síntesis se puede llevar a cabo mediante dos estrategias, la estrategia tert-butoxicarbonil (Boc/Bzl) y la estrategia 9-fluorometoxicarbonil (Fmoc/tBu), siendo esta última la más utilizada, en la cual el grupo protector del grupo alfa amino de los aminoácidos es el 9-fluorometoxicarbonil (Fmoc) que es removido mediante tratamiento básico, mientras que los grupos protectores de las cadenas laterales y el desanclaje del péptido de la resina se realiza en medio ácido, dicha ortogonalidad es la clave para la síntesis, la formación controlada del enlace peptídico y la disminución de reacciones no deseadas¹³¹.

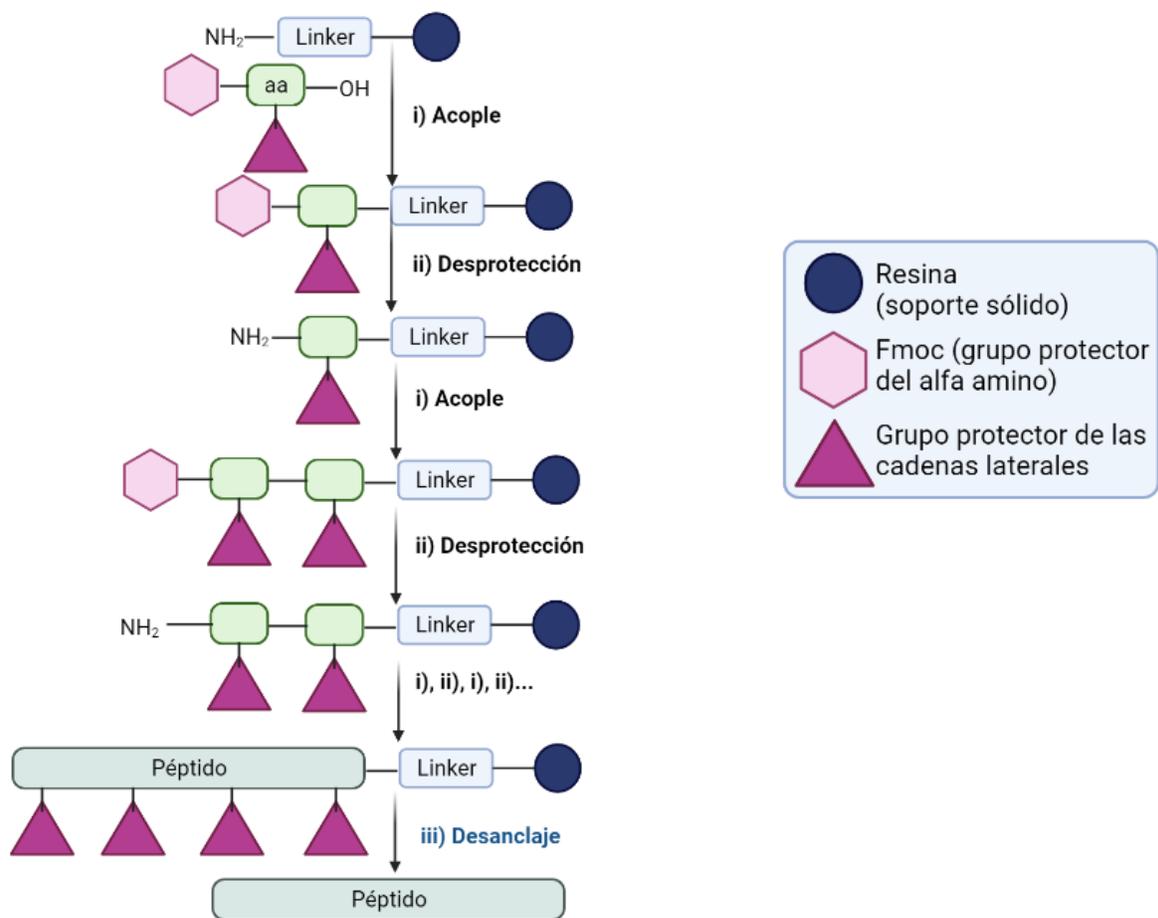


Figura 1. Esquema que ejemplifica la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS). Modificado de ¹³¹ i) La reacción de acople consiste en formar un enlace amida entre el grupo carboxilo del Fmoc-aminoácido a incorporar y el grupo amino de la resina o del último aminoácido anclado, ii) La reacción de desprotección consiste en la remoción del grupo Fmoc que se encuentra unido al grupo alfa amino iii) La reacción de desanclaje consiste en la remoción de los grupos protectores de la cadena lateral del aminoácido y la liberación del péptido del soporte sólido

Para el acople del aminoácido al soporte sólido o a la cadena creciente anclada, se realiza la activación del grupo carboxilo del residuo que se desea incorporar, lo que se realiza mediante diversas estrategias:

- **Carbodimidas:** las carbodimidas son activadoras del grupo carboxilo, la reacción produce dos especies intermedias, la N-acilurea y el éster activo O-acilurea, el cual mediante una sustitución nucleofílica acílica reacciona con el grupo alfa amino anclado al soporte sólido, para formar el enlace amida. Dentro de las carbodimidas más utilizadas se encuentra la N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), y la N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) (**Figura 2**). Sin embargo, se ha determinado que las

carbodimidas son potentes alérgenos, lo que limita su uso^{132,133}. Otro inconveniente de esta estrategia es la formación de dos especies en equilibrio la N-acilurea y la O-acilurea, lo que implica mayor consumo de Fmoc-aminoácido. Para evitar reacciones laterales y racemización, se utilizan nucleófilos como el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) o el 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt)^{131,134}, sin embargo, debido a que se ha encontrado que el HOBt tiene un alto potencial explosivo, se han desarrollado nuevos aditivos, como lo son las oximas (2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato)¹³⁵.

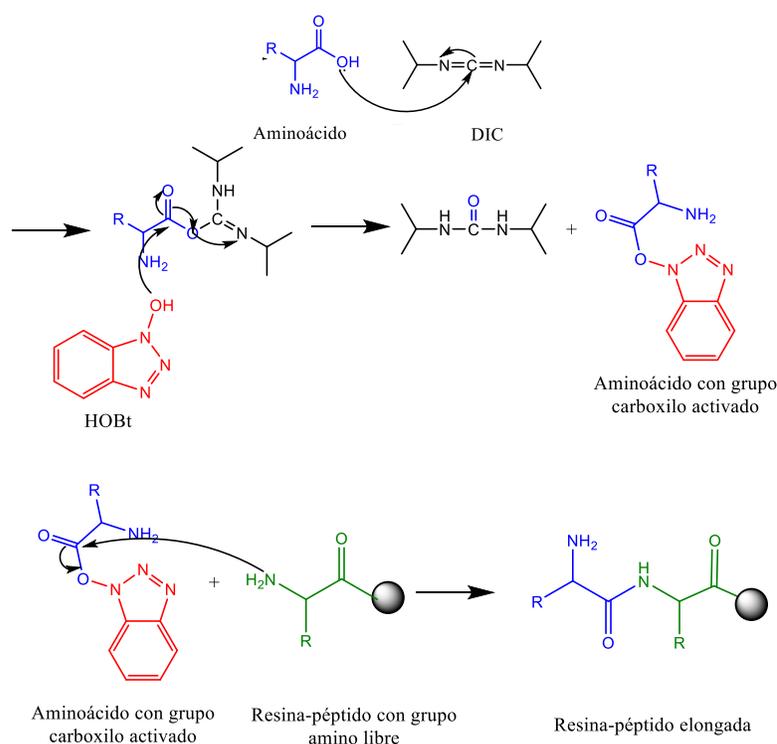


Figura 2: Mecanismo de reacción de la activación del grupo carboxilo del aminoácido usando DIC y HOBt. Modificado de ¹³⁶.

- **Aproximación *in situ*:** Existen algunos reactivos que fueron diseñados para realizar acoplos más rápidos, con mejores rendimientos y con bajo riesgo de epimerización, con la obtención de ésteres activos que reaccionan con el grupo amino. Dentro de estos se encuentran las llamadas sales de uronio, que en realidad son N-óxidos del guanidinio, como el HBTU (N-[(1 H-benzotriazol-1-il)(dimetil-amino)metileno]-hexafluorofosfato de N-metilmetanaminio N-óxido) y el HATU (N-[(dimetilamino)-1 H-1,2,3-triazol N-óxido de [4,5-b]piridin-1-ilmetileno]-N-metilmetanaminio

hexaflúorofosfato), el TBTU (tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio) y sales de fosfonio como el PyBOP (hexaflúorofosfato de 1-benzotriazoliloxi-tris pirrolidinofosfonio)^{131,137}.

Por otra parte, la desprotección, es decir la remoción del grupo Fmoc se realiza en medio básico, generalmente mediante el uso de bases orgánicas como la piperidina, una amina cíclica altamente nucleofílica, en un medio polar donador de electrones, como lo es la DMF o la N-metil pirrolidona (NMP), dicha reacción ocurre en dos pasos, en el primero se da la eliminación del protón ácido de la posición 9 del fluoreno, para posteriormente llevarse a cabo una beta eliminación, liberándose así el grupo alfa amino¹³⁸. Como resultado de la esta reacción se produce el dibenzofulveno, el cual puede polimerizarse dificultando la eliminación de los subproductos de reacción, sin embargo, la reacción con la piperidina forma el aducto dibenzofulveno-piperidina que es soluble en DMF, lo que permite eliminarlo por filtración¹³⁹.

Confirmación de acople y desprotección: Para monitorear las reacciones de acople y desprotección, existen diferentes métodos para determinar grupos aminos primarios. Una de las reacciones más utilizadas es la prueba de Kaiser, en la cual el reactivo principal; la ninhidrina (2,2-dihidroxiindano-1,3-diona) reacciona con los grupos aminos, cuando estos se encuentran libres y se produce un color azul intenso debido a la formación del púrpura de Rhumann (**Figura 3**), sin embargo esta reacción posee algunas desventajas, es un método destructivo causando la pérdida de la resina o resina-péptido que se usa en la prueba y se utilizan reactivos altamente tóxicos como el KCN y fenol, entre otros^{140,141}.

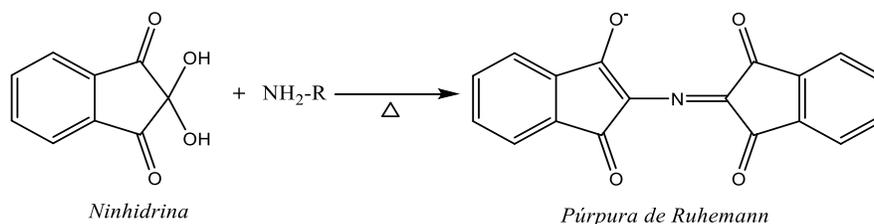


Figura 3: Reacción entre la ninhidrina y una amina primaria para la formación del púrpura de Ruhemman.¹⁴⁰

Clivaje: El desanclaje del péptido del soporte sólido y la remoción de los grupos protectores de las cadenas laterales se realizan simultáneamente. En la estrategia Fmoc/tBu este proceso se realiza en medio ácido, con una solución concentrada de ácido trifluoroacético (TFA) y “*scavengers*”, estos últimos se utilizan con el fin de evitar reacciones laterales entre los grupos protectores liberados (generalmente carbocationes) y algunos sitios reactivos de las cadenas laterales desprotegidas. Algunos de los “*scavengers*” utilizados son el agua, el etanoditiol (EDT), el triisopropilsilano (TIPS), el fenol, entre otros. Este proceso debe ser estandarizado según las características del péptido, teniendo en cuenta que algunos grupos protectores de las cadenas laterales requieren de más tiempo para su remoción y residuos como la metionina, la cisteína, la arginina o el triptófano tienden a presentar reacciones laterales que dificultan el clivaje. Posterior a este tratamiento ácido, se filtra la mezcla de reacción y la solución es tratada (para secuencias con >6 residuos) con dietiléter frío para obtener el péptido en forma de precipitado, otra alternativa es la eliminación del TFA mediante flujo de nitrógeno en la solución o rota evaporación¹⁴².

2.8 Optimización de péptidos anticancerígenos

En el desarrollo de fármacos peptídicos, la elaboración de librerías se relaciona con la combinación de diversas estrategias de optimización. La optimización es el proceso mediante el cual moléculas con baja o moderada actividad biológica (hit) o que presentan desventajas para ser consideradas candidatas a fármacos son modificadas químicamente con el fin de aumentar su actividad, biodisponibilidad, estabilidad, reducir su tasa de eliminación, aumentar su selectividad, entre otras (propiedades *drug-like*)⁸⁰. El diseño inicial de estos fármacos se basa generalmente en péptidos naturales que han presentado actividades biológicas de interés. Luego de identificada la molécula hit, a partir de estas se sintetizan librerías que son evaluadas para determinar su actividad, selectividad *in vitro*, análisis fisicoquímicos y pruebas iniciales de ADME. Aquellas moléculas con los mejores resultados (péptidos optimizados) son consideradas aptas para continuar con las etapas posteriores de la investigación, pasando por mayor refinamiento hasta que puedan ser consideradas moléculas líderes (lead) que pueden llegar a ser fármacos¹⁴³⁻¹⁴⁵.

Los péptidos como fármacos poseen ventajas atractivas en el diseño y desarrollo debido a que son moléculas pequeñas, capaces de penetrar membranas celulares y facilitar interacciones biológicas (simulando efectos de las proteínas), con diversas propiedades farmacológicas de interés¹⁵. Adicionalmente, para el año 2021 se habían aprobado a nivel mundial aproximadamente 80 péptidos, en donde el 17% de estos péptidos eran para el tratamiento de cáncer, patología que también ha aumentado el interés en este tipo de moléculas, siendo este un nicho de mercado global creciente para el que se estima que para el año 2025 el mercado de este tipo de medicamentos tendrá un valor de alrededor de USD 48,04 mil millones^{144,146}.

Cambios químicos a secuencias peptídicas de interés han sido necesarios para lograr llevar este tipo de moléculas al mercado, esto se ha asociado a la actividad biológica o a ventajas farmacocinéticas. La modificación puntual y racional de aminoácidos en secuencias peptídicas se reconoce como una estrategia clave para el desarrollo de estudios de relación estructura actividad (SAR)¹⁴⁷⁻¹⁵², así mismo se han ejemplificado moléculas en donde un solo cambio de aminoácido tiene un impacto clave en la actividad y diferencia a un candidato de una molécula en el mercado, por ejemplo las modificaciones del aminoácido del extremo N terminal del péptido A6c-Gly-Tic/Oic, generaron cambios en el IC₅₀ sobre líneas celulares de cáncer de mama en hasta 17 veces y sustituciones en el péptido S25 K aumentaron la actividad citotóxica hasta 9 veces en líneas celulares de cáncer de cuello uterino^{74,153}. Incluso dichas modificaciones específicas se han realizado en péptidos que actualmente se encuentran en el mercado, tales como la desmopresina, el leuprolide, octreotide, ganirelix, etelcalcetide, lutetiul, Lu 177¹⁴⁴.

Al hacer referencia a la optimización de péptidos, se utilizan diversas estrategias; en primer lugar, se busca identificar la secuencia más corta que presente la mayor actividad (motivo mínimo de actividad), generalmente mediante la síntesis de péptidos análogos truncados. Luego, se evalúa cuáles de los aminoácidos o regiones de la secuencia son relevantes para la actividad del péptido, para esto se sintetizan péptidos en los que se cambia secuencialmente un aminoácido ya sea por alanina (Ala) o glicina (Gly) (scan o barrido). Una vez identificada la secuencia más relevante se procede a realizar el cambio de L-aminoácidos por D-aminoácidos, para establecer si la actividad del péptido está mediada por afinidad

(interacción receptor-ligando) y/o es una interacción inespecífica (interacciones electroestáticas).

Las estrategias de optimización también pueden relacionarse con conjugación de los péptidos con otras moléculas, que pueden favorecer su actividad, como la pegilación, la ciclación, amidación, esterificación, formación de quimeras, entre otras⁸⁰. Asimismo, durante estos procesos se busca mejorar la síntesis al disminuir reacciones secundarias y el tiempo de reacción, hacer síntesis más amigables con el medio ambiente y a menores costos.

A continuación, se mencionan con mayor profundidad algunas modificaciones que se han realizado a PACs.

Polivalencia: Los péptidos multivalentes o polivalentes contienen varias copias de motivos bioactivos. La actividad potenciada de estas moléculas se asocia con procesos de agregación y oligomerización que son necesarios para su actividad, y que incrementan significativamente la actividad anticancerígena¹⁵⁴⁻¹⁵⁸.

Dentro de esta estrategia, se pueden generar péptidos lineales con motivos repetidos y péptidos dendriméricos, estos últimos pueden ser formados mediante la estrategia *Multiple Antigen Peptide Constructs* (MAP), la cual se basa en la elongación simultánea de dos, cuatro o más cadenas que contienen la misma secuencia utilizando aminoácidos como la Lys o ácido glutámico (Glu)^{156,159}. Bajo esta estrategia se han diseñado péptidos diméricos covalentes o de doble brazo y esta polivalencia se relaciona con una mayor actividad y estabilidad proteolítica^{155,160}.

Uso de aminoácidos dextro-rotatorios (D) y aminoácidos no naturales: Las proteasas son enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos y se clasifican según su sitio de acción y se dividen en dos categorías principales, las endopeptidasas y las exopeptidasas. Las endopeptidasas actúan sobre la región interna de la cadena peptídica y se subclasifican en serin-proteasas (quimotripsina, α - quimotripsina, trombina y plasmina), cisteín-proteasas (catepsina B), proteasas de ácido aspártico (pepsina) y metaloproteasas como la neprilisin. Por otra parte, las aminoproteasas y carboxipeptidasas son exo-proteasas que actúan sobre

los extremos N-terminal y C-terminal respectivamente⁸⁰. Las carboxipeptidasas B y N del suero sanguíneo tienden a ser más activas cuando el aminoácido del extremo C-terminal es Arg o Lys¹⁶¹. Para evitar la acción de estas enzimas se han propuesto estrategias como la ciclación, la amidación del extremo C-terminal, la acetilación del extremo N-terminal, la inclusión de aminoácidos no naturales o de D-aminoácidos, entre otras¹⁶².

La mayoría de los organismos poseen principalmente aminoácidos levo rotatorios (L), los cuales son sustrato para las peptidasas, sin embargo, esto no ocurre con los D-aminoácidos ni con los aminoácidos no naturales, por lo que se ha planteado el desarrollo de péptidos con la presencia de estas moléculas, aumentando así la estabilidad metabólica y, por ende, el tiempo de vida media^{163,164}. De igual forma, se ha reportado que cambios en la quiralidad de los aminoácidos pueden aumentar la potencia de los péptidos hasta en 5 órdenes de magnitud⁷⁸ y en algunas secuencias peptídicas se ha reportado que cambios de Arg/Orn aumentan la actividad citotóxica de los péptidos. Además, la inclusión de aminoácidos D y de ornitina (Orn) se ha asociado con una mayor selectividad^{88,165}, características de interés para la obtención de fármacos peptídicos contra el cáncer.

N-acetilación y C-amidación: La modificación de los extremos terminales de los péptidos se realiza con el objetivo de aumentar la actividad biológica de los péptidos al simular modificaciones postraduccionales que sufren comúnmente las proteínas, generan un cambio en la carga neta de la molécula y a su vez se asocian con mayor estabilidad proteolítica, lo que a su vez se traduce en mayor éxito para los péptidos que llegan a ensayos preclínicos^{166,167}.

Lipidación: La lipidación de los péptidos es una estrategia utilizada con el fin de brindar estabilidad enzimática, la selectividad (cuando el efecto se da sobre receptores específicos), la formación de depósitos para liberación controlada, e incluso ejerce efectos sobre la inmunogenicidad (ya sea aumentada siendo útil para el desarrollo de vacunas o disminuyendo efectos inmunogénicos que puedan tener las moléculas previo a la lipidación), mejora la permeabilidad celular (debido a su mayor interacción con la membrana lipídica) y la biodisponibilidad; parámetros de suma importancia para la investigación y desarrollo de fármacos¹⁶⁸⁻¹⁷². La resistencia a la degradación enzimática de los péptidos lipidados puede asociarse a la formación de oligómeros tipo micela o debido a la unión a proteínas plasmáticas, procesos que favorecen la estabilidad metabólica de las moléculas^{172,173}. La

lipidación se ha reportado con diversos lípidos saturados, siendo los de cadena larga y mediana los más utilizados, sin haberse definido aún cuál es el tamaño ideal de la cadena^{170,172,174}. La lipidación aumenta del tiempo de vida media en medicamentos como el liraglutide y mejoras en la biodisponibilidad como en el semaglutide, ambos fármacos análogos de GLP-1^{172,175}.

PEGilación: La pegilación es una estrategia en la cual se une covalentemente una o varias moléculas de polietilenglicol (PEG) a la cadena del péptido, esta estrategia se utiliza con el fin de mejorar el comportamiento farmacocinético de las moléculas, en el caso de los péptidos puede disminuir la eliminación renal y mejorar la estabilidad proteolítica^{176,177}.

Biotinilación: La biotina es una vitamina soluble en agua, que participa en diversos procesos metabólicos y cuya conjugación ha sido evaluada en la llamada focalización de fármacos mediada por vitaminas (*vitamin-mediated drug targeting*). Esta estrategia está basada en la alta demanda metabólica de las células cancerosas que se encuentran en proliferación celular constante y que a su vez sobre expresan los receptores de vitaminas, como parte del remodelamiento metabólico que poseen. El transportador principal de la biotina es el transportador multivitamínico dependiente de sodio (SMVT por sus siglas en inglés), el cual es expresado en la superficie de diversas células cancerosas, especialmente en líneas celulares agresivas de cáncer ya que la biotina es requerida al actuar como un promotor de crecimiento^{178,179}. La conjugación de los péptidos con biotina podría favorecer la actividad y la selectividad de los péptidos por las células cancerosas¹⁸⁰, y que la inclusión de biotina en la cadena peptídica favorece la marcación mediante el sistema estreptavidina o avidina /biotina, lo cual es de utilidad para evaluar el mecanismo de acción de los péptidos^{181,182}.

Modificación en residuos claves asociados con la actividad: En secuencias derivadas de la LfcinB se han reportado diversos estudios asociados a la modificación de residuos hidrofóbicos donde se determinó que cambios puntuales por aminoácidos no naturales con cadenas laterales aromáticas voluminosas aumentaron el efecto citotóxico frente a líneas celulares de cáncer de colon (HT-29) y células derivadas de leucemia humana (MT-1). Por ejemplo, el péptido LfcinB (17-31) presentó actividad citotóxica en la línea HT-29 (IC₅₀>500µM) y al realizar la sustitución del Trp de la posición 3 por β-[2-(2,2,5,7,8-pentametil-cromano-6-sulfonil)-indol-3-il]alanina (Tpc) la actividad se incrementó

significativamente ($IC_{50} = 24.5\mu M$), mientras que al cambiar esta misma posición por difenil alanina (Dip) se observó la misma actividad del péptido original ($IC_{50} > 500\mu M$). A pesar de que ambas modificaciones fueron de naturaleza hidrofóbica, las modificaciones puntuales de residuos generan un cambio en la actividad citotóxica que depende de la posición de la sustitución y el residuo hidrofóbico incorporado¹⁸³.

De igual forma, se han reportado modificaciones a residuos catiónicos utilizando derivados de Arg como el ácido 2-amino-(3-guanidino) propiónico (Agp), favoreciendo la estabilidad de las moléculas¹⁸⁴. También se han reportado modificaciones de Arg/Lys o Lys/Arg, en donde se demostró que los péptidos con Arg tienden a presentar mayor actividad sobre bacterias que sus análogos con lisinas¹⁸⁵. Sin embargo, la presencia de Arg se ha relacionado con mayor toxicidad¹⁸⁶, por el cual es necesario un equilibrio entre los componentes catiónicos e hidrofóbicos de los péptidos para incrementar la actividad y la selectividad¹⁸³.

2.8.1 Estudios preclínicos de toxicidad

Dentro de la investigación y desarrollo, al tener moléculas de interés, se realizan estudios de toxicidad en especies animales, en donde generalmente se utilizan ratones, ratas, perros y cerdos. Dichos estudios se realizan de forma aguda, sub-aguda, sub-crónica y/o crónica. Estos permiten determinar efectos fisiológicos y bioquímicos de posibles fármacos y un acercamiento a la toxicidad previo a los estudios clínicos¹⁸⁷. Asimismo, se ha reportado que solo el 12% de los fármacos que pasan por estudios preclínicos llegan a los estudios clínicos y el 40% fallan, generalmente por no identificar la toxicidad de los compuestos en los estadios tempranos, por lo que algunos autores consideran relevante determinar la toxicidad y eficacia en las etapas de investigación temprana, acompañados de diseños fuertes que permitan diferenciar una sustancia tóxica de una activa¹⁸⁸. Lo que permite realizar los procesos de optimización en conjunto con los resultados de actividad biológica y mejorar las probabilidades de éxito hasta la comercialización como medicamento.

2.9 Líneas celulares utilizadas en este estudio

- **HT-29 (HTB-38TM):** Esta línea celular fue aislada en 1964 de un tumor primario de una mujer de 44 años caucásica con adenocarcinoma colorrectal, las células poseen microvellosidades, microfilamentos y mitocondrias vacuoladas de gran tamaño. Esta línea celular presenta los oncogenes c-myc, K-ras, H-ras, N-ras, Myb, sis y p53 mutado, además tienen la capacidad de diferenciarse en enterocitos o células productoras de mucosidad^{189,190}.
- **Caco-2 (HTB-37TM):** Esta línea celular fue aislada de un tumor de un hombre de 72 años con adenocarcinoma colorrectal. Las células son epiteliales adherentes y expresan la proteína de unión al ácido retinoico I y la proteína de unión al retinol II, en condiciones determinadas las células expresan características de diferenciación enterocítica^{191,192}.
- **HCT-116 (CCL-247TM):** La línea celular fue aislada de un hombre adulto con cáncer de colon, es una línea epitelial, adherente y tumorigénica posee una mutación en el gen Ras, expresa el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF beta 1) y beta 2 (TGF beta 2) y es una representación del subtipo molecular de consenso tipo 1^{57,193}.
- **Fibroblastos normales:** El cultivo se obtuvo de fibroblastos aislados del prepucio de un niño, proceso realizado en el laboratorio de Fisiología celular y molecular de la Universidad Nacional de Colombia.
- **HEK 293 (CRL-1573TM):** Esta línea celular fue aislada del riñón de un embrión humano y transformada con fragmentos de ADN de adenovirus tipo 5 (Ad5). Las células presentan una morfología epitelial, adherente y se caracterizan por su rápida y fácil reproducción y uso^{194,195}.
- **DU-145 (HTB-81TM):** Línea celular con morfología epitelial que se aisló del cerebro de un hombre blanco de 69 años con cáncer de próstata (metastásico). Esta línea celular forma adenocarcinoma (grado II) compatible con cáncer primario de próstata. La línea no es sensible a las hormonas y las células no expresan antígeno prostático. Los análisis ultraestructurales tanto de la línea celular como del tumor original revelaron microvellosidades, tonofilamentos y desmosomas y las células son pequeñas poligonales^{196,197}.

- **HeLa (CCL2™):** Es una línea celular epitelial, adherente, de adenocarcinoma de útero que fue aislada de una mujer afroamericana de 31 años, en donde se ha confirmado la presencia de HPV-18 y la baja expresión de p53¹⁹⁸.
- **MCF-7 (HTB-22™):** Es una línea celular epitelial, adherente, de adenocarcinoma de seno, la cual fue aislada de una mujer caucásica de 69 años, estas células poseen características del epitelio mamario diferenciado, tienen la capacidad de diferenciarse en presencia de estrógeno y son positivas para receptores de estrógeno (ER+) y receptores de progesterona (PR⁺)^{199,200}.

2.10 Péptidos anticancerígenos de partida utilizados en este estudio

En el grupo de síntesis y aplicación de moléculas peptídicas de la Universidad Nacional de Colombia (SAMP) se ha trabajado con péptidos sintéticos derivados de la LfcinB. A través de estudios de actividad antibacteriana se han identificado los péptidos promisorios LfcinB (20-25)₂: (H₂N-RRWQWR)₂K-Ahx-CONH₂, LfcinB (20-25)₄: (H₂N-RRWQWR)₄K₂-Ahx₂-C₂, LfcinB (20-30)₂: (H₂N-RRWQWRMKLG)₂K-Ahx-CONH₂, ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂: (H₂N-RRWQWRFKLG)₂K-Ahx-CONH₂ y LfcinB (21-25)_{Pal}: H₂N-RWQWRWQWR-CONH₂¹¹⁷. Algunos de estos péptidos presentaron efecto sinérgico con ciprofloxacino y vancomicina, lo cual los hace promisorios para desarrollar en un futuro estudios de viabilidad como fármacos²⁰¹.

Posteriormente se determinó la correlación entre la actividad antibacteriana y el efecto citotóxico frente a las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-468 y MDA-MB-231, en donde estos péptidos mostraron efecto citotóxico selectivo y significativo (**Tabla 2**)²¹. De la misma forma se determinó que los péptidos LfcinB (20-25), LfcinB (20-25)₄ y LfcinB (21-25)_{Pal} también presentaron actividad frente a líneas celulares de células de carcinoma de células escamosas orales, con un efecto rápido del tipo necrótico *in vitro* y apoptótico *in vivo*²⁵.

El efecto citotóxico de los péptidos LfcinB (20-25)₄ y LfcinB (21-25)_{Pal} sobre MDA-MB-468, MCF-7 y MDA-MB-231 fue rápido y se mantiene hasta 48 horas. Este efecto citotóxico

está asociado principalmente a muerte celular por apoptosis mostrando despolarización de la membrana mitocondrial²².

Otros estudios desarrollados frente a cáncer de mama permitieron identificar péptidos análogos de LfcinB (20-30)₂ con efecto anticanceroso potenciado como el péptido ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂: (H₂N-RRWQWRFKKLG)₂-K-Ahx-CONH₂ con valores de IC₅₀ de entre 6 y 13 μM en las líneas celulares HTB-132 y MCF-7²⁰.

Efecto citotóxico de los péptidos en líneas celulares derivadas de cáncer de mama (IC ₅₀ μM)				
Nombre	Secuencia	Línea celular		
		MDA-MB-468	MDA-MB-231	MCF-7
LfcinB (20-25)*	H ₂ N-RRWQWR-CONH ₂	>203	>203	>203
LfcinB (20-25) ₂	(H ₂ N-RRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	>100	130	-
LfcinB (20-25) ₄	(H ₂ N-RRWQWR) ₄ -K ₂ -Ahx ₂ -C ₂	6	15	-
LfcinB (21-25) _{Pal}	H ₂ N-RWQWRWQWR-CONH ₂	49	135	66
LfcinB (21-25) _{Pal2}	(H ₂ N-RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	4	3	-
LfcinB (20-30)*	H ₂ N-RRWQWRMKKLG-CONH ₂	>130	>130	-
LfcinB (20-30) ₂	(H ₂ N-RRWQWRMKKLG) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	5	14	18
²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	(H ₂ N-RRWQWRFKKLG) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	13	-	6

Tabla 2: Efecto citotóxico (IC₅₀) de péptidos derivados de LfcinB sobre líneas celulares de cáncer de mama ^{20,21,24,202,203}. *Péptidos monoméricos utilizados como control.

A partir de estos resultados, para este trabajo se seleccionaron los péptidos relacionados en la **Tabla 2**, estos péptidos fueron sintetizados, purificados y caracterizados y se determinó su efecto citotóxico en líneas celulares derivadas de cáncer de colon HT-29 y Caco-2. Los péptidos que presentaron los mejores resultados fueron considerados como moléculas hit a partir de los cuales se sintetizaron librerías de péptidos análogos cuyo efecto citotóxico fue evaluado lográndose identificar moléculas optimizadas, que pueden ser consideradas como candidatos promisorios para el desarrollo de tratamientos contra el cáncer de colon.

3 Justificación

Se estima que para el año 2040, morirán 30,2 millones de personas en el mundo por causa del cáncer, y estas cifras son aún más desalentadoras en los países en desarrollo, donde se presenta la mayor morbilidad, las menores tasas de supervivencia y se estima que la incidencia de cáncer aumentará en un 80% y la mortalidad en un 45% para el mismo año^{3,204,205}.

El cáncer de colon es el quinto cáncer con mayor morbimortalidad a nivel mundial^{2,27,206}, representa altos costos para el sector salud y es considerado un problema de salud pública²⁰⁷. Igualmente se estima que para el 2040, en Colombia, 13.700 personas padecerán cáncer de colon y de estas 7.770 morirán³. En la actualidad, el tratamiento se basa en cirugías y/o terapias adyuvantes con severos efectos adversos^{5,7}. Además, existen dificultades en la terapia farmacológica, debido a la fármaco-resistencia por lo que es necesario desarrollar tratamientos con alta efectividad y selectividad y que, a su vez sean una opción para contrarrestar la fármaco-resistencia²⁰⁸.

Dentro de las alternativas farmacológicas que se han descrito para el tratamiento del cáncer, se encuentran los PACs, los cuales se caracterizan por su actividad anticancerosa selectiva⁶⁵. Dentro de estos PACs se encuentra la LfcinB y péptidos derivados de esta, que se consideran promisorios: LfcinB (20-25), LfcinB (20-25)₂, LfcinB (20-30), ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, LfcinB (20-30)₂, LfcinB (21-25)_{Pal} y LfcinB (21-25)_{Pal2}, los cuales han presentado efecto citotóxico sobre líneas celulares de cáncer de mama y cáncer de células escamosas orales^{20,25,85,201}. Sin embargo, hasta hoy no se ha descrito si estos péptidos tienen efecto citotóxico sobre líneas celulares derivadas de cáncer de colon. En este trabajo se evaluaron estos péptidos para determinar si presentan efecto citotóxico contra las células derivadas de cáncer de colon HT-29 y Caco-2 y aquellas moléculas que presentaron los mejores resultados (péptidos hit) fueron utilizados como plantillas para obtener librerías de péptidos mediante modificaciones en la secuencia con el fin de potenciar su actividad. A algunos de los péptidos optimizados (aquellos con los mejores resultados) se les determinó el tipo de muerte celular asociado a este efecto y la toxicidad en tres modelos *in vivo*.

4 Pregunta de investigación

¿Cuáles péptidos que contienen las secuencias LfcinB (20-25), LfcinB (20-30), LfcinB (21-25)_{Pal} o sus derivados presentarán efecto citotóxico selectivo *in vitro* contra líneas celulares de cáncer de colon?

5 Hipótesis

Los péptidos que contienen las secuencias LfcinB (20-25), LfcinB (20-30), LfcinB (21-25)_{Pal} o sus derivados presentan efecto citotóxico selectivo *in vitro* contra líneas celulares de cáncer de colon y su actividad puede potenciarse con modificaciones químicas puntuales. Y si es así, el efecto citotóxico de los péptidos estará mediado por eventos apoptóticos.

6 Objetivos

6.1 Objetivo general

Identificar al menos una molécula peptídica derivada de Lactoferricina bovina que presente efecto citotóxico frente a líneas celulares de cáncer de colon y determinar de manera preliminar el tipo de muerte celular por el que actúa.

6.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad citotóxica, frente a dos líneas celulares de cáncer de colon, de los péptidos: $\text{NH}_2\text{-RRWQWR-CONH}_2$, $(\text{NH}_2\text{-RRWQWR})_2\text{-K-Ahx-CONH}_2$, $((\text{NH}_2\text{-RRWQWR})_4\text{-K}_2\text{-Ahx}_2\text{-C}_4$, $\text{NH}_2\text{-RWQWRWQWR-CONH}_2$, $(\text{NH}_2\text{-RWQWRWQWR})_2\text{-K-Ahx-CONH}_2$ y $(\text{NH}_2\text{-RRWQWRMKKLG})_2\text{-K-Ahx-CONH}_2$.
2. Obtener una librería de péptidos construida a partir de las dos secuencias con los mejores resultados del objetivo 1. La librería tendrá moléculas en las que se: i) cambiará el L-aminoácido del extremo N-terminal por su respectivo D-aminoácido, ii) realizarán sustituciones secuenciales Arg por Orn y/o se iii) introducirá N-acetilación.
3. Evaluar el efecto citotóxico de los péptidos que conforman las librerías construidas, que tengan pureza cromatográfica superior al 85%.
4. Para los péptidos con los mejores resultados determinar si el tipo de muerte celular está mediado por eventos apoptóticos y/o necróticos en ambas líneas celulares de cáncer de colon.

7 Metodología

7.1 Diseño experimental

El desarrollo experimental se realizó en seis etapas, dentro de las cuales se respondieron los objetivos específicos planteados. Debido a que el trabajo se centra en la investigación y desarrollo de fármacos, las etapas se basaron en la identificación de las moléculas más promisorias (péptidos optimizados), lo que implicó el cribado y filtrado de moléculas a medida que se surtían las etapas de la investigación. A partir de los péptidos más promisorios se seleccionó un péptido líder para los ensayos *In vivo*, este desarrollo se esquematiza mediante un embudo que representa el cribado de los fármacos peptídicos evaluados (**Figura 4**).

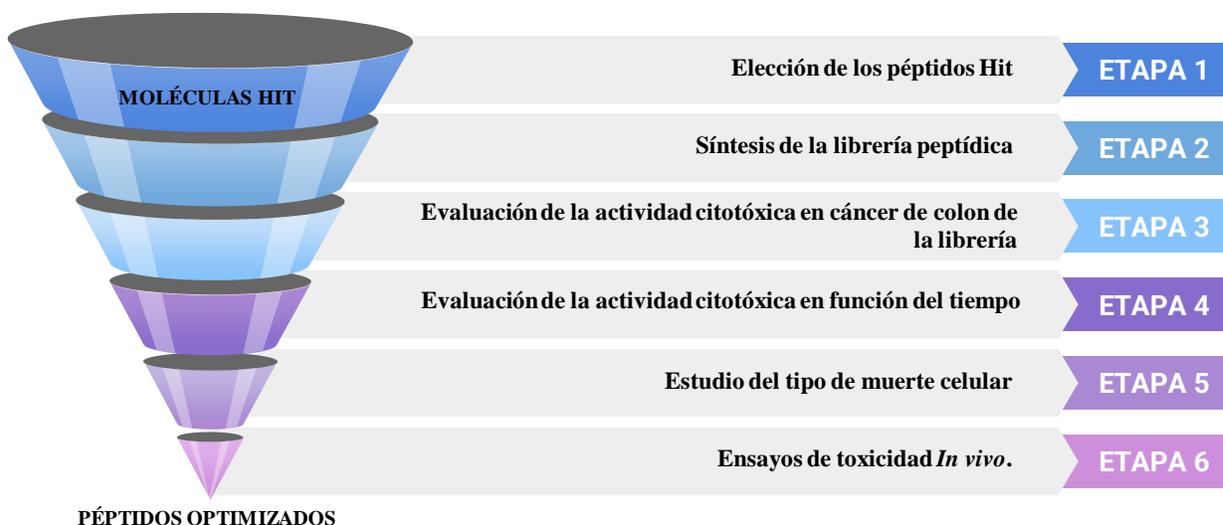


Figura 4: Diseño experimental desarrollado.

Etapa 1: Elección de péptidos hit (Cumplimiento del objetivo específico 1).

- Consistió en la síntesis de los péptidos derivados de LfcinB, purificación por RP-SPE y caracterización por RP-HPLC y LC-MS.
- A aquellos péptidos que superaron la fase de síntesis en cuanto a facilidad de síntesis y pureza, se les determinó su efecto citotóxico contra dos líneas celulares de cáncer de colon; ATCC HTB-38 (HT-29) y ATCC HTB-37 (Caco-2).

- Para aquellos péptidos que presentaron los mejores resultados se evaluó el efecto citotóxico en líneas celulares no cancerosas: fibroblastos, la línea ATCC CRL-1573 (HEK-293) y glóbulos rojos. A partir de los valores de IC₅₀ obtenidos de las curvas de viabilidad celular (ensayos MTT) con las líneas HT-29, Caco-2, fibroblastos y HEK-293, se determinó el índice de selectividad (IS) mediante la expresión:

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ en línea celular control (no cancerosa)}}{IC_{50} \text{ línea celular de cáncer de colon}} \text{ (Ecuación 1)}$$

Los valores de IS = 1 indican que las moléculas no son selectivas y son tóxicas para los dos tipos de células, valores IS > 1 indican que los péptidos presentan selectividad por las células cancerosas y valores de IS < 1 indican que los péptidos son tóxicos en mayor grado en las células no cancerosas²⁰⁹.

- El efecto citotóxico de los péptidos con los mejores resultados fue evaluado en la línea celular derivada de cáncer de colon HCT-116.

Etapas 2: Síntesis de la librería peptídica (Cumplimiento del objetivo específico 2).

- Los dos péptidos hit que presentaron el mayor efecto citotóxico selectivo en las líneas celulares HT-29 y Caco-2 y la mejor viabilidad sintética (Objetivo 1) fueron seleccionados como péptidos base de las modificaciones. Para facilitar el proceso sintético las modificaciones fueron realizadas primero en la secuencia del péptido monomérico y a partir de los resultados obtenidos se realizaron las modificaciones en la secuencia dimérica. Las siguientes fueron las estrategias utilizadas:
 - i) N-biotinilación
 - ii) N-lipidación,
 - iii) N-acetilación,
 - iv) Cambios secuenciales de Arg/Orn,
 - v) N-PEGilación,
 - vi) Cambio del L-aminoácido del extremo N terminal por su respectivo D-aminoácido,
 - vii) Inclusión de Ahx en el N-terminal,
 - viii) Polivalencia.

Los péptidos de las librerías fueron sintetizados por SPPS-Fmoc/tBu, purificados por RP-SPE y caracterizados por RP-HPLC y LC-MS. Los péptidos que presentaron purezas cromatográficas superiores al 85% fueron seleccionados para la siguiente etapa.

Etapa 3: Evaluación de la actividad citotóxica en cáncer de colon de la librería (Cumplimiento del objetivo específico 3):

- El efecto citotóxico de las librerías obtenidas en la etapa 2 fue determinado en células HT-29, Caco-2, Fibroblastos, HEK-293 y glóbulos rojos. A partir de los resultados se identificaron ocho péptidos promisorios (péptidos optimizados).

Etapa 4: Evaluación de la actividad citotóxica en función del tiempo y tratamiento.

- Con el fin de evaluar de manera más detallada el efecto citotóxico de los péptidos promisorios, se evaluó la actividad citotóxica a diferentes tiempos de tratamiento 2, 24 y 48 horas en líneas celulares de colon.
- También se evaluó la actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de mama, cuello uterino y/o próstata para determinar si estos péptidos son de amplio espectro de acción en diferentes tipos de cáncer.

Etapa 5: Estudio del tipo de muerte celular (Cumplimiento del objetivo específico 4).

En esta etapa se evaluó mediante citometría de flujo y microfotografía el tipo de muerte celular inducido por algunos péptidos optimizados en células Caco-2 y/o células HT-29.

Etapa 6: Ensayos de toxicidad *In vivo*.

En esta etapa se determinó la toxicidad de los péptidos mediante tres modelos. i) El modelo *in vivo* de *Galleria mellonella*, ii) La prueba de Irwin en ratones CD1 iii) La toxicidad en pez cebra.

7.2 Síntesis de péptidos en fase sólida

Los péptidos se sintetizaron usando la síntesis manual de péptidos en fase sólida (SPPS-Fmoc/tBu) (**Figura 5**). Brevemente, el soporte sólido; la resina Rink amida (0,46 mEq/g) fue hinchada con *N,N*-Dimetilformaamida (DMF) durante dos horas con agitación constante (AC). Posteriormente se realizaron los siguientes pasos: (i) Reacción de desprotección, la eliminación del grupo Fmoc se llevó a cabo mediante tratamiento de la resina o resina-péptido con 2,5% de 4-metil piperidina en DMF, dos ciclos de reacción de 10 min a temperatura ambiente (TA) con AC (**Paso 1**). (ii) Reacción de acople, los Fmoc-aminoácidos y los lípidos se pre-activaron con DCC/6-Cl-HOBt (1:1:1 Equiv.) en DMF a TA durante 10 minutos con AC. Para el caso de la Orn y la biotina, las reacciones de acople se realizaron con TBTU (Hexafluorofosfato de O-(1H-benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio)/6-Cl-HOBt/Diisopropiletilamina (DIPEA) (1:1:1:4 Equiv.) en DMF a TA durante 10 minutos con AC. Luego la mezcla de reacción fue adicionada a la resina o resina-péptido y dejada en reacción a TA y AC hasta prueba negativa de la prueba de Kaiser. Para la biotina y la Orn la mezcla de reacción fue dejada por 2h a TA y AC (**Paso 2**). Las reacciones de acople y desprotección se confirmaron mediante el test de Kaiser (ninhidrina). (iii) Las reacciones de desprotección de las cadenas laterales y la separación de los péptidos de la resina se llevaron a cabo con un cóctel de clivaje TFA/agua/TIPS /EDT (92.5 /2.5/2.5/2.5 v/v/v). La mezcla de reacción se agitó a TA por 8h con AC, luego se filtró la mezcla de reacción y se recogió la solución; posteriormente, los péptidos se precipitaron por tratamiento con éter etílico frío y el sólido se lavó con éter etílico cinco veces y se secó a TA (**Paso 3**).

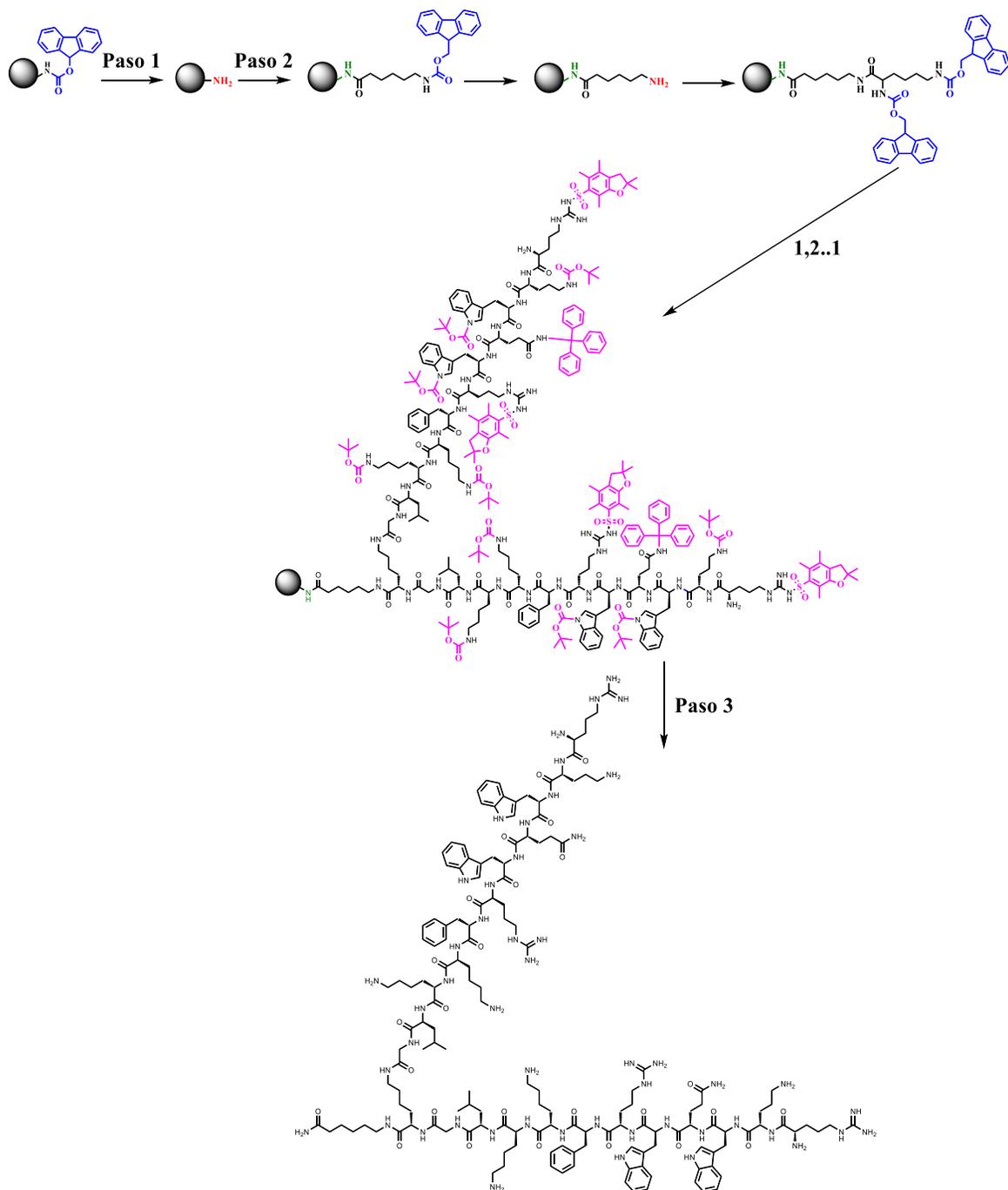


Figura 5: Esquema general del proceso de síntesis del péptido $(\text{H}_2\text{N-R-Orn-WQWRFKKLG})_2\text{K-Ahx-CONH}_2$. Paso 1. Desprotección del grupo alfa amino mediante remoción del grupo Fmoc. Paso 2. Acople del aminoácido activado. Paso 3. Reacción de desanclaje o clivaje.

7.3 Purificación de los péptidos

Los péptidos se disolvieron en el solvente A (agua con TFA 0,05%) y la solución se cargó en la columna RP-SPE (Sulpeclean, 10 g, 40-60 μm) previamente acondicionada de acuerdo

con las recomendaciones del proveedor, luego el péptido se eluyó utilizando elución con gradiente 5-100% de solvente B (Acetonitrilo (ACN) con TFA 0,05%)²¹⁰. Las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía RP-HPLC y se recogieron y liofilizaron aquellas que contenían el péptido con mayor pureza. El gradiente de elución fue diseñado con base en el t_R del péptido obtenido en el análisis por RP-HPLC.

7.4 Caracterización de los péptidos

Cromatografía RP-HPLC. Para el análisis se empleó un cromatógrafo Agilent Series 1260. Los péptidos (1 mg/mL) se disolvieron en Solvente A y fueron analizados utilizando el siguiente sistema cromatográfico: Columna monolítica Chromolith® C-18 (50×4,6 mm), gradiente de elución del 5 al 50% de Solvente B en 8 minutos, flujo de 2.0 mL/min, volumen de inyección 10 μ L y 210 nm para la detección. Debido a la hidrofobicidad de los lipopéptidos, el método fue modificado utilizando el gradiente 30/100% de B en 11 min.

Espectrometría de masas. Los péptidos fueron analizados por espectrometría de masas utilizando tres equipos de acuerdo con la disponibilidad y/o el análisis requerido. Se utilizaron los siguientes equipos: MALDI-TOF microFlex (Bruker), Bruker Im-pact II LC Q-TOF MS y el equipo de Masas de Alta Resolución (HRMS) Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ de la empresa Thermo Scientific™.

Análisis por MALDI-TOF. 1 μ L de la solución del péptido (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.

Análisis por LC-Q-TOF. Los péptidos (10 μ g/mL) se analizaron en el espectrómetro Bruker Im-pact II LC Q-TOF MS equipado con una fuente de ionización por ESI operada en modo positivo utilizando las siguientes condiciones: offset final tardío 500 V, voltaje capilar 4500 V, temperatura de secado 220°C y flujo de nitrógeno 8 L/min.

Análisis por LC- Orbitrap™: Los péptidos (10 µg/mL) se analizaron en el espectrómetro Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ de la empresa Thermo Scientific™ en modo LC-MS, equipado con una fuente de ionización por ESI operada en modo positivo utilizando las siguientes condiciones: voltaje 3.50 KV, con temperatura de capilar 320°C.

7.5 Cultivo celular

El cultivo celular se desarrolló de acuerdo con la metodología estandarizada de la Unidad de Investigación en Proteómica y Miosis Humanas (Pontificia Universidad Javeriana).

7.5.1 Descongelamiento de células

El descongelamiento de las líneas celulares se realizó de acuerdo con la metodología de la Unidad de Investigación en Proteómica y Miosis Humanas. Las líneas celulares fueron retiradas del tanque de almacenamiento que contiene nitrógeno líquido, 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 un frasco de 25 mL que contenía 10 mL de medio completo.

7.5.2 Subcultivo celular

Cuando las células estaban en 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 incubaron durante 5 minutos y se adicionaron 4 mL de medio completo para inactivar la tripsina. La suspensión fue recuperada en un tubo Falcón de 15 mL y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y las células se re-suspendieron en 1 mL de medio completo. Se adicionaron 20 µL de suspensión celular en una cámara de Neubauer y se hizo el conteo de las células. Se sembró la cantidad de células deseadas en un frasco de 25 mL y se incubó a 37°C y 5% CO₂ en atmósfera húmeda hasta el próximo subcultivo.

7.5.3 Ensayo de viabilidad celular

Las células sembradas y sincronizadas en placas de 96 pozos fueron incubadas a 37°C durante 2 horas con 50 µL de péptido disuelto en medio sin suplementar (concentraciones finales de 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 µg/mL) y 50 µL de medio completo. Luego se adicionaron 10 µL de bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y se incubó por 4 horas. El medio fue reemplazado por 100 µL de DMSO y luego de 30 minutos de incubación a 37°C, la absorbancia fue medida a 570 nm. Como control negativo se usaron células sin tratamiento en medio de cultivo completo con MTT al 10%. Como control positivo se usaron células tratadas con peróxido de hidrógeno al 2.5%. El blanco fue la absorbancia del DMSO. El porcentaje de viabilidad celular para cada tratamiento fue calculado de la siguiente manera:

$$\% Viabilidad = \frac{Abs\ tratamiento - Abs\ control\ negativo}{Abs\ blanco - Abs\ control\ negativo} \times 100 \text{ (Ecuación 2)}$$

7.5.4 Microscopía de contraste de fases

Las células tratadas con los péptidos en las placas de 96 pozos fueron observadas al microscopio y se tomó el registro fotográfico con el microscopio Leica Dmi1 a la mayor concentración de cada péptido (200 µg/mL) y un control sin tratamiento.

7.6 Citometría de flujo

7.6.1 Determinación del tipo de muerte celular apoptosis/necrosis

Las células HT-29 fueron sembradas y sincronizadas en cajas de 24 pozos en una concentración de 100.000 células/pozo, el medio de cultivo fue reemplazado con 400 µL de una solución que contenía el péptido a evaluar a una concentración final del IC₅₀ y las células fueron incubadas por 2 horas. Posteriormente, las células se tripsinizaron durante 5 minutos

y fueron transferidas a tubos cónicos de 1.5mL, después de eso, fueron centrifugadas a 2500rpm y el pellet fue disuelto a razón de 1×10^5 células/mL. A continuación, se tomaron 100 μ L de una suspensión de las células junto con 100 μ L del reactivo Muse® Annexin V& Dead Cell. Las células con los fluorocromos fueron incubadas en la oscuridad a TA durante 20 minutos y se llevó a cabo el análisis en el Guava® Muse® Cell Analyzer. Por otra parte, las células Caco-2, tratadas como se explicó previamente, fueron suspendidas en 20 μ L de tampón de tinción con los fluorocromos (1 μ L de fluorocromo 7AAD y 5 μ L de anexina V). Las células con los fluorocromos se incubaron a 37°C en la oscuridad durante 15 minutos y se suspendieron en 80 μ L del tampón de tinción sin fluorocromos para su análisis en un dispositivo BD Accuri C6. Control negativo: células sin tratamiento; controles de compensación: (i) células teñidas solo con Anexina V y (ii) solo con 7AAD; control de población: células sin teñir y sin tratar.

7.6.2 Determinación de la despolarización de la membrana mitocondrial

Las células HT-29 fueron sembradas y sincronizadas en cajas de 24 pozos en una concentración de 100.000 células/pozo, el medio de cultivo fue reemplazado con 400 μ L de una solución que contenía el péptido a evaluar a una concentración final del IC₅₀ y las células fueron incubadas por 2 horas. Posteriormente, las células se tripsinizaron durante 5 minutos y fueron transferidas a tubos cónicos de 1.5mL, después, fueron centrifugadas a 2500rpm y el pellet fue disuelto a razón de 1×10^5 células/mL en el buffer 1X y se agregaron 100 μ L de células junto con 95 μ L de la solución de trabajo del kit, se mezclaron y se incubaron a 37°C (5% de CO₂) durante 20 min, posteriormente se agregaron 5 μ L de reactivo Muse MitoPotential y se incubaron a TA durante 5 minutos. Finalmente, se analizaron en el Guava® Muse® Cell Analyzer. Las células Caco-2, tratadas como se explicó previamente, se tiñeron añadiendo 100 μ L de “solución de trabajo” de JC1 (solución de JCI 1:100 reconstituida en DMSO: ensayo de tampón 1 μ L) del kit de ensayo MitoProbe™ JC-1 (M34152 de Termofisher, Waltham, MA, EE. UU.) y se incubaron a 37 °C durante 20 minutos. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con 1 μ L de ensayo de tampón y

finalmente se resuspendieron en 100 μ L del tampón para leer en el citómetro BD Accuri TM C6. Control negativo: células sin tratamiento; control positivo: células tratadas con actinomicina D 15 μ M durante 24 h.

7.6.3 Determinación de multicaspasas (caspasas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9)

Las células fueron sembradas y sincronizadas en cajas de 24 pozos en una concentración de 100.000 células/pozo, el medio de cultivo fue reemplazado con 400 μ L de una solución que contenía el péptido a evaluar a una concentración final del IC₅₀ y las células fueron incubadas por 2 horas. Posteriormente, las células se tripsinizaron durante 5 minutos y fueron transferidas a tubos cónicos de 1.5mL, después de eso fueron centrifugadas a 2500rpm y el pellet fue disuelto a razón de 1×10^5 células/mL en el buffer 1X del Muse® MultiCaspase Kit, posteriormente se tomaron 50 μ L de células y se agregaron 5 μ L de la solución de trabajo de multicaspasas, las cuales fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C. Luego, se agregaron 150 μ L de la solución de trabajo de 7-AAD. Por último, las muestras se analizaron en el Guava® Muse® Cell Analyzer.

7.7 Estudios de toxicidad en larvas de *Galleria mellonella*

Larvas de *Galleria mellonella* (obtenidas de Productos Biológicos Perkins Ltda, Palmira, Valle del Cauca, Colombia) con un peso aproximado de 200 a 300 mg fueron lavadas de la mitad del cuerpo hacia abajo con etanol al 70%, e inyectadas en la penúltima pata con 10 μ L del péptido (400-1000 μ g/mL) o solución salina estéril. Las larvas se evaluaron en dos concentraciones (n=10) y se mantuvieron a 37°C durante 14 días, registrando la mortalidad cada 24 horas. Las larvas muertas se determinaron por cambio de coloración y movimiento.

7.8 Prueba de Irwin

Se agruparon 8 ratones CD1 macho (8 semanas de edad, con un peso de 33-35 g) en grupos de 4 animales por jaula, de los cuales tres fueron tratados con un péptido optimizado elegido, a una dosis final de 140mg/Kg y tres a una dosis final de 70mg/Kg, estos fueron inoculados por vía intraperitoneal (i.p.), se utilizó un ratón por grupo como control, el cual fue inoculado con solución salina. Los experimentos se realizaron siguiendo 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.

7.9 Modelo de toxicidad en pez cebra (*Danio rerio*)

Este ensayo fue llevado a cabo por el Laboratorio de Neurociencia y Ritmos Circadianos de la Facultad de Medicina de la Universidad de los Andes. Se criaron peces cebra TABS AB de tipo salvaje en las instalaciones de dicho laboratorio, seleccionándose los animales de forma aleatoria. Los procedimientos de alimentación, cría y reproducción fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de los Andes (CICUAL). Las condiciones del medio, agua de huevo, fueron mantenidas a 28 °C, con una conductividad eléctrica de 650 μ S/cm, pH 7.5. Adicionalmente, el procedimiento fue llevado a cabo siguiendo la Guía para la prueba de químicos “*Guideline for testing of chemicals*” de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE)²¹¹.

Las pruebas fueron realizadas en placas de cultivo celular estériles de 6 pozos y el tratamiento con el péptido se realizó de manera crónica durante 72 horas, con un recambio durante la exposición. Este estudio se realizó utilizando embriones de tres días post-fertilización (dpf), siguiendo un diseño de bloques completamente al azar. El experimento se llevó a cabo a concentraciones altas y bajas de péptido. Inicialmente, se utilizaron 10 larvas para las concentraciones altas. Con base en los resultados obtenidos, se realizaron posteriormente tres réplicas, cada una con 15 larvas para las concentraciones bajas. El control negativo consistió en agua de huevo, que es el medio de crecimiento de los embriones.

7.10 Análisis estadístico

Se hizo uso del programa estadístico GraphPad Prism8, se realizaron las comparaciones entre los tratamientos evaluados mediante análisis de varianza ANOVA, seguido por test de comparaciones múltiples de Tuckey.

8 Resultados y discusión

8.1 Etapa 1: Elección de péptidos hit

En el grupo de investigación de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP), previamente se reportaron péptidos con actividad anticancerosa selectiva en células derivadas de cáncer de mama. En este trabajo dichos péptidos fueron evaluados para establecer si también ejercían efecto citotóxico selectivo contra las líneas de cáncer de colon HT-29 y Caco-2. En primer lugar, se sintetizaron y caracterizaron los péptidos incluidos en el objetivo específico 1. Además, se incluyeron dos péptidos: el péptido LfcinB (20-30) $\text{H}_2\text{N-RRWQWRMKKLG-CONH}_2$ el cual es la forma lineal del dímero LfcinB (20-30)₂ como control y el péptido dimérico $^{26}\text{[F]-LfcinB (20-30)}_2$ ($\text{H}_2\text{N-RRWQWRFKKG)}_2\text{-K-Ahx-CONH}_2$ análogo al péptido LfcinB (20-30)₂. Lo anterior obedece a que el péptido LfcinB (20-30)₂ ($\text{H}_2\text{N-RRWQWRMKKLG)}_2\text{-K-Ahx-CONH}_2$ presentó inestabilidad durante el almacenamiento, ya que el perfil cromatográfico del péptido almacenado mostró nuevas especies, posiblemente debido a la oxidación de la metionina. Igualmente, cuando se sustituyó la ^{26}Met por Phe se incrementó significativamente la actividad anticancerosa en células de cáncer de mama²⁰.

1. Síntesis de los péptidos

Se realizó la síntesis manual en fase sólida (SPPS) de los péptidos y los productos obtenidos fueron purificados mediante extracción en fase sólida (RP-SPE) y caracterizados mediante cromatografía líquida de alta resolución (RP-HPLC) y espectrometría de masas. Se sintetizaron péptidos lineales, diméricos y tetraméricos (**Figura 6**), la síntesis de los péptidos diméricos se realizó mediante la inclusión de un espaciador, el ácido 6-amino hexanoico (Ahx), el cual favorece el crecimiento de la cadena peptídica al disminuir el impedimento estérico, posteriormente se utilizó el aminoácido Fmoc-Lys(Fmoc)-OH, el cual tiene el grupo protector Fmoc en los grupos amino de las posiciones alfa y épsilon, permitiendo el crecimiento simultáneo de la cadena peptídica en dos brazos para obtener la forma dimérica. La formación del péptido tetramérico se llevó a cabo a partir del precursor dimérico que

contiene un residuo de cisteína en el extremo C-terminal. La formación del puente disulfuro mediante una reacción de oxidación conduce a la obtención del péptido tetramérico²⁰¹.

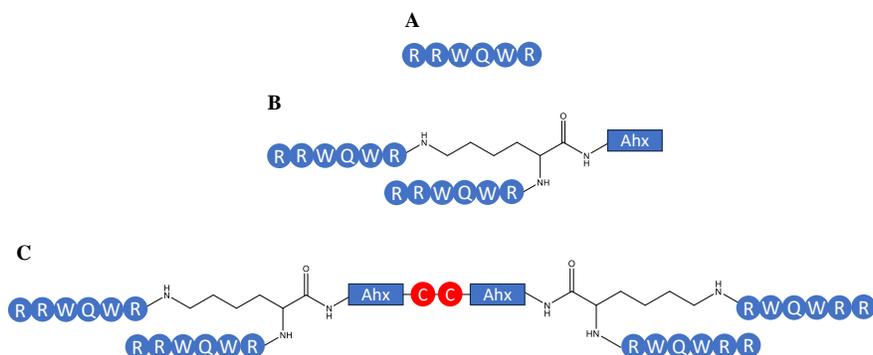


Figura 6: Representación de los péptidos monomérico, dimérico y tetramérico que contienen el motivo mínimo RRWQWR. LfcinB (20-25) H₂N-RRWQWR-CONH₂ (A), LfcinB (20-25)₂: (H₂N-RRWQWR)₂KAhx-CONH₂ (B) y LfcinB (20-25)₄: (H₂N-RRWQWR)₄K₂Ahx₂-C₂ (C). Adaptado de²¹².

Todos los péptidos fueron sintetizados, purificados y caracterizados por RP-HPLC y MS, los resultados de esta etapa se muestran en la **Tabla 3**. Los resultados experimentales mostraron que los péptidos lineales LfcinB (21-25)_{Pal}, LfcinB (20-25) y LfcinB (20-30) presentaron mayor facilidad de síntesis respecto a los péptidos LfcinB (20-25)₂, LfcinB (20-30)₂, ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, LfcinB (21-25)_{Pal2} y de los precursores diméricos para obtener el péptido LfcinB (20-25)₄, esto debido posiblemente al impedimento estérico causado por el crecimiento simultáneo de las dos cadenas.

Nombre	Secuencia	RP-HPLC		Masa monoisotópica [M] Da		Viabilidad sintética*
		t _r (min)	Pureza (%)	Teórica	Experim.	
LfcinB (20-25)	H ₂ N-RRWQWR-CONH ₂	4,9	93	985.536	985.5336	40
LfcinB (20-25) ₂	(H ₂ N-RRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	5,5	89	2195.236	2195.0485	32
LfcinB (20-25) ₄	((H ₂ N-RRWQWR) ₄ -K ₂ -Ahx ₂ -C ₂	5,6	99	2298.245	2295.10	22
LfcinB (20-30)	H ₂ N-RRWQWRMCKLG-CONH ₂	5,2	89	1542.872	1543.2710	31
LfcinB (20-30) ₂	(H ₂ N-RRWQWRMCKLG) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	5,6	85	3309.908	3309.9150	31
²⁶ [F] LfcinB (20-30) ₂	(H ₂ N-RRWQWRFKKLG) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	5,9	99	3341.964	3341.9736	31
LfcinB (21-25) _{Pal}	H ₂ N-RWQWRWQWR-CONH ₂	6,4	99	1485.753	1486.1404	40
LfcinB (21-25) _{Pal2}	(H ₂ N-RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	7,2	99	3195.670	3196.6716	28

Tabla 3: Caracterización de los péptidos obtenidos en la etapa 1. *La viabilidad sintética presentada se basa en resultados experimentales que se muestran en detalle en el numeral 3. Etapa 2. Esta se basa en el número de residuos, acoples, la pureza, los residuos hidrofóbicos y el número de aminoácidos naturales u otras conjugaciones.

El péptido tetramérico LfcinB (20-25)₄ presentó la mayor dificultad en la obtención debido a los bajos rendimientos causados principalmente por la reacción de oxidación para formar el puente disulfuro que permite la obtención del doble dímero^{21,213}. De acuerdo con los resultados experimentales, se estableció que la viabilidad sintética de los péptidos siguió el siguiente orden de mayor a menor viabilidad sintética: LfcinB (20-25) > LfcinB (21-25)_{Pal} > LfcinB (20-30) > LfcinB (20-25)₂ > ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂ > LfcinB (20-30)₂ > LfcinB (21-25)_{Pal2} > LfcinB (20-25)₄.

Los perfiles cromatográficos de los péptidos purificados presentaron una especie principal con purezas cromatográficas entre 85-99% y la masa experimental correspondió con la masa molecular esperada (Anexo 1). Los péptidos obtenidos en esta etapa fueron seleccionados para evaluar su efecto citotóxico en líneas celulares derivadas de cáncer de colon HT-29 y Caco-2.

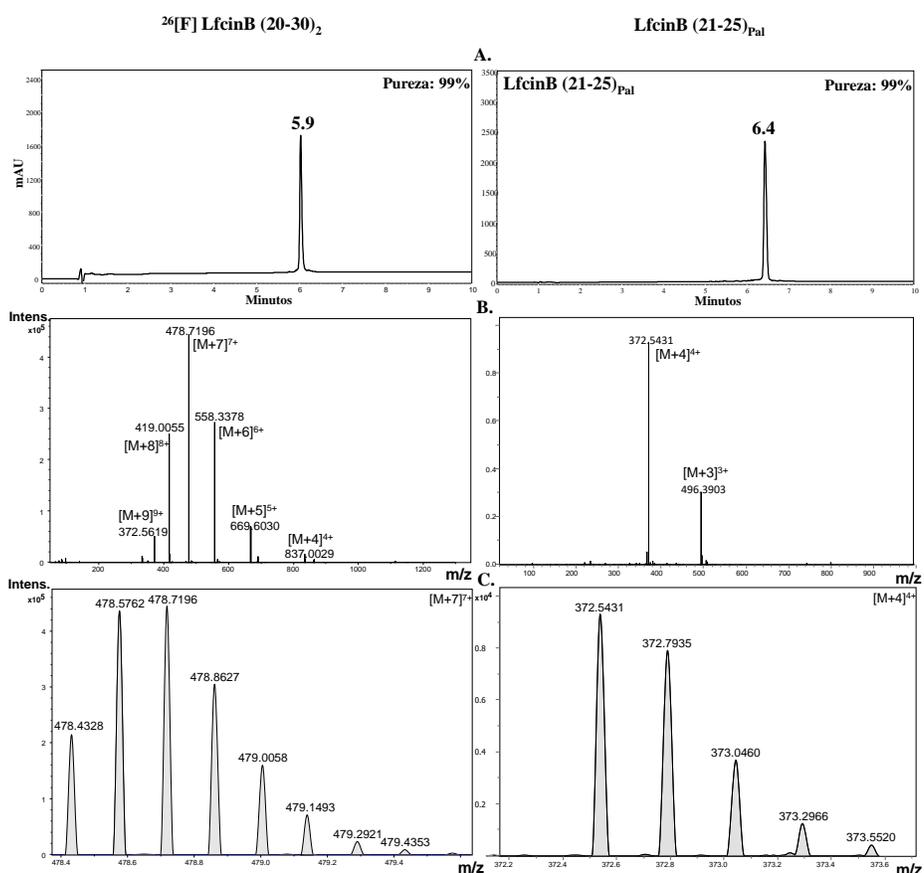


Figura 7: Perfiles cromatográficos y espectros de masas de los péptidos ²⁶[F] LfcinB (20-30)₂ y LfcinB(21-25)_{Pal}. A. Perfil cromatográfico, B. Espectro de masas, C. Ampliación del patrón isotópico del pico base.

Los espectros de masa obtenidos para los péptidos $^{26}\text{[F]-LfcinB (20-30)}_2$ y $\text{LfcinB (21-25)}_{\text{Pal}}$ se muestran en la

Figura 7. Para el péptido $^{26}\text{[F]-LfcinB (20-30)}_2$, se encontró un mayor número de especies multicargadas (al compararse con el péptido lineal), siendo mayoritarias las especies de $[\text{M}+8]^{8+}$, $[\text{M}+7]^{7+}$ y $[\text{M}+6]^{6+}$, adicionalmente, se presenta el patrón monoisotópico de la especie $[\text{M}+7]^{7+}$. A partir de la diferencia entre los valores de los picos de la distribución isotópica se determinó a que especie multicargada correspondía la señal mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{M} + z]^{z+}, \text{ donde } z \text{ es } = \frac{1}{\Delta m} \text{ (Ecuación 3)}$$

Para el péptido $^{26}\text{[F]LfcinB (20-30)}_2$ se tiene que:

$$Z_1 = \frac{1\text{Da}}{m_2 - m_1} = \frac{1\text{Da}}{478,5762 - 478,4328} = 6,97 = 7$$

Para determinar la masa del ión molecular se utiliza ecuación 4

$$\text{Masa del ion molecular} = M = (m_1 \times Z_1) - (m_{\text{Hidrógeno}} \times Z_1) \text{ (Ecuación 4)}$$

$$\text{Masa del ion molecular} = M = (478,4328 \times 7) - (1,008 \times 7) = 3341,9736 \text{ Da}$$

En cuanto al espectro de masas del péptido lineal solo se observaron dos especies $[\text{M}+4]^{4+}$ y $[\text{M}+3]^{3+}$, utilizando las ecuaciones 3 y 4 se obtiene que:

$$\text{Carga del ión}_1 = Z_1 = \frac{1\text{Da}}{372,7935 - 372,5431} = 3,99 = 4$$

$$\text{Masa del ion molecular} = M = (372,5431 \times 4) - (1,008 \times 4) = 1486.1404 \text{ Da}$$

De la misma forma se calcularon todos los valores de masa de los péptidos (**Tabla 3**).

2. Evaluación del efecto citotóxico de los péptidos frente a líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y Caco-2.

Las células HT-29 y Caco-2 se utilizan como modelos para el estudio del desarrollo del cáncer de colon y de diferenciación intestinal. La línea celular HT-29 ha presentado

capacidad de invasión y metástasis *in vivo*²¹⁴. Se ha reportado que ambas líneas celulares expresan los genes de multi-drogo resistencia ACN1, ABCC1 y ABCG2²¹⁵⁻²¹⁷.

Se evaluó el efecto citotóxico de los péptidos frente a estas líneas celulares y los resultados muestran que los péptidos LfcinB (20-25)₄, LfcinB (20-30)₂, ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, LfcinB (21-25)_{Pal} y LfcinB (21-25)_{Pal2} mostraron efecto citotóxico contra las líneas celulares evaluadas (**Tabla 4**). Se observa que a medida que se incrementó la concentración del péptido, la viabilidad celular disminuyó, sugiriendo que el efecto citotóxico de estos péptidos fue dependiente de la concentración del péptido. Mientras que el motivo mínimo de actividad LfcinB (20-25) no presentó efecto citotóxico significativo contra ambas líneas celulares a las concentraciones evaluadas (6,25-200µg/mL). Estos resultados concuerdan con reportes previos que muestran que el péptido LfcinB (20-25) no mostró efecto citotóxico contra líneas celulares derivadas de cáncer de mama. Este resultado también es acorde con lo reportado por Richardson y colaboradores, que muestran que el péptido RRWQWR, no tuvo efecto citotóxico contra células Jurkat, sin embargo, cuando el péptido fue internalizado en las células mediante liposomas ejerció un efecto citotóxico significativo, lo que sugiere que este péptido requiere internalizarse para ejercer su efecto^{23,218}.

Efecto citotóxico de los péptidos (IC₅₀) en líneas celulares derivadas de cáncer de colon				
Péptido	HT-29		Caco-2	
	µM	µg/mL	µM	µg/mL
LfcinB (20-25)	>203	>200	>203	>200
LfcinB (20-25) ₂	>91	>200	41	89
LfcinB (20-25) ₄	16	75	18	82
LfcinB (20-30)	>128	>200	>203	>200
LfcinB (20-30) ₂	48	154	28	90
²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	12	39	18	58
LfcinB (21-25) _{Pal}	100	149	86	127
LfcinB (21-25) _{Pal2}	34	108	12	40

Tabla 4: Efecto citotóxico *in vitro* de los péptidos sobre las líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y Caco-2.

Los resultados muestran que los péptidos polivalentes LfcinB (20-25)₄, LfcinB (20-30)₂, ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂ y LfcinB (21-25)_{Pal2} presentaron mayor efecto citotóxico que los péptidos lineales, evidenciando que la polivalencia de estas secuencias potenció el efecto citotóxico en las líneas de cáncer HT-29 y Caco-2 (**Figura 8**). Este comportamiento también se observó con el péptido LfcinB (20-25)₂ en las células Caco-2. Estos resultados están de

acuerdo con lo reportado previamente por Vargas y colaboradores que muestran que la polivalencia de estas secuencias potenció la actividad antibacteriana contra cepas Gram negativas y Gram positivas, como también el efecto citotóxico en líneas celulares derivadas de cáncer de mama MDA-MB 231 y MDA-MB-468^{20,201}.

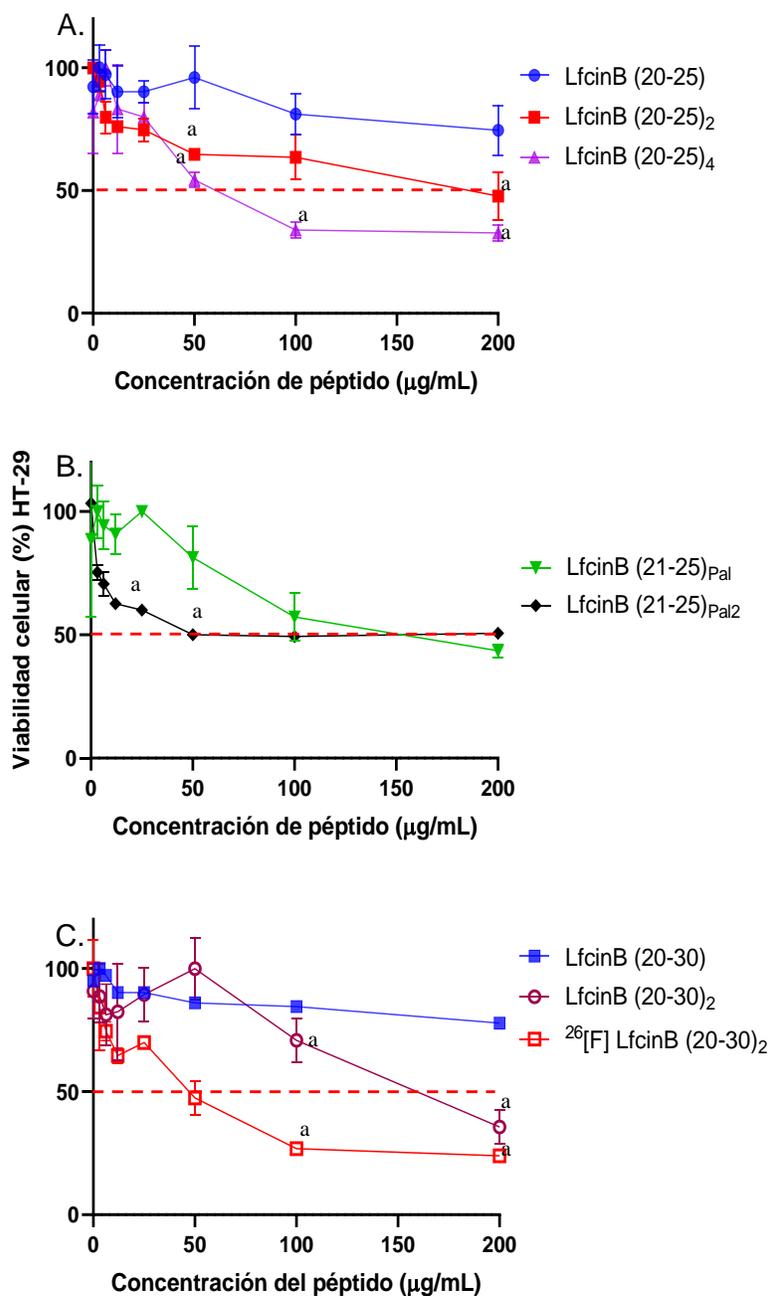


Figura 8: Efecto citotóxico de los péptidos en la línea celular HT-29. Las células fueron tratadas con los péptidos por 2 h y la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo MTT. (A) péptidos que contienen

la secuencia RRWQWR; (B) péptidos que contienen la secuencia RWQWRWQWR y (C) péptidos que contienen la secuencia RRWQWRMKLG o RRWQWRQRFKLG. Los datos se expresan como la media \pm SD (n = 3). Se realizó la prueba ANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas comparadas con el péptido lineal de cada familia ^ap < 0.05.

El péptido LfcinB (21-25)_{Pal} fue el único péptido lineal que presentó efecto citotóxico contra las células HT-29 y Caco-2 (IC₅₀= 100 y 86 μ M, respectivamente), aunque su dímero fue más activo, sin embargo, a la máxima concentración evaluada la viabilidad celular fue similar para ambos péptidos (**Figura 8**). Cabe resaltar que todos los péptidos presentaron menor actividad sobre la línea celular HT-29 comparada con Caco-2, sugiriendo que esta última fue más sensible a los tratamientos.

Con el objetivo de minimizar el número de ensayos, a partir de estos resultados, se definió que para las etapas 2 y 3, los péptidos que presenten efecto citotóxico significativo en las células HT-29 serán evaluados en las otras líneas celulares cancerosas y no cancerosas. Además, se ha reportado que la línea celular HT-29 posee alta estabilidad en el genoma durante gran variedad de pases, siendo un modelo ideal para los estudios *in vitro* ²¹⁹.

3. Evaluación del efecto citotóxico contra líneas celulares no cancerosas (Fibroblastos y HEK-293)

La selectividad es un parámetro importante en la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento frente al cáncer de colon. En el estudio *in vitro*, normalmente se evalúa la selectividad comparando el efecto citotóxico de las moléculas en células cancerosas y no cancerosas. En este sentido se evaluó el efecto citotóxico de los péptidos frente a fibroblastos normales y la línea HEK 293 (**Tabla 5**).

Los resultados muestran que los péptidos LfcinB (20-25) y LfcinB (20-25)₂ no presentaron efecto citotóxico sobre las líneas no cancerosas a las concentraciones evaluadas, en forma similar a lo observado en los ensayos con las líneas HT-29 y Caco-2. Estos resultados sugieren que el péptido LfcinB (20-25) no ejerce efecto citotóxico sobre líneas celulares cancerosas y no cancerosas y están acordes con previos reportes que muestran que este péptido no presentó efecto citotóxico contra líneas celulares de cáncer de mama²¹.

De igual forma se evidenció que los péptidos LfcinB (20-25)₄ y LfcinB (21-25)_{Pal2} fueron más tóxicos para las células no cancerosas que sus péptidos análogos lineales, lo cual sugiere que estos péptidos posiblemente causen mayor disrupción de membrana, lo que es característico de los péptidos polivalentes²²⁰. Por otra parte, la inclusión del residuo Phe en el péptido ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, no modificó significativamente la selectividad, cuando se comparó con su péptido análogo LfcinB (20-30)₂ (**Figura 9**).

Efecto citotóxico (IC₅₀) de los péptidos en células no cancerosas				
Péptido	Fibroblastos		HEK 293	
	μM	μg/mL	μM	μg/mL
LfcinB (20-25)	>203	>200	>203	>200
LfcinB (20-25) ₂	>91	>200	>91	>200
LfcinB (20-25) ₄	31	143	30	137
LfcinB (20-30) ₂	38	122	27	86
²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	34	111	22	72
LfcinB (21-25) _{Pal}	>135	>200	68	101
LfcinB (21-25) _{Pal2}	34	108	36	116

Tabla 5: Efecto citotóxico de los péptidos sobre las líneas celulares no cancerosas fibroblastos y HEK-293.

La selectividad de los péptidos por las células cancerosas se determinó mediante el índice de selectividad (IS), el cual es la relación de los valores IC₅₀ del péptido en la célula no cancerosa y el IC₅₀ del péptido en la célula cancerosa (Ecuación 1). Cuando los péptidos presentaron un IC₅₀>200 μg/mL el índice se determinó usando el valor de 200 y colocando el signo > (**Tabla 6**). Los resultados muestran que los péptidos LfcinB (20-25)₄, ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, y LfcinB (21-25)_{Pal2} presentaron un IS mayor a 1 en la mayoría de los casos, indicando que estos péptidos tienen actividad anticancerosa selectiva por las células de cáncer. De igual forma el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} presentó un valor de IS mayor que 1 cuando se evaluó sobre fibroblastos, que es un cultivo primario. Mientras que el péptido LfcinB (20-30)₂ presentó selectividad por las células Caco-2 cuando se compara con fibroblastos. Se debe resaltar que el péptido ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂ presentó el mayor IS en todos los casos, siendo este un péptido de interés por su selectividad.

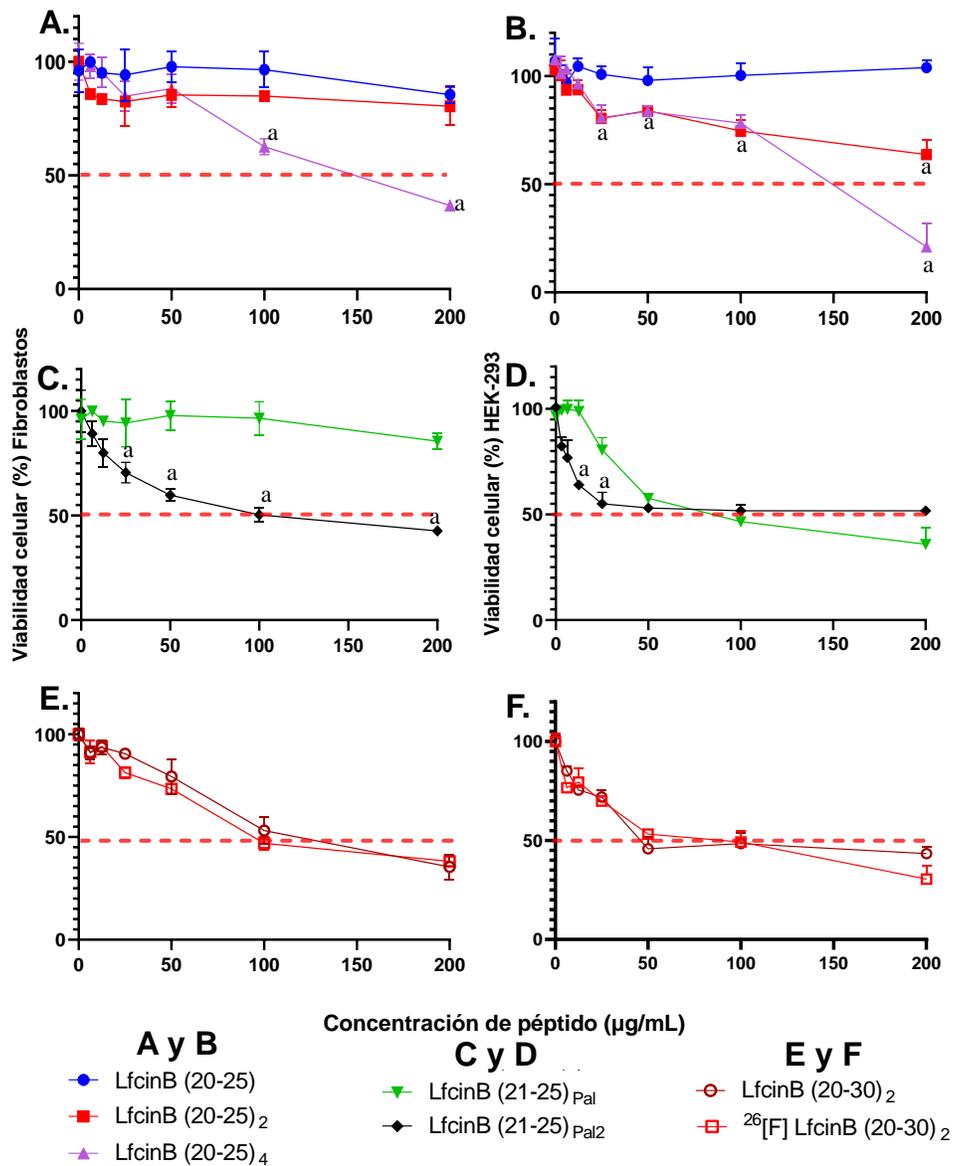


Figura 9: Efecto citotóxico de los péptidos en las células no cancerosas (fibroblastos y HEK-293). Las células fueron tratadas con los péptidos por 2h y la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo MTT, Fibroblastos (izquierda) y HEK 293 (derecha). (A y B) péptidos que contienen la secuencia RRWQWR; (C y D) péptidos que contienen la secuencia RWQWRWQWR y (D y E) péptidos que contienen la secuencia RRWQWRMKLG o RRWQWRFKLG. Los datos se expresan como la media \pm SD (n = 3). Se realizó una prueba ANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas comparadas con el péptido lineal de cada familia ^ap < 0.001.

Péptido	Índice de selectividad de los péptidos derivados de LfcinB			
	IC ₅₀ HEK 293/ IC ₅₀ HT-29	IC ₅₀ Fibroblastos/ IC ₅₀ HT-29	IC ₅₀ HEK 293/ IC ₅₀ Caco-2	IC ₅₀ Fibroblastos/ IC ₅₀ Caco-2
LfcinB (20-25) ₄	1.8	1.9	1.7	1.7
LfcinB (20-30) ₂	0.6	0.8	1.0	1.4
²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	1.8	2.8	1.2	1.8
LfcinB (21-25) _{Pal}	0.7	>1.3	0.8	1.6
LfcinB (21-25) _{Pal2}	1.1	1.0	2.9	2.7

Tabla 6: Índice de selectividad para los péptidos derivados de la LfcinB.

Para la selección de los péptidos hit, se definieron los siguientes criterios:

- (i) La viabilidad sintética, ya que la facilidad de síntesis es un factor relevante que se debe considerar para obtener los péptidos funcionalizados.
- (ii) El efecto citotóxico presentado en las líneas celulares HT-29 y Caco-2, ya que al presentar efecto citotóxico significativo en ambas células sugiere que el péptido puede presentar actividad anticancerosa de amplio espectro en líneas celulares de cáncer de colon.
- (iii) El índice de selectividad es un factor importante, ya que este indica que el péptido presenta mayor actividad contra las líneas cancerosas respecto a las no cancerosas.

Haciendo el análisis global de los resultados se evidenció que los péptidos con actividad citotóxica contra ambas líneas celulares derivadas de cáncer de colon fueron: LfcinB (20-25)₄, ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, LfcinB (21-25)_{Pal} y LfcinB (21-25)_{Pal2}. De acuerdo con los resultados de síntesis, el orden de mayor viabilidad a menor viabilidad fue: LfcinB (21-25)_{Pal} > ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂ > LfcinB (21-25)_{Pal2} > LfcinB (20-25)₄. Se determinó que la síntesis del péptido tetramérico presentó la menor viabilidad sintética debido al proceso de oxidación del doble dímero que afectó los rendimientos y la pureza (Etapa 3).

Teniendo en cuenta estos factores se seleccionaron los péptidos hit:

- (i) LfcinB (21-25)_{Pal}, H₂N-RWQWRWQWR-CONH₂ al ser un péptido lineal la facilidad de síntesis es el factor primordial, además permitirá establecer si la funcionalización de esta secuencia potencia la actividad anticancerosa.

- (ii) $^{26}\text{[F]}$ -LfcinB (20-30)₂ (H₂N-RRWQWRFKKLG)₂-K-Ahx-CONH₂ presentó la mayor selectividad, y nos permitirá establecer la facilidad/dificultad de la funcionalización de esta secuencia dimérica y si es posible potenciar su actividad.

El péptido LfcinB (21-25)_{Pal} es un péptido simétrico, dicha característica es deseada en el diseño de péptidos, debido a que se ha reportado que esta aproximación permite mejorar la traslocación necesaria para ejercer la disrupción de la membrana y mejora la selectividad y la estabilidad²²¹⁻²²³, la investigación en estos péptidos simétricos se ha centrado principalmente en el estudio de péptidos antimicrobianos, sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la actividad antimicrobiana tiende a correlacionarse con la actividad anticancerígena. Algunos de estos péptidos simétricos han presentado efecto antimicrobiano potenciado, como el péptido NH₂-FRRWWRRF-NH₂ o el péptido NH₂-LWRRRRWWL-NH₂^{221,224}. De la misma forma, el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} ha presentado efecto antimicrobiano, antifúngico y anticancerígeno^{22,225-227}, lo que lo hace un péptido de interés como péptido hit, sin embargo, este también presenta un reto para potenciar su actividad, debido a que se ha encontrado en cáncer de mama que cada uno de sus residuos es esencial para retener la actividad²².

Por otro lado, el péptido $^{26}\text{[F]}$ -LfcinB (20-30)₂ (H₂N-RRWQWRFKKLG)₂-K-Ahx-CONH₂, tiene como base la secuencia lineal LfcinB (20-30), la cual ha presentado actividad antimicrobiana²²⁸, sin embargo, por sí misma, no posee un buen efecto citotóxico, ni frente a líneas celulares de cáncer de colon, como se demostró en este trabajo, ni frente a líneas celulares de cáncer gástrico, siendo necesario la elongación de la cadena¹⁰⁶. Es por este motivo, que la dimerización se presenta como una de las estrategias para potenciar la actividad de mayor impacto, como se demostró para este péptido dimérico frente a líneas celulares de cáncer de mama²⁰.

4. Evaluación del efecto citotóxico de los péptidos hit frente a línea celular de cáncer de colon (HCT-116)

El efecto citotóxico de los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal} y $^{26}\text{[F]}$ -LfcinB (20-30)₂ fue evaluado en la línea celular de cáncer de colon HCT 116 (**Tabla 7, Figura 10**), para establecer si estos péptidos también presentaban efecto contra otra línea celular derivada de cáncer de colon.

Los resultados muestran que los dos péptidos presentaron efecto citotóxico selectivo contra esta línea celular derivada de cáncer de colon. Como en los resultados anteriores el péptido $^{26}\text{[F]}\text{-LfcinB (20-30)}_2$ presentó mayor actividad que el péptido $\text{LfcinB (21-25)}_{\text{Pal}}$, y ambos péptidos presentaron mayor efecto citotóxico contra esta línea comparada con lo observado en las líneas HT-29 y Caco-2, sugiriendo que la línea celular HCT-116 es la más sensible. Además, los índices de selectividad muestran que estos péptidos son más selectivos por las células HCT-116.

Péptido	IC ₅₀ HCT 116		Índice de selectividad	
	μM	μg/mL	IC ₅₀ HEK 293/ IC ₅₀ HCT 116	IC ₅₀ Fibroblastos/ IC ₅₀ HCT 116
	$^{26}\text{[F]}\text{-LfcinB (20-30)}_2$	7	22	5.0
$\text{LfcinB (21-25)}_{\text{Pal}}$	40	60	1.7	>3.3

Tabla 7: Efecto citotóxico de los péptidos hit en la línea celular derivada de cáncer de colon HCT 116, tratada durante 2h con los péptidos (n=3).

Estos resultados sugieren que estos péptidos son de amplio espectro de actividad contra líneas celulares derivadas cáncer de colon ya que presentan efecto citotóxico selectivo contra las líneas HT-29, HCT-116 y Caco-2. Es importante resaltar que la línea HCT-116 tiene características del subtipo de cáncer de colon con inestabilidad del microsatélite (CMS1), el cual es altamente inmunogénico e hipermutado, principalmente con mutaciones BRAF, lo cual es de interés debido a su similitud con casos homogéneos de cáncer de colon⁵⁶⁻⁶⁰. Dentro de las tres líneas celulares evaluadas, se puede encontrar que la línea celular HT-29 fue la más resistente, esta línea celular es altamente utilizada en investigación, es tumorogénica, mantiene su estabilidad fenotípica y genotípica a través de gran cantidad de pasajes²¹⁹, siendo esta la que se utilizará como línea principal de estudio.

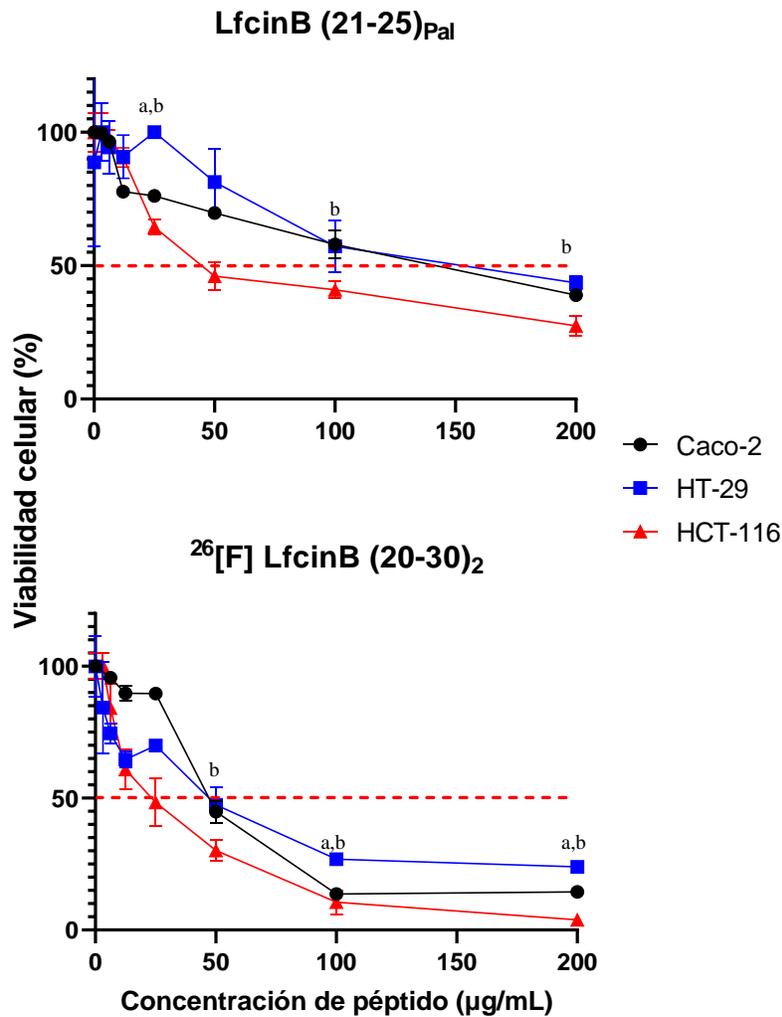


Figura 10: Efecto citotóxico de los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal} y ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂ en las líneas celulares de cáncer de colon (Caco-2, HT-29 y HCT-116). Las células fueron tratadas con el péptido durante 2h y la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de MTT. Los datos se expresan como la media ± SD (n = 3). Se realizó una prueba ANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas: ^aentre la línea celular HT-29 y Caco-2, ^bentre la línea celular HT-29 y HCT-116, p < 0.05.

En cuanto a la morfología de las células, se observó un comportamiento normal ante la ausencia de tratamiento, sin embargo, a las dos horas de tratamiento, se observaron cambios morfológicos tales como: compromiso de la membrana citoplasmática, pérdida de las extensiones y redondeamiento, encogimiento celular y formación de vesículas, encontrando que la mayor afectación es causada por el péptido dimérico ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂ (**Figura 11**). Por otro lado, la morfología de fibroblastos no tuvo modificaciones considerables cuando las células fueron tratadas con el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} y hubo leve

desprendimiento y encogimiento celular al ser tratadas con $^{26}\text{[F]}\text{-LfcinB (20-30)}_2$. Este resultado sugiere la mayor selectividad de los péptidos por las células de cáncer.

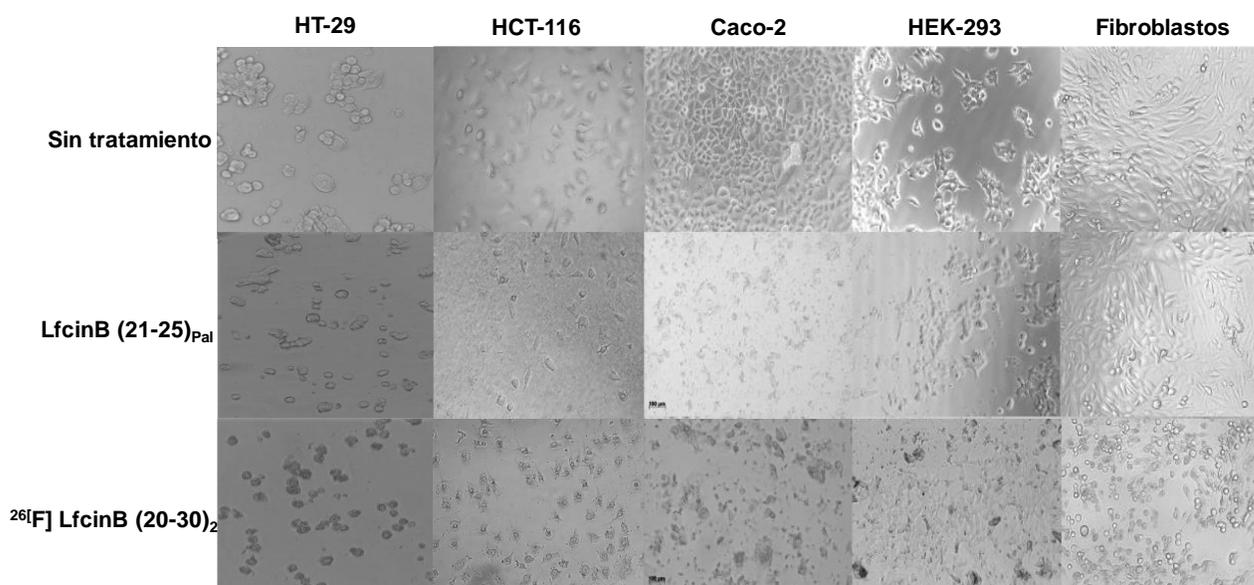


Figura 11: Micrografía de células de cáncer de colon (HT-29, HCT-116, Caco-2) y células control (HEK-293 y fibroblastos normales) tratadas con los péptidos hit (200 $\mu\text{g/mL}$), utilizando una cámara AxioCam ICc1 (barra de escala: 100 μm).

Los resultados obtenidos de esta etapa permitieron alcanzar los siguientes logros (**Figura 12**):

- Se obtuvieron los péptidos mediante SPPS-Fmoc/tBu con alta pureza y la masa experimental correspondió con la masa teórica.
- Hasta la literatura consultada, este es el primer reporte que muestra que los péptidos LfcinB (20-25)₄, LfcinB (20-25)₂, LfcinB (20-30)₂, $^{26}\text{[F]}\text{-LfcinB (20-30)}_2$, LfcinB (21-25)_{Pal}, LfcinB (21-25)_{Pal2} tienen efecto citotóxico en líneas celulares derivadas de cáncer de colon HT-29 y Caco-2, el cual es rápido y dependiente de la concentración.
- Los péptidos indujeron cambios morfológicos en las líneas celulares derivadas de cáncer de colon, causando encogimiento, formación de vesículas y redondeamiento en la célula.
- Se determinó que los péptidos $^{26}\text{[F]}\text{-LfcinB (20-30)}_2$, LfcinB (21-25)_{Pal}, LfcinB (21-25)_{Pal2} presentaron la mayor selectividad frente a las dos líneas de cáncer de colon HT-29 y Caco-2.

- Los péptidos $^{26}\text{[F]}$ -LfcinB (20-30)₂, LfcinB (21-25)_{Pal} también presentaron efecto citotóxico selectivo y dependiente de la concentración en la línea celular derivada de cáncer de colon HCT 116, indicando que estos péptidos pueden tener efecto frente a diversos subtipos de cáncer de colon.
- Los péptidos $^{26}\text{[F]}$ -LfcinB (20-30)₂ y LfcinB (21-25)_{Pal} fueron seleccionados como péptidos hit para construir las librerías de péptidos en la etapa 2.
- Se cumplió con el primer objetivo específico planteado en este trabajo

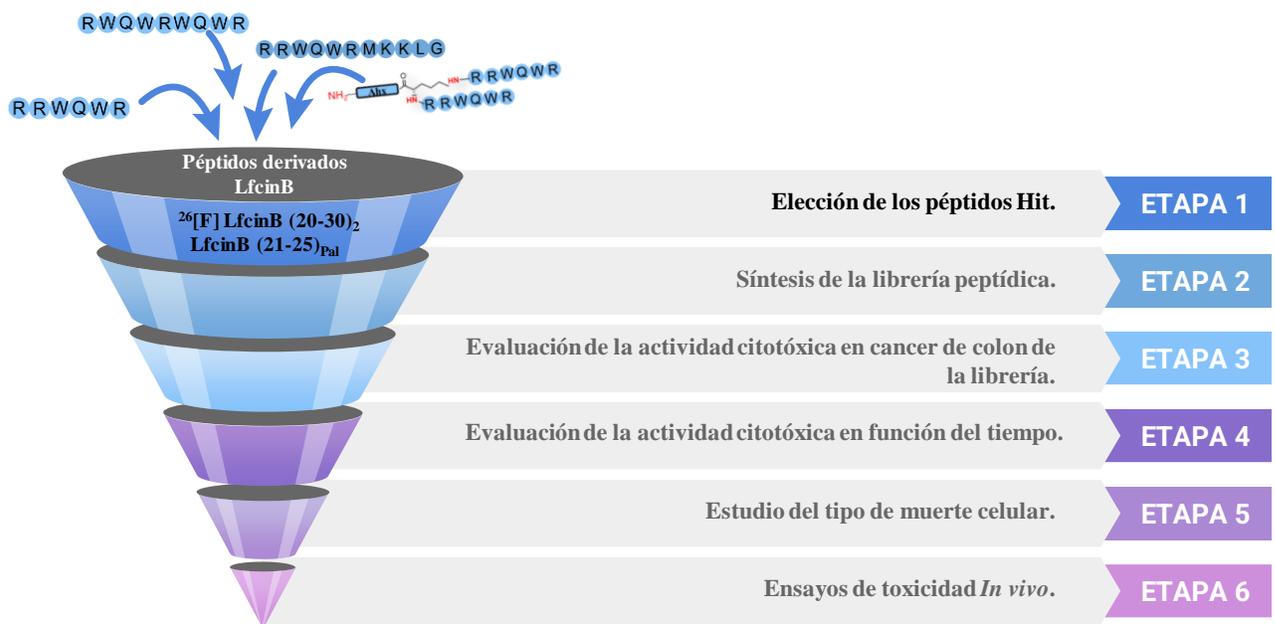


Figura 12: Etapa 1: Elección de péptidos Hit. Esta etapa finaliza con la identificación de los dos péptidos hit para realizar la síntesis de la librería peptídica.

8.2 Etapa 2: Síntesis de la librería peptídica

8.2.1 Obtención de la librería del péptido hit LfcinB (21-25)_{Pal}

A partir de la secuencia del LfcinB (21-25)_{Pal} se sintetizó una librería de péptidos que incluyó las siguientes modificaciones:

- i) N-biotinilación
- ii) N-lipidación,
- iii) N-acetilación,
- iv) Cambios secuenciales de Arg/Orn,
- v) N-PEGilación,
- vi) Cambio de L-Arg del extremo N terminal por D-Arg
- vii) Inclusión de Ahx en el N-terminal
- viii) Dimerización de la secuencia

Caracterización de los péptidos derivados del péptido LfcinB (21-25) _{Pal}						
Código	Secuencia	RP-HPLC		Masa Monoisotópica [M]		
		t _R (min)	Área (%)	Teórica	Experimental	
LfcinB(21-25) _{Pal}	H ₂ N-RWQWRWQWR-CONH ₂	6,4	99	1485.753	1486.1404	
1	H ₂ N-Orn-WQWRWQWR-CONH ₂	6,4	95	1443.659	1443.7384	
2	H ₂ N RWQW-Orn-WQWR-CONH ₂	6,4	96	1443.659	1443.6136	
3	H ₂ N-RWQWRWQW-Orn-CONH ₂	6,3	94	1443.659	1443.7212	
4	H ₂ N- ^d RWQWRWQWR-CONH ₂	6,4	89	1485.753	1485.7420	
5	H ₂ N- ^d RWQW-Orn-WQWR-CONH ₂	6,3	95	1443.659	1443.7240	
6	H ₂ N- ^d RWQWRWQW-Orn-CONH ₂	6,3	95	1443.659	1443.7350	
7	H ₂ N Ahx-RWQWRWQWR-CONH ₂	6,3	99	1598.837	1598.8248	
8	Biotina-Ahx-RWQWRWQWR-CONH ₂	6,9	91	1825.157	1824.9063	
9	Amy-RWQWRWQWR-CONH ₂	4,3*	94	1683.05	1688.46	
10	Pam-RWQWRWQWR-CONH ₂	5,0*	99	1711.10	1721.46	
11	miniPEG-RWQWRWQWR-CONH ₂	6,5	97	1631.831	1631.8326	
12	Ac-Ahx-RWQWRWQWR-CONH ₂	6,6	98	1640.848	1640.8434	
LfcinB(21-25) _{Pal2}	(H ₂ N RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	7,2	99	3195.670	3196.6716	
13	(H ₂ N Ahx-RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	7,1	99	3422.838	3422.8376	
14	(H ₂ N RWQWRWQW-Orn) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	7,2	97	3111.642	3111.6287	
15	(Ac-RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	7,4	91	3280.713	3280.6926	
LfcinB (20-25)	H ₂ N RRWQWR-CONH ₂	4,9	93	985.536	985.5336	
16	H ₂ N-Ahx-RRWQWR-CONH ₂	5,0	98	1098.620	1098.6282	
17	Biotina-Ahx-RRWQWR-CONH ₂	5,7	95	1324.940	1324.7175	

Tabla 8: Caracterización de las librerías de los péptidos hit LfcinB (21-25)_{Pal} y LfcinB (20-25). Ácido amino hexanoico (Ahx), CH₃CO (Ac), Ornitina (Orn), ácido palmítico (Pam), ácido mirístico (Amy), ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (miniPEG).*El método de análisis de estos péptidos utilizó un gradiente con concentraciones mayores de ACN, debido a la alta hidrofobicidad de las moléculas.

Se realizó la síntesis de los péptidos derivados de LfcinB (21-15)_{Pal} de forma manual mediante SPPS-Fmoc/tBu, su purificación mediante RP-SPE y la caracterización mediante

RP-HPLC y LC-MS (**Tabla 8**). Para la optimización del tiempo, recursos y facilitar la síntesis, cuando fue posible, se sintetizaron simultáneamente varios péptidos partiendo de un reactor y dividiendo la resina-péptido según fuese necesario de acuerdo con la secuencia requerida. Para ejemplificar dicho caso se presenta la **Figura 13**, en donde se muestra la síntesis simultánea a partir de un solo reactor de los péptidos LfcinB(21-25)_{Pal} y los derivados **1**, **2**, **3** y **5**.

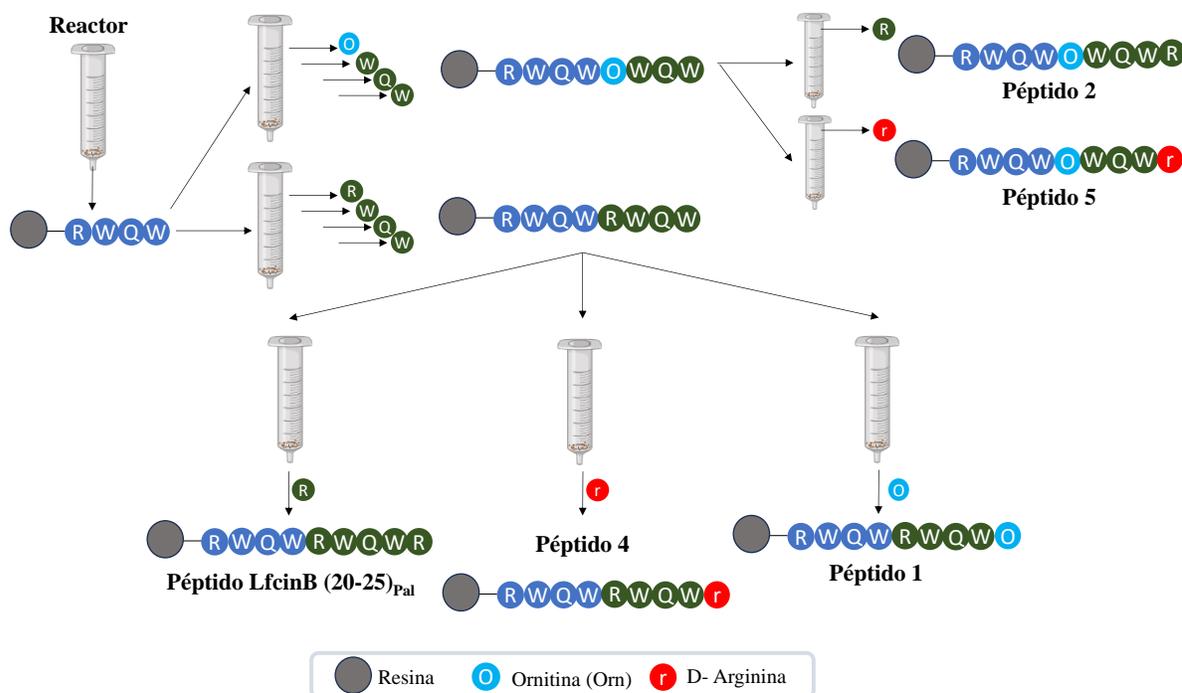


Figura 13: Ejemplificación del proceso de síntesis simultánea de los péptidos **1** (H_2N -**Orn**-WQWRWQWR- $CONH_2$), **2** (H_2N -RWQW-**Orn**-WQWR- $CONH_2$), **4** (H_2N -^dRWQWRWQWR- $CONH_2$), **5** (H_2N -^dRWQW-**Orn**-WQWR- $CONH_2$) y el péptido LfcinB (21-25)_{Pal}.

Para dicha síntesis, en el reactor 1, inicialmente se sintetizó la secuencia Resina-RWQW, la cual es común para todos los péptidos. Posteriormente se dividió la resina-péptido en dos reactores (2 y 3). En el reactor 2 se procedió con la síntesis hasta obtener la secuencia Resina-RWQWOWQW, luego se dividió esta resina-péptido en dos partes (reactores 2a y 2b) para obtener los péptidos **2** y **5**. Mientras que en el reactor 3 se procedió con la síntesis hasta alcanzar la secuencia Resina-RWQWRWQW y la resina-péptido se dividió en tres partes (reactores 3a, 3b y 3c) para obtener los péptidos LfcinB(21-25)_{Pal}, **1** y **4**.

Construcción de la librería de péptidos: A continuación, se describen las modificaciones realizadas a la secuencia palindrómica y el efecto de las modificaciones sobre la síntesis.

- **Cambios secuenciales Arg/Orn (Péptidos 1, 2 y 3):** El péptido palindrómico LfcinB (21-25)_{Pal} H₂N-RWQWRWQWR-CONH₂, contiene 3 residuos de Arg flanqueadas por el motivo WQW. En la síntesis del péptido por SPPS, el residuo de Arg se acopló a la cadena utilizando el aminoácido Fmoc-Arg(Pbf)-OH (**Figura 16**). La Arg contiene en su cadena lateral el grupo guanidino, el cual es altamente nucleofílico y está protegido con el 2,2,4,6,7-pentametildihidrobencofurano-5-sulfonilo (Pbf) que es un grupo voluminoso y altamente rico en electrones. Por lo anterior el anclaje de este aminoácido a la cadena peptídico-resina creciente se dificulta principalmente por el impedimento estérico. La remoción de este grupo protector durante el desanclaje del péptido de la resina requiere altas concentraciones de TFA y mayor tiempo de reacción^{229,230}. Este aminoácido es costoso y cuando en una secuencia se encuentra más de una Arg el costo y la dificultad de la síntesis se incrementa significativamente. El reemplazo de la Arg por Orn facilitó la síntesis y además al ser un aminoácido no natural puede incrementar la resistencia a la degradación proteolítica. La Orn también tiene carga positiva, por lo que el cambio de la Arg por Orn no afectó significativamente la carga neta ni la anfipaticidad del péptido. Las sustituciones fueron realizadas en forma secuencial para facilitar la síntesis, disminuir los costos y determinar el efecto de cada cambio en la actividad (**Tabla 8**). El grupo amino de la cadena lateral de la Orn está protegido con el grupo terc-butiloxicarbonilo (Boc), un grupo pequeño y lábil en medio ácido²³¹.
- **Sustitución de L-Arg por D-Arg en el extremo N-terminal y/o sustitución de L-Arg por L-Orn (Péptidos 4, 5 y 6):** El péptido LfcinB (21-25)_{Pal} contiene L-aminoácidos y se decidió cambiar el residuo del extremo N-terminal L-Arg por D-Arg, debido a que este sitio es lábil a la proteólisis por N-peptidasas. La incorporación de la D-Arg en esta posición no causó un cambio significativo en la síntesis por lo que la viabilidad sintética de los péptidos fue similar a la del péptido LfcinB (21-25)_{Pal}. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la pureza de los péptidos (**Figura 14**).

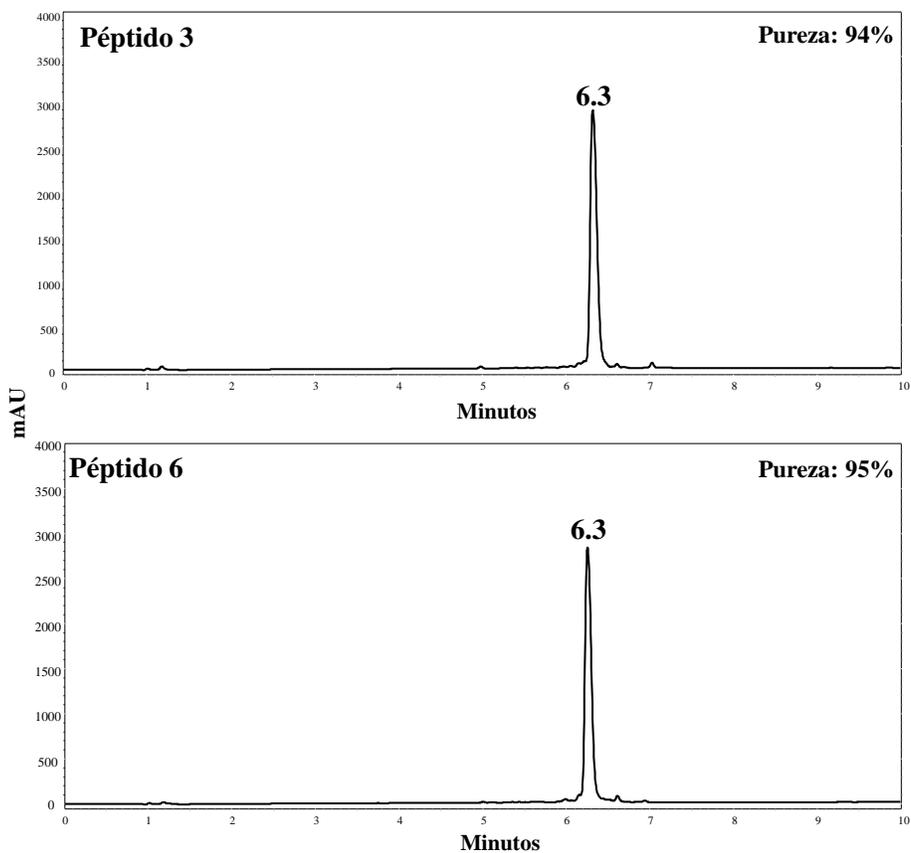


Figura 14: Perfiles cromatográficos de los péptidos puros **3** ($\text{H}_2\text{N-RWQWRWQW-Orn-CONH}_2$) y **6** ($\text{H}_2\text{N-}^{\text{d}}\text{RWQWRWQW-Orn-CONH}_2$).

La síntesis y purificación de los péptidos **1-6**, procedió de manera similar y no se encontraron diferencias significativas en la viabilidad sintética de los péptidos (**Figura 15**). La inclusión de la Fmoc-Orn(OtBu)-OH en la cadena peptídica requirió un solo ciclo de reacción de acople, mientras que la Fmoc-Arg(Pbf)-OH, en algunas de las posiciones de la cadena peptídica, requirió dos ciclos de acople. La inclusión de Fmoc-Orn(OtBu)-OH facilitó la síntesis ya que la inclusión de este aminoácido redujo el número de reacciones de acople.

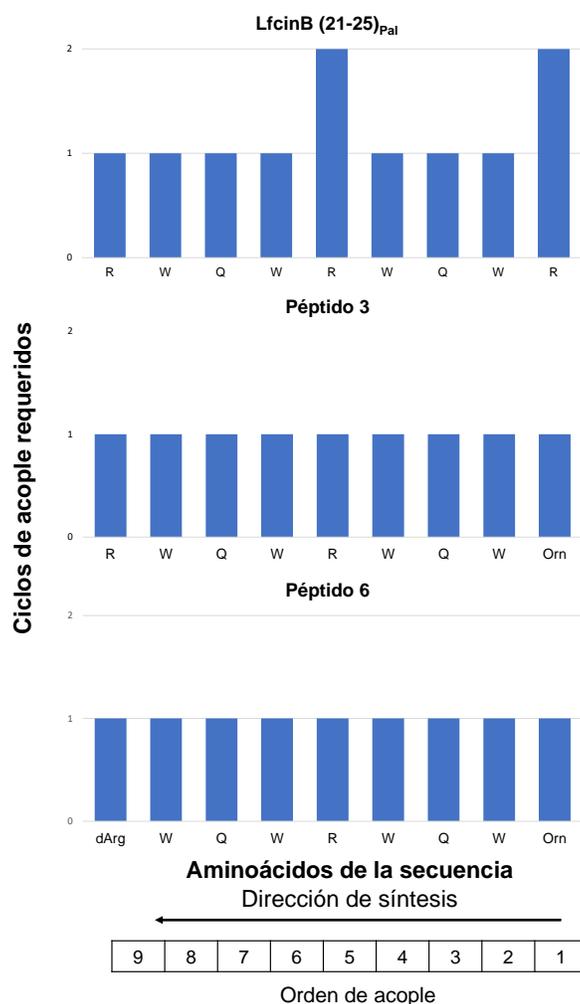


Figura 15: Número de ciclos de reacción requeridos para incorporar el Fmoc-aminoácido a la cadena peptídica creciente unida a la resina para los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal}, **3** (H₂N-RWQWRWQW-Orn-CONH₂) y **6** (H₂N-^dRWQWRWQW-Orn-CONH₂).

Incorporación de moléculas de naturaleza no peptídica en el extremo N-terminal de la secuencia palindrómica (Péptidos 7-12):

La inclusión de moléculas no peptídicas en el extremo N-terminal se realizó para establecer si la naturaleza de la molécula a incluir afectaba la síntesis y la purificación de las moléculas. Los péptidos **7-12** fueron obtenidos sin mayores dificultades y con purezas cromatográficas mayores al 91%, sugiriendo que la inclusión de estas moléculas no afectó el proceso sintético, siendo esta similar al péptido palindrómico (**Figura 16**). La masa experimental determinada por MS concuerda con la masa esperada en todos los casos, indicando que se obtuvieron los péptidos modificados (Anexo 1).

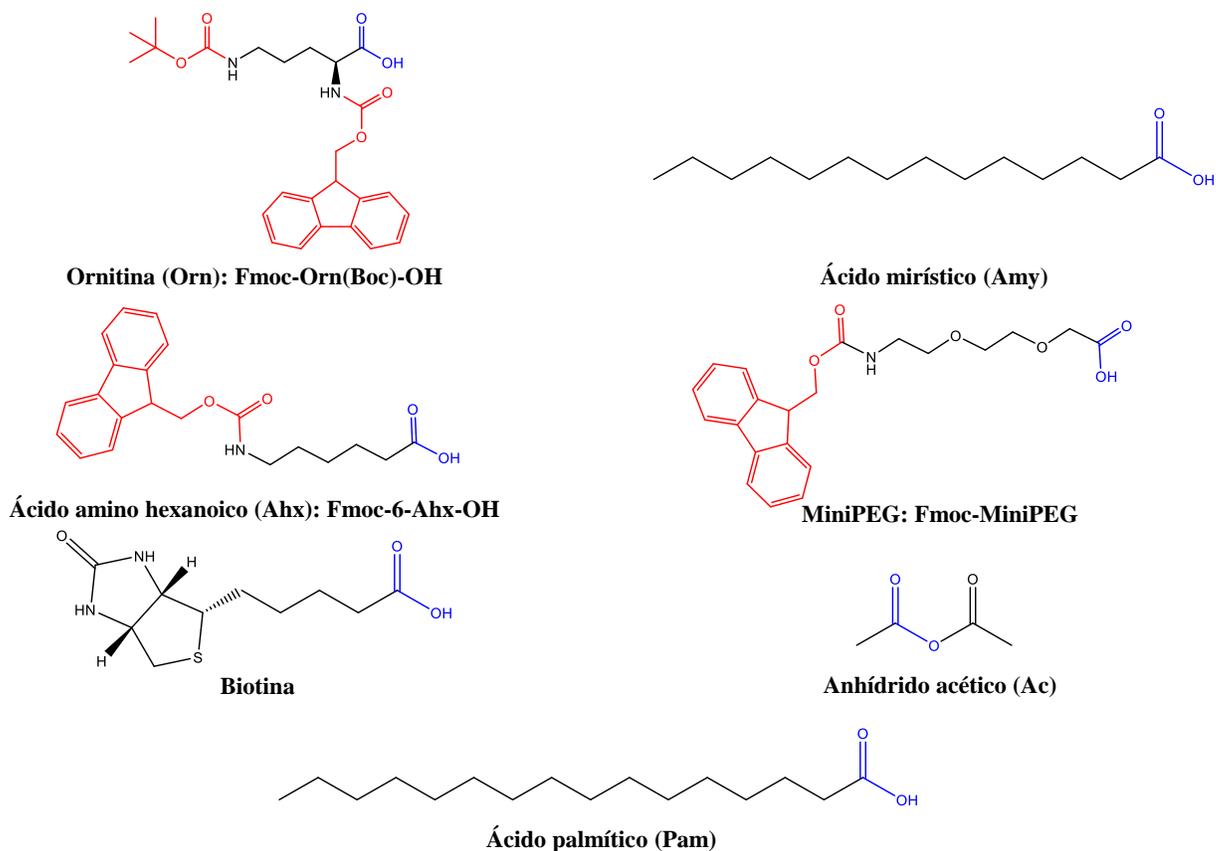


Figura 16: Moléculas unidas al extremo N-terminal del péptido LfcinB (21-25)_{Pal}, la estructura corresponde a la molécula utilizada en síntesis. En azul se presenta el grupo funcional ácido carboxílico el cual permite la formación del enlace amida con el grupo amino anclado a la resina y en rojo, los grupos protectores.

Además, se estableció que el proceso de purificación fue similar para todos los péptidos y no influyó en la pureza obtenida, indicando que la incorporación de moléculas de diferentes tamaños y polaridad no afectó el proceso de purificación. Estos resultados sugieren que la funcionalización de la secuencia palindrómica en el extremo N-terminal es viable (**Figura 17**).

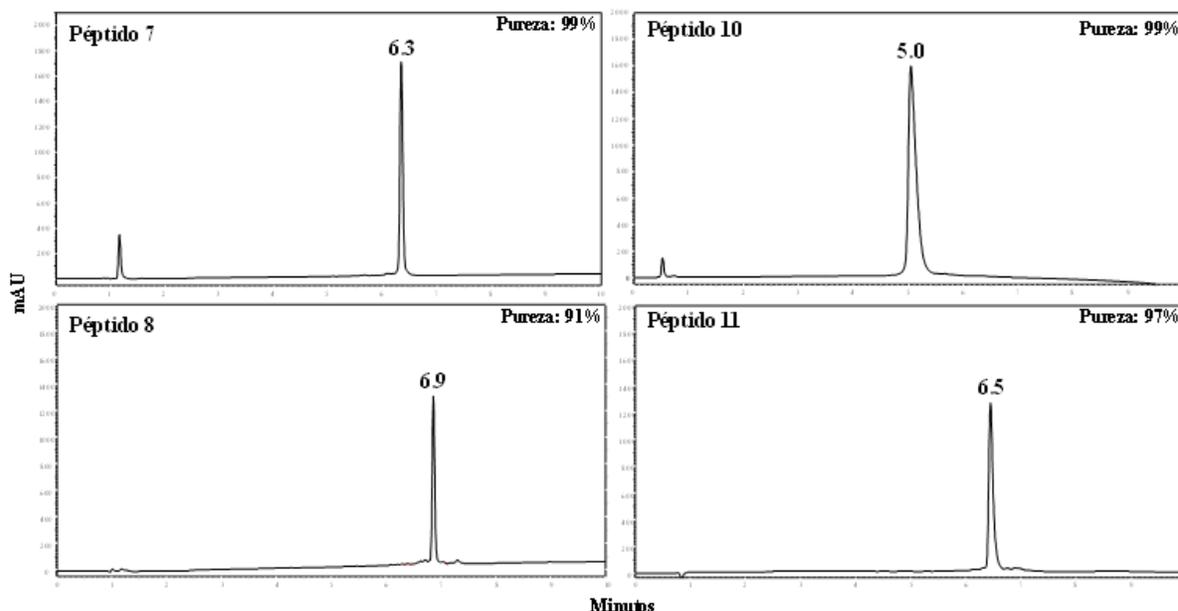


Figura 17: Perfiles cromatográficos de los péptidos puros **7** ($\text{H}_2\text{N-Ahx-RWQWRWQWR-CONH}_2$), **8** (Biotina-Ahx-RWQWRWQWR- CONH_2), **10** (Pam-RWQWRWQWR- CONH_2) y **11** (miniPEG-RWQWRWQWR- CONH_2).

De forma general se observó que la inclusión de Fmoc-Orn(OtBu)-OH, Biotina, Fmoc-Ahx-OH, CH_3COOH , Pam, Amy y Fmoc-miniPEG procedió de buena manera sugiriendo que estas moléculas pueden ser incorporadas en secuencias peptídicas utilizando la SPPS-Fmoc/tBu.

- **Inclusión del ácido amino hexanoico (Ahx) en el extremo N-terminal (péptido 7):** La inclusión del Fmoc-Ahx-OH en el extremo N-terminal de la secuencia no afectó el proceso sintético, siendo una inclusión favorable en la cadena peptídica. El Fmoc-Ahx-OH tiene una cadena hidrocarbonada de 6 carbonos por lo que la adición de este aminoácido incrementó la hidrofobicidad del péptido y fue utilizado como espaciador para facilitar la incorporación de las moléculas no peptídicas en la síntesis de los péptidos **7**, **8**, **9** y **17**.
- **N-biotinilación (péptido 8):** La inclusión de biotina se realizó utilizando el Ahx como espaciador, para disminuir el impedimento estérico durante su incorporación a la cadena peptídica. La reacción de acople se realizó mediante el uso de TBTU ya que esta estrategia requiere menos cantidad de biotina y solo se necesitó de un ciclo de reacción de acople. Este péptido presentó un mayor t_R que el péptido hit indicando

que la incorporación de Biotina-Ahx a la secuencia disminuyó la polaridad de la secuencia.

- **N-lipidación** (péptidos **9** y **10**): La lipidación se realizó por inclusión del ácido mirístico (Amy) o ácido palmítico (Pam) en el extremo N-terminal de la secuencia, la síntesis procedió de manera normal y la inclusión de estas moléculas no presentó dificultad. Debido a que los lípidos generaron un aumento significativo de la lipofilidad del péptido fue necesario desarrollar un método cromatográfico para purificar y analizar estos péptidos.
- **N-PEGilación** (péptido **11**): La inclusión de miniPEG en el extremo N-terminal de la secuencia no generó un cambio significativo en el proceso sintético ni en la polaridad ya que no afectó el t_R comparado con el péptido LfcinB (21-25)_{Pal}, siendo una síntesis amigable.
- **N-acetilación** (péptido **12**): La acetilación del grupo amino del extremo N-terminal de la secuencia se llevó a cabo sin dificultades y generó un pequeño aumento del t_R .
- **Dimerización** (péptidos **13-15**): Teniendo en cuenta los resultados de actividad del péptido dimérico LfcinB(21-25)_{Pal2}, se realizó la dimerización de algunos de los péptidos para establecer su influencia en la actividad. La síntesis de péptidos diméricos implica mayor costo comparado con los péptidos lineales, ya que se requiere el doble de reactivos para la síntesis. Por esto, solo se sintetizaron tres péptidos, **13**, **14** y **15**, dentro de los cuales dos se funcionalizaron en el extremo N-terminal con Ahx (péptido **13**), la acetilación del N-terminal (péptido **15**) y el péptido **14** incluyó el cambio de Arg por Orn en el extremo C-terminal. Los péptidos **13**, **14** y **15** fueron obtenidos con purzas mayores al 91% y la masa experimental determinada por MS correspondió con la masa esperada indicando su síntesis exitosa (**Figura 18**). Los péptidos diméricos presentaron t_R similares siendo el de mayor valor el del péptido **15**, seguramente debido a la presencia del grupo acetilo en el extremo N-terminal de las dos cadenas peptídicas.

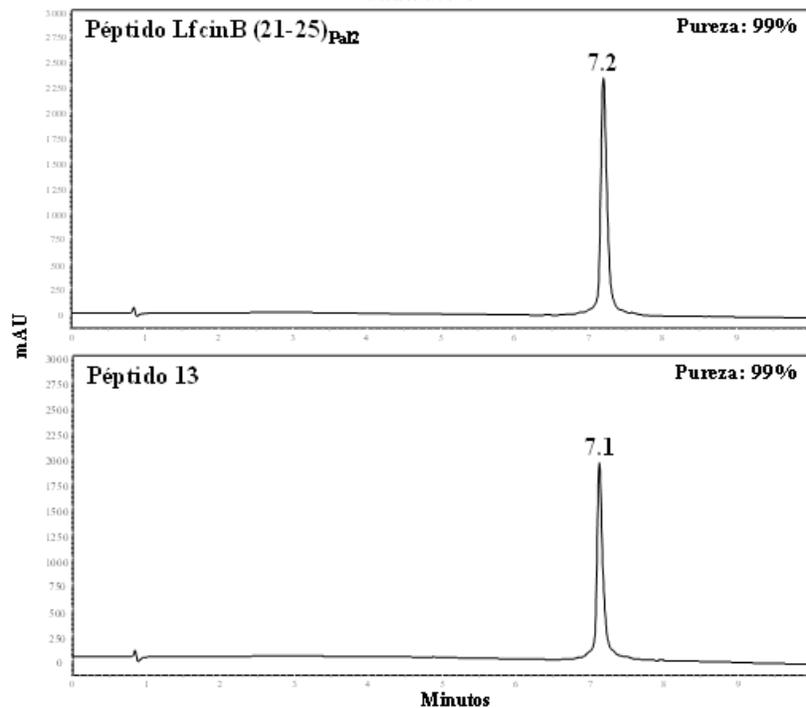


Figura 18: Perfiles cromatográficos de los péptidos diméricos LfcinB (21-25)_{Pal2} ((H₂N-RWQWRWQWR)₂-K-Ahx-CONH₂)y **13** ((H₂N-Ahx-RWQWRWQWR)₂-K-Ahx-CONH₂).

- **Otras aproximaciones- motivo mínimo de actividad** (péptidos **16-17**): En esta etapa también se incluyó el motivo mínimo LfcinB (20-25): RRWQWR. Los péptidos **16** y **17** corresponden a la incorporación del Ahx o Biotina-Ahx en el extremo N-terminal de la secuencia, respectivamente. Esto se realizó para evaluar si la incorporación de estos motivos potenciaba la actividad de esta secuencia que no presentó actividad en las células HT-29 y Caco-2. La inclusión del Ahx o de Biotina podrían brindarle mayor hidrofobicidad a la secuencia y a su vez facilitar la internalización. Los péptidos **16** y **17** fueron obtenidos con purzas del 98 y 95% respectivamente y la masa experimental correspondió con la masa esperada indicando su obtención exitosa.

8.2.2 Obtención de la librería del péptido hit $^{26}\text{[F]}$ -LfcinB (20-30)₂

Para el diseño de la librería de este péptido hit se tuvo en cuenta los resultados de la librería del péptido LfcinB (21-25)_{Pal}. La síntesis simultánea de varios péptidos se realizó partiendo de un mismo reactor como se ejemplifica en la **Figura 19**.

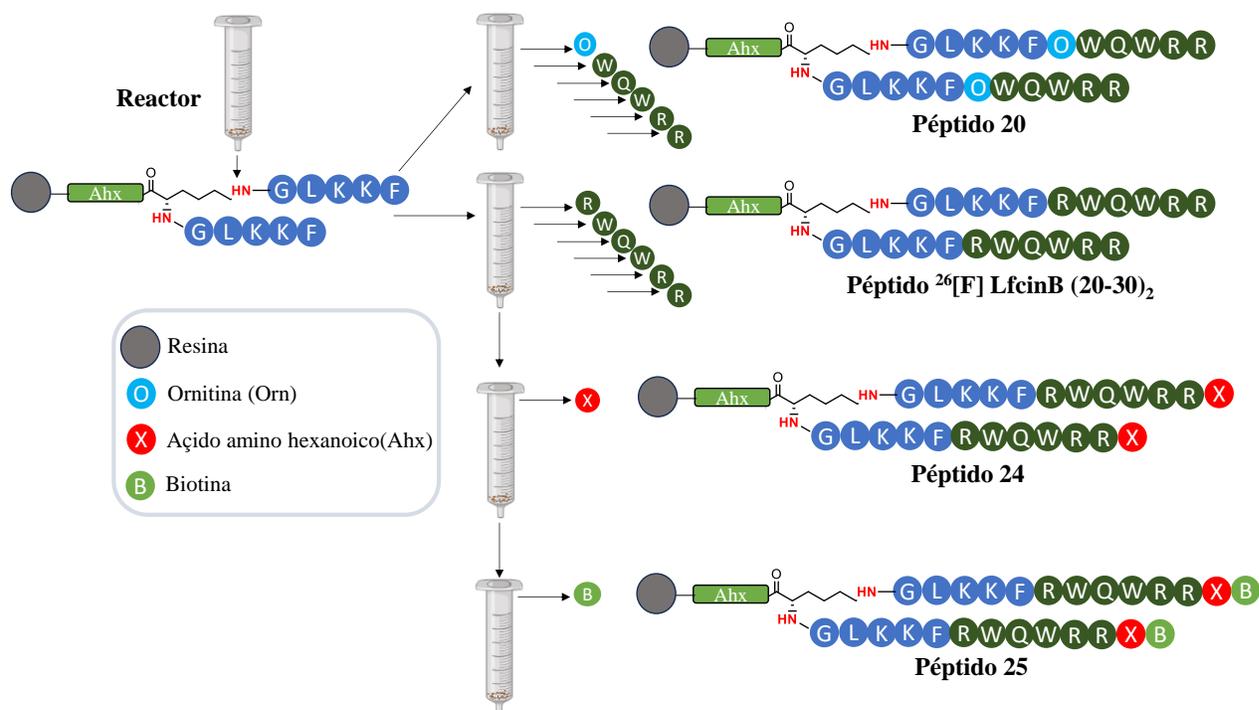


Figura 19: Esquema del proceso de la síntesis simultánea de los péptidos **20**, **24**, **25** y $^{26}\text{[F]}$ -LfcinB (20-30)₂, utilizando la SPPS-Fmoc/tBu.

Todos los péptidos diméricos sintetizados en esta etapa tuvieron una pureza cromatográfica mayor al 83% y la masa obtenida correspondió a la masa esperada (**Tabla 9**). Las modificaciones propuestas se sustentan en el mismo principio de las previamente explicadas para el péptido hit LfcinB (21-25)_{Pal}, y en general los cambios no modificaron la viabilidad sintética o la polaridad de forma significativa de los péptidos **18-26**.

Se observó que las sustituciones de Arg por Orn, L-Arg por D-Arg, la incorporación del motivo Biotina-Ahx procedió de buena manera y fue posible incorporar estas modificaciones en ambas cadenas de los dímeros. No se evidenció la formación de péptidos diméricos con deleciones en una o ambas cadenas.

Código	Secuencia	RP-HPLC		Masa esperada (Da)	Masa obtenida (Da)
		tr (min)	Área (%)		
²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	(H ₂ N-RRWQWRFKKL ₂ G) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	5,9	99	3341.964	3341.9736
18	(H ₂ N- Orn -RWQWRFKKL ₂ G) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	5,9	84	3257.995	3258.7513
19	(H ₂ N-R- Orn -WQWRFKKL ₂ G) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	5,8	90	3257.995	3257.9099
20	(H ₂ N-RRWQW- Orn -FKKL ₂ G) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	5,8	98	3257.995	3257.7685
21	(H ₂ N- ^d RRWQWRFKKL ₂ G) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	6,0	88	3341.964	3342.2998
22	(H ₂ N- ^d R-Orn -WQWRFKKL ₂ G) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	5,9	84	3257.995	3256.8235
23	(H ₂ N- ^d RRWQW- Orn -FKKL ₂ G) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	5,9	86	3257.995	3257.8924
24	(H ₂ N- Ahx -RRWQWRFKKL ₂ G) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	5,9	83	3568.132	3568.1213
25	(Biotin -Ahx-RRWQWRFKKL ₂ G) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	6,1	90	4021.452	4020.2752
26	(Ac-Ahx -RRWQWRFKKL ₂ G) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	6,3	86	3652-142	3652.1590

Tabla 9: Caracterización de la librería del péptido hit ²⁶[F] LfcinB(20-30)₂. Ácido amino hexanoico (Ahx), CH₃CO (Ac), Ornitina (Orn).

8.2.3 Viabilidad sintética de los péptidos

La viabilidad sintética se define como la facilidad de la síntesis de un péptido en cuanto a número de reacciones requeridas, tiempo de síntesis, consumo de aminoácidos y solventes, pureza y rendimientos del producto final, entre otros. Actualmente existen algunos predictores de la viabilidad sintética para péptidos, como es el caso de Peptide Synthesis and Proteotypic Peptide Analyzing Tool de ThermoFisher, Peptide Analyzing tool to assist peptide Design de GenScript, Peptide Synthesis Score (PepSySco), entre otras. Sin embargo, estas describen la facilidad de síntesis solo para péptidos lineales con aminoácidos naturales y/o no evalúan el efecto de otras moléculas (como lípidos, PEG, ferroceno, etc.) en la síntesis, motivo por el cual se construyó una matriz de los resultados experimentales, que permitió comparar y determinar la facilidad de síntesis de los péptidos obtenidos, cabe aclarar que este es un análisis retrospectivo, cuya elaboración fue parametrizada siguiendo algunos reportes y proveedores de péptidos (**Tabla 10**) y que puede ser el punto de partida para crear una herramienta de predicción. La matriz se construyó teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

Número de residuos: El número de aminoácidos que se requieren incorporar va a afectar la facilidad de síntesis y el tiempo que requiere la obtención del péptido (el cual es un factor de mayor importancia en la síntesis manual). A medida que aumenta el número de aminoácidos del péptido a sintetizar es más difícil completar las reacciones de acople y desprotección debido a la agregación de las cadenas y el impedimento estérico lo cual dificulta que el acceso de los reactantes a los sitios de reacción. Cuando se desea sintetizar péptidos de cadenas

largas se prefiere una resina con baja sustitución y cuando son péptidos cortos la resina a elegir es de alta sustitución, este parámetro influye en la cantidad de producto a obtener, por lo que se sugiere:

- Péptidos que poseen menos de 5 residuos: Se requiere resinas con alta sustitución y estas moléculas tienden a ser solubles en agua excepto si todos los residuos son de carácter hidrofóbico, sin embargo, luego del desanclaje estos péptidos generalmente no se pueden precipitar con el tratamiento con éter etílico, por lo que requiere eliminar el TFA remanente por rotaevaporación, proceso que es dispendioso y puede disminuir los rendimientos de síntesis^{232,233}. En este trabajo no se sintetizaron péptidos con 5 o menos residuos.
- Péptidos con 12 a 15 residuos: En el estudio PepSySco se reporta que los péptidos lineales evaluados con estas longitudes presentaron valores de score que indican alta dificultad de síntesis, contrario a lo presentado para péptidos más cortos²³⁴. De acuerdo con la experiencia del grupo y los resultados obtenidos los péptidos con secuencias de hasta de 12 residuos lineales, en la mayoría de los casos presentaron baja dificultad para su obtención.
- Secuencias mayores a 15 residuos: En el estudio PepSySco se menciona que se presentaron fallas en la obtención de los péptidos largos, en donde la mayor probabilidad de falla (30%) se obtuvo en los péptidos de más de 15 residuos²³⁴. Se ha evidenciado que péptidos con secuencias mayores a 15 residuos presentan dificultad en la síntesis tanto para la reacción de desprotección como para la reacción de acople de los aminoácidos, además en los productos obtenidos se observa mayor número de especies no deseadas lo que implica que el proceso de purificación se más dispendioso y con bajos rendimientos.

Polivalencia del péptido: Los péptidos monoméricos presentan mayor facilidad de síntesis que los péptidos diméricos ya que estos requieren que la incorporación de cada aminoácido sea completa en cada cadena. En este trabajo se evidenció que la síntesis de los péptidos monoméricos procedió con mayor facilidad que la de los diméricos.

Número de ciclos de reacción de acople por residuo: Cuando se realiza la incorporación de cada Fmoc-amino ácido se requiere que el aminoácido se una a todos los sitios reactivos

sobre la resina o resina-péptido con el propósito de evitar secuencias truncadas en el producto final, lo que dificulta el proceso de purificación. Cuando se realiza la reacción de acople, es posible que luego del tiempo de reacción algunos sitios reactivos hayan quedado libres, indicando que la reacción no fue completa, por lo que se requiere hacer un segundo ciclo de reacción de acople para asegurar que todos los sitios reactivos sean ocupados por el Fmoc-aminoácido. Se busca que los procesos sintéticos tengan el menor número de ciclos de reacción de acople por cada residuo incorporado ya que implica menor consumo de reactivos, solventes y menor tiempo de síntesis.

Pureza del crudo: La pureza del péptido crudo obtenido luego del proceso de clivaje va a depender de que las reacciones de acople y desprotección sean completas ya que esto influye directamente en la presencia de secuencias delecionadas en el producto crudo. También se requiere que el proceso de clivaje sea eficiente y que no genere secuencias parcialmente desprotegidas. Entre mayor sea la pureza del producto crudo, el proceso de purificación será menos dispendioso y mayor será la eficiencia en cuanto a rendimientos y pureza del producto final.

Pureza final: Se ha sugerido que la pureza mínima requerida para que un péptido pueda ser utilizado en ensayos *in vitro* debe ser del 85%, prefiriéndose mayores purezas para evitar interferencia de las impurezas presentes en el producto purificado²³⁵.

Aminoácidos no naturales y otras conjugaciones: Las conjugaciones o uso de aminoácidos no naturales es necesaria para contrarrestar algunos inconvenientes de la síntesis, sin embargo, incrementan los costos de producción y puede que requieran procesos adicionales o especiales en la síntesis (oxidación, acetilación, reacciones de química click) y pueden incrementar la dificultad para la purificación.

Residuos hidrofóbicos (%): Los aminoácidos hidrofóbicos (Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Trp, Tyr) pueden favorecer la agregación de las cadenas peptídicas durante la síntesis afectando el acceso a los sitios reactivos e incrementando el impedimento estérico. En el producto final secuencias con alto porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos pueden afectar la solubilidad del péptido, lo que influye en la purificación y su uso en la evaluación de la actividad biológica²³⁶. Aquellos péptidos en los cuales el porcentaje de contenido de aminoácidos

hidrofóbicos es mayor al 75% presentarán dificultades en la solubilidad en medios acuosos²³⁷.

Residuos con grupos protectores voluminosos (%): La viabilidad del proceso sintético de los péptidos depende de la eficiencia de las reacciones de acople y desprotección, las cuales se ven afectadas por el impedimento estérico y la agregación de las cadenas. El impedimento estérico se relaciona con la voluminosidad del Fmoc-aminoácido que se requiere incorporar y de los aminoácidos que se encuentran anclados al soporte sólido. Residuos como Fmoc-Arg(pBf)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH y Fmoc-Trp(Boc)-OH presentaron mayor dificultad en el anclaje a la cadena creciente peptídica y dependiendo de la secuencia y posición del aminoácido la dificultad puede incrementar.

Para construir la matriz se asignó la siguiente ponderación a cada uno de estos factores:

Característica	Puntuación		
	9	5	3
Número de residuos	6-11	12-15	≤5; >15
Acoples/residuo	<1,5	1,6-1,9	≥2,0
Pureza del crudo	≥85%	71-84%	<70%
Pureza final	≥90%	85-89%	<85%
Aminoácidos no naturales y otras conjugaciones	≤1	2-3	≥4
Residuos hidrofóbicos (%)	<50%	50-74%	≥75%

Tabla 10: Parámetros evaluados para la determinación de la viabilidad sintética experimental. Cuando el parámetro no incidió significativamente en la síntesis (verde), incidió en la síntesis (rosado) e incidió significativamente en la síntesis (Magenta).

Adicionalmente se restó 5 unidades al valor total, si el péptido cumplió una o ambas de las siguientes características.

1. La secuencia contiene residuos de His, Cys, Tyr, Met o Trp debido a que sus cadenas laterales pueden presentar oxidación, las cuales pueden ocurrir principalmente en la reacción de clivaje, purificación o almacenamiento. Estas reacciones producen especies no deseadas y que afectan la pureza del producto final²³⁸.
2. La secuencia contiene más de un residuo de Arg. La cadena lateral de este aminoácido está protegida con el grupo Pbf el cual es muy voluminoso lo que dificulta su anclaje a la resina o resina péptido debido principalmente al impedimento estérico. También puede presentar reacciones no deseadas como lo son: la formación de δ -lactamas y una deleción/ degradación produciendo la cadena lateral de Orn. Generalmente la incorporación de este aminoácido requiere varios ciclos de acople y eleva el costo de

la síntesis considerablemente, con un precio superior en hasta 15 veces cuando se compara con otros aminoácidos. Adicionalmente la remoción del grupo Pbf es difícil durante el clivaje ya que requiere tiempos largos de reacción por lo que a medida que aumenta el número de residuos de Arg, este paso es dispendioso, más largo y afecta notablemente la pureza del producto crudo^{213,230}.

Para ejemplificar el desarrollo de la matriz, se utilizará el péptido optimizado **19** (H₂N-R-Orn-WQWRFKKLK)₂-K-Ahx-CONH₂ (**Tabla 11**). Para empezar, dicho péptido contiene 24 residuos, teniendo en cuenta la **Tabla 10**, esto le brinda una puntuación de 3. Adicionalmente, para la obtención de dicho péptido se necesitaron un total de 26 ciclos de acople, lo que representó una relación acoples/residuos de 1.08, por lo que tiene una puntuación de 9. De la misma forma, la pureza obtenida del crudo fue del 68%, adquiriendo para esta una puntuación de 3, posterior al proceso de purificación se obtuvo una pureza del 90%, lo que representa 9 puntos. Debido a las características de las síntesis mencionadas, hubo una dificultad al determinar el rendimiento de la síntesis, motivo por el cual fue un factor que no se consideró en esta matriz. En cuanto a los aminoácidos no naturales de la secuencia (H₂N-R-Orn-WQWRFKKLK)₂-K-Ahx-CONH₂, esta tiene 3 residuos, dos ornitinas en las cadenas ramificadas y un Ahx, para lo que se obtiene una puntuación total de 5. Posteriormente se evaluó el porcentaje de residuos hidrofóbicos de la secuencia (H₂N-R-Orn-WQWRFKKLK)₂-K-Ahx-CONH₂) para un total 9 residuos hidrofóbicos de los 24 de la secuencia, que corresponden a 37,5% para una puntuación de 9. De la misma forma, se restan cinco unidades debido a que la secuencia (H₂N-R-Orn-WQWRFKKLK)₂-K-Ahx-CONH₂) posee varias argininas y triptófanos. Al tabular la puntuación, este péptido tiene un valor total de 33.

Parámetro	Datos	Puntuación
Número de residuos	24	3
Acoples/residuo	1.08	9
Pureza del crudo	68%	3
Pureza final	90%	9
Aminoácidos no naturales y otras conjugaciones	3	5
Residuos hidrofóbicos (%)	38	9
Puntuación por presencia de grupos lábiles		-5
Total		33

Tabla 11: Ejemplo de la determinación de la puntuación de la viabilidad sintética experimental para el péptido optimizado **19**.

Código	Secuencia	Puntuación	
		Matriz interna	SAScore
LfcinB (20-25)	H ₂ N-RRWQWR-CONH ₂	40	5.044
LfcinB (20-25) ₂	(H ₂ N-RRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	32	7.101
LfcinB (20-25) ₄	((H ₂ N-RRWQWR) ₄ -K ₂ -Ahx ₂ -C ₂)	22	10.000
LfcinB (20-30)	H ₂ N-RRWQWRMKKLG-CONH ₂	31	6.665
LfcinB (20-30) ₂	(H ₂ N-RRWQWRMKKLG) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	31	9.364
²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	(H ₂ N-RRWQWRFKKLG) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	31	9.406
LfcinB (21-25) _{Pal}	H ₂ N-RWQWRWQWR-CONH ₂	40	6.305
LfcinB (21-25) _{Pal2}	(H ₂ N-RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	28	9.244
1	H ₂ N- Orn -WQWRWQWR-CONH ₂	40	6.225
2	H ₂ N RWQW-Orn -WQWR-CONH ₂	40	6.225
3	H ₂ N-RWQWRWQW- Orn -CONH ₂	40	6.225
4	H ₂ N- ^d R WQWRWQWR-CONH ₂	36	6.305
5	H ₂ N- ^d RWQW-Orn -WQWR-CONH ₂	36	6.225
6	H ₂ N- ^d RWQWRWQW-Orn -CONH ₂	36	6.225
7	H ₂ N Ahx -RWQWRWQWR-CONH ₂	36	6.615
8	Biotina-Ahx -RWQWRWQWR-CONH ₂	36	7.563
9	Amy -RWQWRWQWR-CONH ₂	36	6.720
10	Pam -RWQWRWQWR-CONH ₂	36	6.785
12	Ac-Ahx -RWQWRWQWR-CONH ₂	36	6.662
13	(H ₂ N Ahx -RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	24	9.428
14	(H ₂ N RWQWRWQW-Orn) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	24	9.312
15	(Ac -RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	24	9.312
16	H ₂ N- Ahx -RRWQWR-CONH ₂	40	5.218
17	Biotina-Ahx -RRWQWR-CONH ₂	40	6.193
18	(H ₂ N- Orn -RWQWRFKKLG) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	24	9.338
19	(H ₂ N- R-Orn -WQWRFKKLG) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	26	9.338
20	(H ₂ N-RRWQW- Orn -FKKLG) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	30	9.338
21	(H ₂ N- ^d RRWQWRFKKLG) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	30	9.406
22	(H ₂ N- ^d R-Orn -WQWRFKKLG) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	24	9.338
23	(H ₂ N- ^d RRWQW-Orn -FKKLG) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	24	9.338
24	(H ₂ N- Ahx -RRWQWRFKKLG) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	28	9.554
25	(Biotin -Ahx-RRWQWRFKKLG) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	24	9.863
26	(Ac-Ahx -RRWQWRFKKLG) ₂ -K-Ahx H ₂ N-	24	9.612

Tabla 12: Valores de viabilidad sintética determinados mediante la matriz experimental y la plataforma ADMETLab.

A partir de los resultados experimentales de la síntesis se estimó la viabilidad sintética de cada péptido mediante la ponderación de las diferentes etapas del proceso sintético basada en su relevancia (**Tabla 12**). Esta “viabilidad sintética experimental” se contrastó con los valores SAScore obtenidos de la herramienta predicción²³⁹, de la plataforma ADMET Lab 2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com/>)^{217,218}. La puntuación SAScore fue construida a partir de moléculas que no necesariamente correspondieron a péptidos. El valor SAScore predice la facilidad de síntesis de una molécula, cuando el valor es mayor o igual a 6 indica que la síntesis de la molécula tiene alta dificultad y a medida que decrece el valor indica mayor facilidad de síntesis. Dicha puntuación fue construida con base en una combinación de contribuciones de fragmentos, obtenidos mediante el análisis de diversas moléculas y una penalización por complejidad que es producto del análisis de las moléculas en cuanto a su tamaño y características. Posteriormente, fue validada con puntuaciones provistas por

químicos medicinales expertos, pertenecientes a la compañía de Novartis²³⁹. Para la matriz experimental construida en este trabajo, se observa que entre mayor es el valor de un péptido mayor facilidad de síntesis tendrá la molécula. Basados en los resultados experimentales de la síntesis de los péptidos de la **Tabla 12**, se seleccionó arbitrariamente el rango de valores de 0-20 para aquellos péptidos con mayor dificultad sintética, siendo cero el valor con la mayor dificultad en la síntesis de la matriz. El rango entre 21-25 son los valores que reflejan una dificultad sintética intermedia y los péptidos con valores entre 26-40 son aquellos con mayor facilidad sintética, siendo el valor de 40 aquel que representa la mayor facilidad de síntesis.

Esta comparación tiene como objetivo establecer si hay semejanza entre los resultados experimentales para la obtención de los péptidos de la tesis y los valores de predicción, de tal manera nos indique si esta herramienta predictiva se puede aplicar para predecir el grado de dificultad de la síntesis manual de péptidos derivados de la LfcinB.

De los valores obtenidos en la tabla anterior, se demostró que la plataforma tiene mayor sensibilidad en la diferenciación entre péptidos, sin embargo, estas diferencias no demostraron discrepancias significativas desde el punto de vista experimental. Adicionalmente, se evaluó la correlación entre ambos modelos, encontrando un r^2 de 0.8390, lo que podría indicar que la predicción *in silico*, tiene una correlación aceptable con los datos experimentales (**Figura 20**). Esta aproximación permite conocer el posible comportamiento experimental de un péptido antes de su síntesis, sin verse afectado por la presencia de aminoácidos no naturales o reacciones adicionales, como lo es en el caso de las plataformas previamente mencionadas.

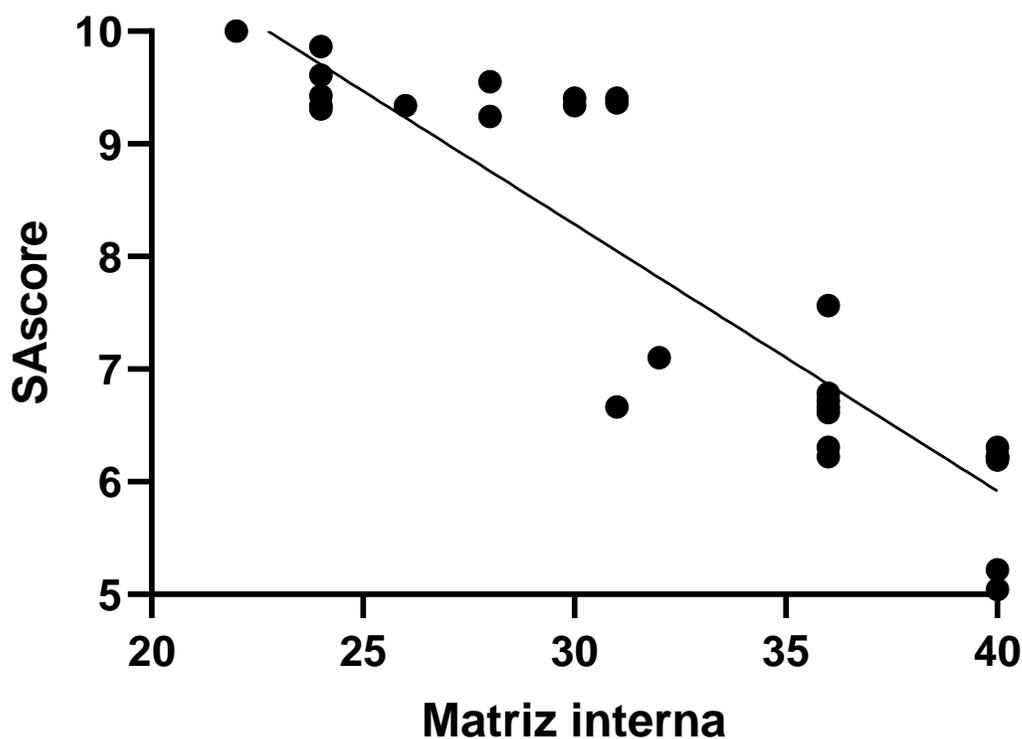


Figura 20: Correlación entre la matriz interna y SAScore. Se muestra la regresión lineal cuya ecuación de la recta es $y = -0.2424X + 15.61$ con un $r^2 = 0.8390$.

Además, la matriz diseñada y evaluada en este trabajo es una herramienta útil para ser utilizada para la predicción de la facilidad de péptidos monoméricos, diméricos con aminoácidos no naturales, moléculas de naturaleza no peptídica. También esta puede ser enriquecida con los datos de síntesis de otros péptidos de tal forma que se construya una herramienta predictiva más robusta y específica para péptidos sintéticos.

De esta etapa se alcanzaron los siguientes logros (**Figura 21**):

- Se obtuvo la librería de los péptidos LfcinB (20-25), LfcinB (21-25)_{Pal} y ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, para un total de 34 moléculas sintetizadas en el trabajo.
- Los péptidos se obtuvieron con alta pureza y la masa experimental correspondió con la masa teórica.
- Se encontró la correlación entre los valores de viabilidad sintética experimental y los encontrados mediante la plataforma SAScore, con un r^2 : 0.84.

- Se construyó una matriz para evaluar la viabilidad sintética experimental de los péptidos obtenidos y que esta puede ser la base para el diseño de una herramienta predictiva para evaluar la facilidad de síntesis de péptidos monoméricos y diméricos que contienen o no aminoácidos no naturales, D-aminoácidos, y moléculas de naturaleza no proteica.
- Se cumplió con el segundo objetivo específico planteado en este trabajo

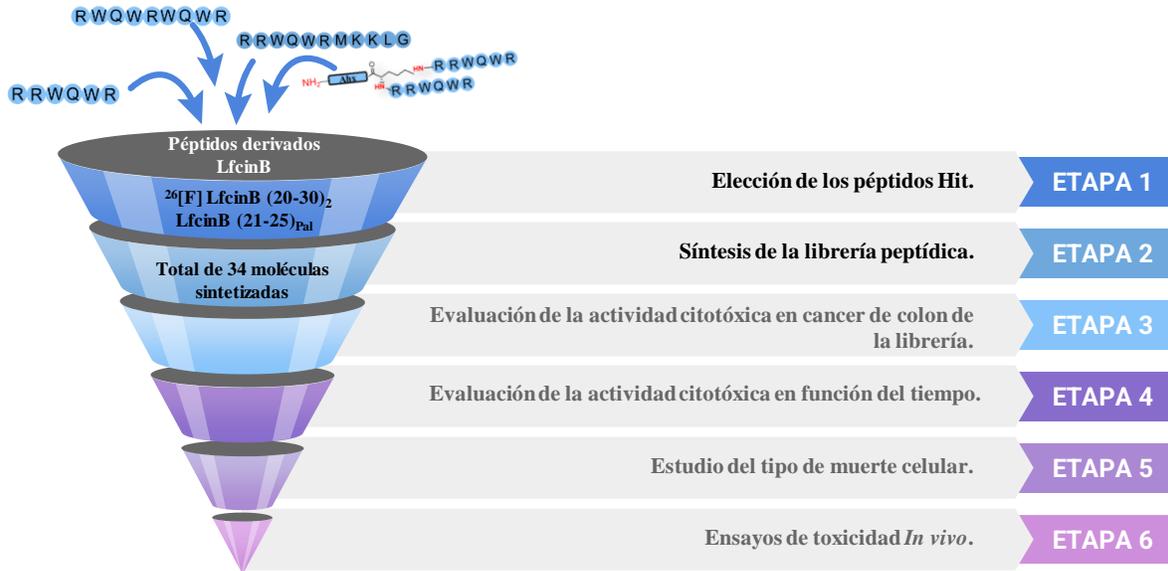


Figura 21: Etapa 2: Síntesis de la librería peptídica. Esta etapa finaliza con la obtención de un total de 34 moléculas sintetizadas, purificadas y caracterizadas.

8.3 Etapa 3: Actividad *in vitro*

8.3.1 Péptidos de la librería derivada del péptido hit LfcinB (21-25)_{Pal}

Péptido LfcinB (21-25)_{Pal}

El péptido LfcinB (21-25)_{Pal} H₂N-RWQWRWQWR-CONH₂ es un péptido que contiene una secuencia simétrica (palindrómica) de nueve residuos con propiedades anfipáticas, así como una carga neta a pH fisiológico de +4, una hidrofobicidad del 44% (Trp), 33% de residuos básicos (Arg) y 22% (Gln) de residuos polares no cargados²³⁷. En forma similar, la LfcinB es un péptido catiónico, con aminoácidos que contienen cadenas laterales cargadas positivamente (Arg y Lys), hidrofóbicas (Trp, Phe) y residuos polares no cargados (Gln), especialmente en el motivo mínimo de actividad²⁴⁰.

El mecanismo de acción propuesto para la LfcinB, sugiere que la interacción inicial entre el péptido y la célula implica una interacción electrostática entre las cadenas laterales cargadas positivamente del péptido y las moléculas cargadas negativamente en la superficie celular. Lo anterior sugiere que la carga neta positiva y la anfipaticidad son relevantes para la actividad de la LfcinB, características que también posee el péptido LfcinB (21-25)_{Pal}^{85,241}.

La librería obtenida a partir de la secuencia palindrómica (**Tabla 13**), muestra que los péptidos **1-7** presentaron t_R similares al péptido hit indicando que las modificaciones no afectaron significativamente la polaridad de la secuencia. Previos reportes muestran que cuando se realizó la sustitución de cada residuo de esta secuencia por Ala, la actividad anticancerosa en líneas celulares de cáncer de mama disminuyó en todos los casos²², sugiriendo que la inclusión de la Ala en cualquier sitio de la secuencia afectaba la anfipaticidad de la cadena y/o la carga catiónica de la molécula. Dentro de las modificaciones realizadas, el enfoque se desarrolló para mantener la carga catiónica (siendo la carga neta de estas moléculas +4) y/o modificar la anfipaticidad de la molécula realizando cambios en la hidrofobicidad de esta (como se observa principalmente para los péptidos **7-12**).

Código	Secuencia	Carga neta	IC ₅₀ (μM/μg/mL)	
			HT-29	Caco-2
LfcinB(21-25) _{Pal}	H ₂ N-RWQWRWQWR-CONH ₂	+4	100/149	86/127
1	H ₂ N- Orn -WQWRWQWR-CONH ₂	+4	>138/>200	91/132
2	H ₂ N-RWQW- Orn -WQWR-CONH ₂	+4	>138/>200	64/92
3	H ₂ N-RWQWRWQW- Orn -CONH ₂	+4	109/157	40/58
4	H ₂ N- ^d R WQWRWQWR-CONH ₂	+4	>135/>200	105/155
5	H ₂ N- ^d R WQW- Orn -WQWR-CONH ₂	+4	>138/>200	109/158
6	H ₂ N- ^d R WQWRWQW- Orn -CONH ₂	+4	>138/>200	>138/>200
7	H ₂ N- Ahx -RWQWRWQWR-CONH ₂	+4	119/190	40/65
8	H ₂ N- Biotina-Ahx -RWQWRWQWR-CONH ₂	+4	>110/>200	>110/>200
9	H ₂ N- Amy -RWQWRWQWR-CONH ₂	+4	>119/>200	>119/>200
10	H ₂ N- Pam -RWQWRWQWR-CONH ₂	+4	>117/>200	>117/>200
11	miniPEG -RWQWRWQWR-CONH ₂	+4	>123/>200	>123/>200
12	Ac-Ahx -RWQWRWQWR-CONH ₂	+4	>122/>200	31/52

Tabla 13: Actividad citotóxica de la librería del péptido LfcinB(21-25)_{Pal} contra las líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y Caco-2.

- **Cambios secuenciales Arg/Orn (Péptidos 1, 2 y 3):** La Arg es un residuo catiónico, cuya cadena lateral es el grupo guanidino, este es capaz de formar hasta 6 puentes de hidrógeno y tiene la capacidad de retener su carga catiónica en la interacción con la membrana, esto debido a su pKa de 12. La Arg forma puentes de hidrógeno con los grupos fosfatos y el agua asociada a la membrana celular, lo que favorece su capacidad de permeabilizar las membranas lipídicas^{242,243}, dicha capacidad es importante en los péptidos catiónicos, debido a que pueden facilitar la internalización, así mismo, se ha demostrado que los péptidos que contienen Arg son capaces de penetrar la bicapa mediante la contribución hidrofóbica de residuos cercanos, como puede suceder en el caso del péptido LfcinB (21-25)_{Pal}, por la presencia de los Trp, lo que favorecería el movimiento del péptido a través de la bicapa lipídica^{243,244}. De la misma forma, se ha descrito que sustituciones de Arg por Lys disminuyen la eficiencia de traslocación de péptidos penetrantes de membrana, lo que demuestra la importancia de las interacciones que tienen lugar gracias al grupo guanidino²⁴⁵.

También se ha demostrado que péptidos con Lys tienden a presentar menor toxicidad que sus análogos de Arg^{213,246}, debido a que la Lys posee menor afinidad por lípidos zwitteriónicos (fosfatidilcolina, esfingomielina, entre otros), que por lípidos aniónicos. Mientras que la Arg posee alta afinidad por ambos grupos posibilitando la interacción entre los péptidos y células normales que expresan también lípidos zwitteriónicos. Las membranas de las células cancerígenas, sobreexpresan en su

exterior lípidos aniónicos, sobre los cuales pueden actuar las cadenas laterales de la Lys y la Arg²⁴⁶. Teniendo en cuenta lo anterior, la presencia de Arg y Lys puede afectar tanto la actividad como la selectividad. Sin embargo, la Lys y la Arg poseen alta labilidad proteolítica, motivo por el cual se puede utilizar la Orn, la cual posee más estabilidad proteolítica y a su vez, el mismo grupo funcional de la Lys, manteniendo la carga catiónica²⁴⁷. Cambios de Arg por Orn llevaron a un aumento considerable en la actividad y la selectividad de péptidos derivados de Tritrp al ser evaluados frente a la línea celular de leucemia Jurkat y células mononucleares de sangre periférica⁸⁸. De igual forma, se ha descrito que, en péptidos catiónicos cortos, utilizar bases más débiles que la Arg mejoró su permeabilidad en la membrana²⁴⁸.

En este estudio se realizaron modificaciones secuenciales de Arg/Orn en la secuencia palindrómica y se evidenció que los péptidos **1**, **2** y **3** presentaron mayor efecto citotóxico en la línea celular Caco-2 respecto a la HT-29. Por otra parte, los péptidos **1** (H₂N-Orn-WQWRWQWR-CONH₂) y **2** (H₂N-RWQW-Orn-WQWR-CONH₂), presentaron menor efecto citotóxico en la línea celular HT-29 respecto al péptido hit LfcinB (21-25)_{Pal}. Mientras que el péptido **3** (H₂N-RWQWRWQW-Orn-CONH₂) presentó un efecto citotóxico similar al del péptido hit LfcinB (21-25)_{Pal}. En la línea celular Caco-2, el valor del IC₅₀ para las moléculas **2** y **3**, fue menor indicando que estas presentaron mayor efecto citotóxico que el péptido hit, encontrándose una disminución del valor del IC₅₀ hasta del 50% para el péptido **3** (**Figura 22**). El péptido **1** presentó similar actividad que el péptido hit LfcinB (21-25)_{Pal} en las células Caco-2. Es interesante resaltar que la modificación del péptido **2** mantuvo la secuencia palindrómica.

Se observó que, existe un efecto diferencial al modificar las Arg por Orn, en el extremo C o N terminal de la secuencia, siendo el péptido **3** (cambio de Arg por Orn en el extremo C-terminal) activo en ambas líneas celulares (**Figura 22**). Es importante resaltar que los péptidos presentaron mayor efecto citotóxico en las células Caco-2 que en las HT-29, a pesar de que los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal}, **1**, **2** y **3** poseen la misma carga neta y que los cambios realizados no inciden significativamente en la

anfipaticidad de la secuencia. Estos resultados sugieren que además de la interacción electrostática entre el péptido-célula que es de naturaleza no específica, puede estar involucrado otro tipo de interacción de naturaleza específica en la que el grupo guanidino de las Arg, son relevantes para el efecto citotóxico en las células HT-29. Estos resultados también sugieren que posiblemente la actividad de estos péptidos en las células HT-29 o Caco-2, involucre dos tipos de interacción: una inespecífica de naturaleza electrostática común para ambas células y otra diferencial de naturaleza específica donde las Arg son relevantes para el caso de las células HT-29.

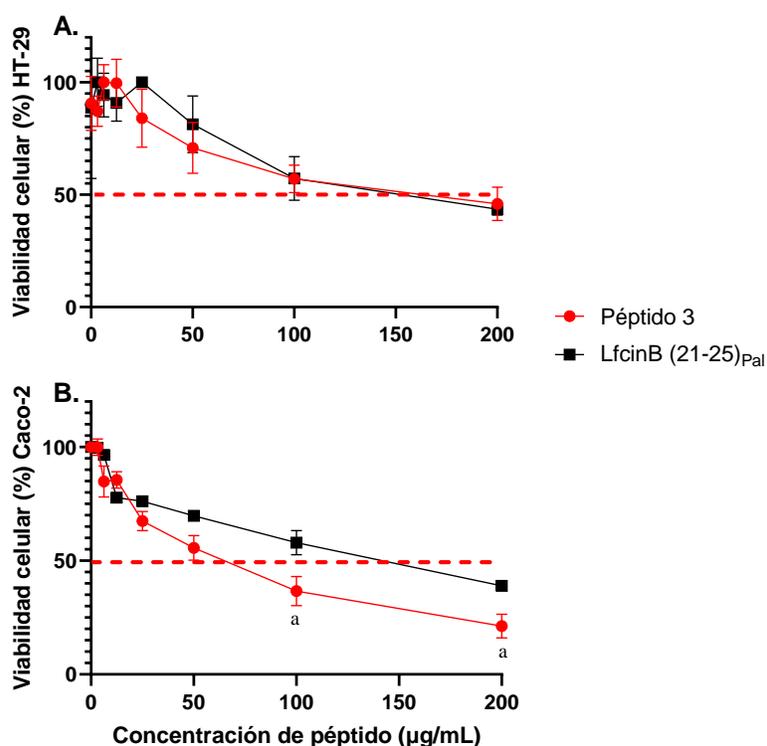


Figura 22: Efecto citotóxico de los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal} y 3 en células HT-29 y Caco-2. Las células fueron tratadas con los péptidos por 2h y la viabilidad celular fue determinada mediante ensayo MTT. (A) Línea celular HT-29, (B) Línea celular Caco-2. Los datos se expresan como la media \pm SD (n = 3). Se realizó una prueba ANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas del péptido 3 comparado con el palíndromo ^ap < 0.05.

- **Sustitución de L-Arg por D-Arg en el extremo N-terminal (Péptidos 4, 5 y 6):**
Como ya fue mencionado anteriormente, la relevancia de las Arg en el mecanismo de acción propuesto para la LfcinB y teniendo en cuenta que este residuo es un sitio de susceptibilidad a la proteólisis enzimática (ejemplo: tripsina). Además, el extremo N-

terminal de los péptidos es susceptible a N-peptidasas. Por lo anterior se realizaron cambios de L-Arg por D-Arg en el extremo N-terminal el péptido LfcinB (21-25)_{Pal}. Estos cambios no generaron un incremento en el efecto citotóxico en las líneas celulares HT-29 y Caco-2 (péptidos **4**, **5** y **6**). Se observó que el efecto citotóxico de estos péptidos disminuyó significativamente, cuando se compara el efecto citotóxico entre los péptidos **3** y **6** en ambas líneas celulares, se puede evidenciar que el efecto citotóxico del péptido **6** disminuyó significativamente, siendo la única diferencia la sustitución de L-Arg por D-Arg en el extremo N-terminal, sugiriendo que la quiralidad este residuo es relevante para el efecto citotóxico del péptido. La sustitución de L-Arg por D-Arg en el extremo N-Terminal disminuyó significativamente la actividad y teniendo en cuenta que la carga neta positiva se mantuvo, sugiere que además de la interacción electrostática inicial entre péptido-célula (interacción inespecífica) puede estar involucrada otro tipo de interacción péptido-célula que involucre interacciones receptor-ligando en los cuales las L-Arg son relevantes, sugiriendo que esta interacción puede ser de naturaleza específica, lo que concuerda con los resultados observados para los péptidos **1**, **2** y **3**.

- **Incorporación de moléculas no peptídicas en el extremo N-terminal (Péptidos 7-12):** Las moléculas unidas al extremo N-terminal aumentaron la naturaleza hidrofóbica de los péptidos afectando posiblemente la anfipaticidad de la secuencia y este efecto se ve aumentado a medida que aumenta el tamaño y/o la hidrofobicidad de la molécula incorporada. Los resultados muestran que la inclusión de moléculas en el extremo N-terminal de la secuencia modificó la actividad citotóxica en ambas líneas evaluadas. En la línea celular HT-29 la actividad disminuyó significativamente respecto al péptido hit LfcinB (21-25)_{Pal}. Se observa que cuando se incluyeron moléculas pequeñas en el extremo N-terminal, los péptidos presentaron mayor actividad en las células Caco-2 (péptidos **7** y **12**) que el péptido hit. Estos resultados muestran que dependiendo de la molécula incorporada en el extremo N-terminal de la secuencia se aumenta

o disminuye la actividad, sugiriendo que es posible incorporar moléculas en el extremo N-terminal que pueden potenciar la actividad.

- **Inclusión del ácido amino hexanoico (Ahx) en el extremo N-terminal** (péptido 7): la inclusión del Ahx en el extremo N-terminal no afectó significativamente su actividad frente a la línea celular HT-29, mientras que aumentó su efecto citotóxico en aproximadamente 50% en la línea celular Caco-2 (**Figura 23**). En esta molécula se mantiene el grupo amino libre el extremo N-terminal y se genera un aumento en la hidrofobicidad debido a la cadena hidrocarbonada, sin embargo, los t_R de este péptido y el péptido hit son similares (**Tabla 8**). Nuevamente, se observa que la modificación causa un efecto diferencial en la actividad dependiendo del tipo de línea celular, resultado que concuerda con lo observado anteriormente y sugiriendo que, además de la interacción electrostática inespecífica es posible que haya otro tipo de interacción entre el péptido y la célula que hace que el efecto citotóxico de estas moléculas sea diferente en las células HT-29 y Caco-2.
- **N-biotinilación** (péptido 8): La inclusión de biotina se realizó utilizando el Ahx como espaciador, sin embargo, se observó una disminución de la actividad en ambas líneas celulares, lo cual puede ser atribuido a cambios de hidrofobicidad o a la pérdida de interacciones específicas como las llevadas a cabo por el grupo amino terminal. Se observó que el t_R del péptido 8 ($t_R = 6,9$ min) es mayor al del péptido hit ($t_R = 6,4$ min) indicando que la inclusión de la biotina aumento la hidrofobicidad de la secuencia (**Tabla 8**).

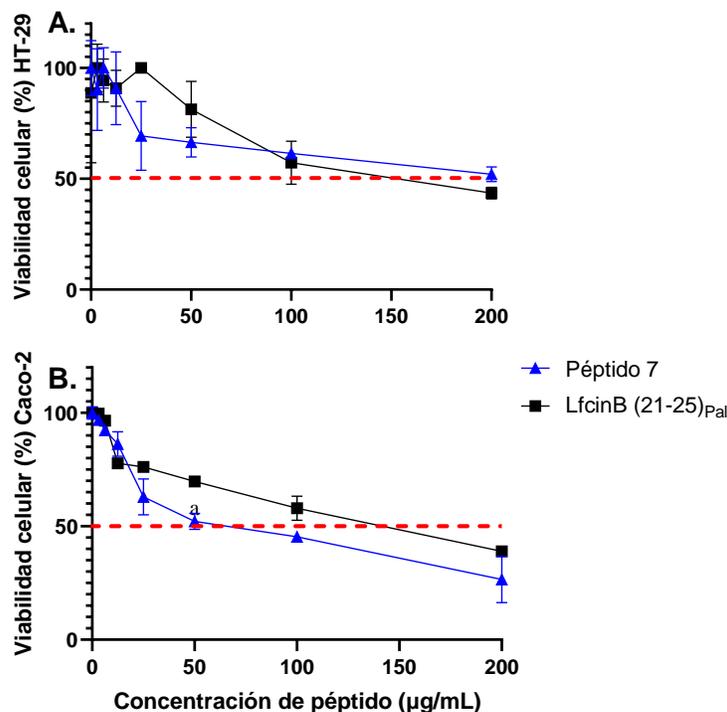


Figura 23: Efecto citotóxico de los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal} y el péptido 7 en las líneas HT-29 y Caco-2. Las células fueron tratadas con el péptido por 2h y la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo MTT. (A) Línea celular HT-29, (B) Línea celular Caco-2. Los datos se expresan como la media \pm SD (n = 3). Se realizó una prueba ANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas del péptido 7 comparado con el palíndromo ^ap < 0.05.

- **N-lipidación** (péptidos 9 y 10): La lipidación se realizó con el objetivo de mejorar el perfil farmacocinético y farmacodinámico de la molécula¹⁶⁸, sin embargo, la inclusión del ácido mirístico (Amy) o ácido palmítico (Pam) en el extremo N-terminal de la secuencia, causó la pérdida de actividad sobre ambas líneas celulares de cáncer de colon. Al igual que en el caso anterior, la inclusión de estas moléculas de naturaleza hidrofóbica, por su cadena hidrocarbonada, puede causar un cambio de la polaridad del péptido afectando la anfipaticidad. Además, se debe tener en cuenta que estas moléculas hidrofóbicas pueden afectar la conformación del péptido en medios acuosos o que la inclusión de estas moléculas causa un impedimento estérico mayor en la interacción electrostática y/o en la posible interacción receptor-ligando.
- **N-PEGilación** (péptido 11): La inclusión de miniPEG (8-Amino-3,6-Ácido dioxaoctanoico) en el extremo N-terminal causó igualmente la pérdida total de actividad en ambas líneas celulares. En este caso, el polímero contiene un grupo

amino primario y la polaridad del conjugado fue similar al del péptido hit. La literatura reporta que la pegilación puede causar impedimento estérico, motivo por el cual el conjugado se formó con el miniPEG, una secuencia polimérica más pequeña. Sin embargo, la actividad asimismo se perdió, posiblemente por este efecto²⁴⁹.

- **N-acetilación** (péptido **12**): Para evaluar si el grupo amino del extremo N-terminal era relevante en la actividad, se realizó la acetilación del péptido en el extremo N-terminal. Los resultados muestran la pérdida de actividad en la línea celular HT-29, sin embargo, se observó un incremento significativo en el efecto citotóxico en la línea celular Caco-2. Este resultado nos sugiere que el extremo N-terminal de la secuencia es relevante para la actividad en células HT-29 ya que la modificación de la L-Arg por D-Arg o la acetilación de este extremo hacen que los péptidos disminuyan la actividad en estas células. Mientras que estos cambios no afectan o aumentaron la actividad en las células Caco-2, sugiriendo que los péptidos posiblemente interactúan de manera diferencial con estos dos tipos de células

Los resultados muestran que el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} (H₂N-RWQWRWQWR-CONH₂), **3** (H₂N-RWQWRWQW-Orn-CONH₂) y **7** (H₂N-Ahx-RWQWRWQWR-CONH₂) presentaron los mejores resultados. El efecto citotóxico de estos péptidos fue evaluado mediante microscopía, en donde las células tratadas con el péptido por 2h presentaron cambios morfológicos como encogimiento, redondeamiento celular y la formación de vacuolas en la membrana (**Figura 24**).

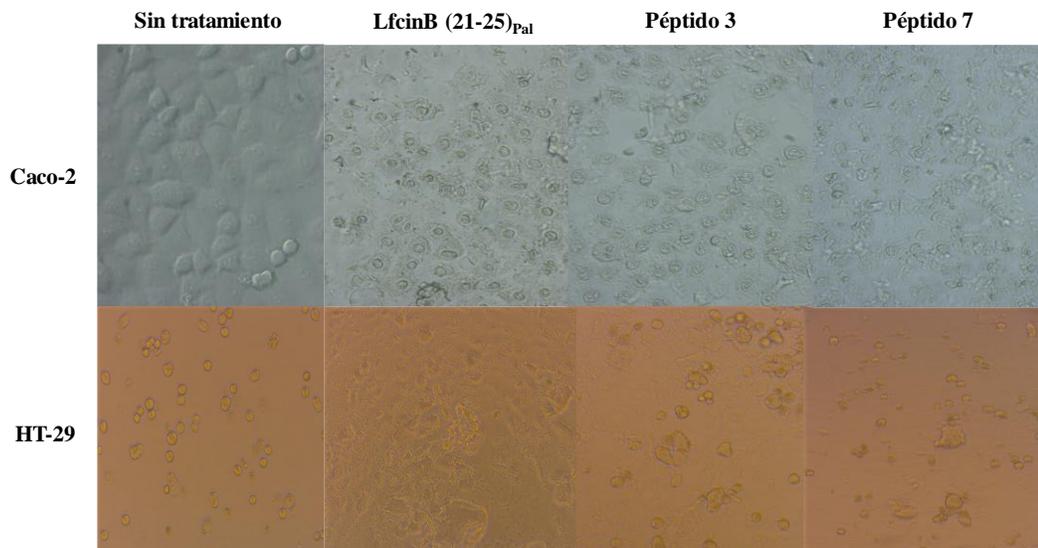


Figura 24: Micrografía de células de cáncer de colon HT-29 y Caco-2 tratadas con péptidos a la concentración máxima de péptido (200 µg/ml) por 2h. El registro fotográfico se hizo utilizando una cámara AxioCam ICc1 (barra de escala: 100 µm).

Para establecer si los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal}, **3** y **7** presentaban selectividad por las líneas celulares de cáncer de colon *in vitro*, se evaluó el efecto citotóxico de estos péptidos sobre las líneas celulares control, fibroblastos normales, la línea celular no cancerosa HEK-293 y glóbulos rojos mediante una prueba de hemólisis.

Dicha prueba de hemólisis es comúnmente utilizada en el cribado de péptidos y son consideradas células altamente sensibles²⁵⁰. La hemólisis es la ruptura de los glóbulos rojos principalmente causada por afectación de la membrana y es un evento adverso que puede ocurrir ante el uso de la quimioterapia²⁵¹, motivo por el cual es importante estudiarla durante el desarrollo de nuevos fármacos.

Igualmente, debido a que la evaluación de la actividad hemolítica es altamente utilizada, existen plataformas, como HAPPENN, el cual es un clasificador de redes neuronales artificiales para la predicción de la actividad hemolítica de péptidos, en donde la puntuación tiene un rango de 0 a 1, siendo 1 la mayor capacidad hemolítica²⁵², o la plataforma HemoPred²⁵³, sin embargo, estas no permiten la evaluación de péptidos con inclusión de aminoácidos D o moléculas no naturales. Bajo estas plataformas, se evaluó el péptido LfcinB (21-25)_{Pal}, el cual se consideró no hemolítico en ambas plataformas, con una puntuación en HAPPENN de 0.033, caso contrario a lo observado con el péptido de la melitina el cual ha

presentado efecto hemolítico a 15.6 $\mu\text{g/mL}$ de 100% (HAPPENN: 0.987 y hemolítico en HemoPred)²⁵⁴ (Tabla 14).

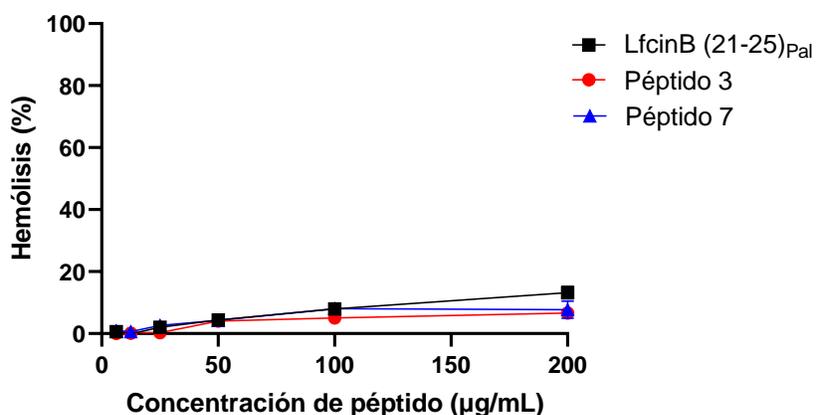


Figura 25: Actividad hemolítica de los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal}, **3** y **7**. Los datos se expresan como la media \pm SD (n = 3). Se realizó una prueba ANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de los péptidos modificados comparado con el palíndromo.

Como se puede observar en la **Figura 25**, la actividad hemolítica de los tres péptidos se incrementa con la concentración del péptido y solo el péptido hit LfcinB (21-25)_{Pal} presentó un porcentaje de hemólisis superior al 10% a la máxima concentración evaluada (200 $\mu\text{g/mL}$). Los tres péptidos presentan un bajo porcentaje de hemólisis a la concentración del IC₅₀ observado en las células cancerosas, sugiriendo que estos péptidos pueden ser considerados con bajo potencial hemolítico. Igualmente, se presenta el índice de selectividad, el cual fue mayor a 1 en todos los casos.

Péptidos	LfcinB (21-25) _{Pal}	Péptido 3	Péptido 7
Hemólisis (%)*	13.2	7.7	6.6
Índice de selectividad			
Glóbulos rojos*/ HT-29	1.3	>1.1	>1.3
Glóbulos rojos*/ Caco-2	1.6	>3.1	>3.4

Tabla 14: Efecto hemolítico de los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal}, **3** y **7**. La actividad hemolítica de los péptidos se presenta a 200 $\mu\text{g/mL}$.*

Por otra parte, se observó que las modificaciones realizadas en los péptidos **3** y **7** redujeron levemente el efecto hemolítico a la máxima concentración evaluada incrementando el índice terapéutico de los péptidos. Esto está de acuerdo con lo reportado por Takahashi y

colaboradores donde evaluaron péptidos análogos de Mastoparan, en donde al incluir residuos de Orn el efecto hemolítico de los péptidos fue inferior²⁵⁵.

Los ensayos con células no cancerosas muestran que los péptidos **3** y **7** presentaron índices de selectividad menores a 1 en células cancerosas HT-29, indicando que son más citotóxicos para las células HEK-293 y los fibroblastos (**Figura 26, Tabla 15**). Mientras que el péptido palindrómico LfcinB (21-25)_{Pal} fue selectivo para células HT-29 respecto a fibroblastos. Los péptidos **3** y **7** fueron más selectivos para las células Caco-2 y diferencian entre las células cancerosas y las células HEK-293. Estos resultados son concordantes con el hecho que las modificaciones realizadas en los péptidos **3** y **7** potenciaron significativamente el efecto citotóxico en las células Caco-2, mientras que en las células HT-29 el efecto citotóxico fue similar al del péptido palindrómico.

Código	IC ₅₀ (µM/ µg/mL)		Índice de selectividad			
	HEK 293	Fibroblastos	HEK 293/ HT-29	Fibroblastos/ HT-29	HEK 293/ Caco-2	Fibroblastos/ Caco-2
LfcinB(21-25) _{Pal}	68/101	>200/>134	0.7	> 2.0	0.8	>2.5
3	51/74	98/157	0.5	0.5	1.3	1.4
7	86/132	55/79	0.7	0.8	2.2	2.5

Tabla 15: Índice de selectividad y efecto citotóxico de los péptidos en células HEK-293 y fibroblastos.

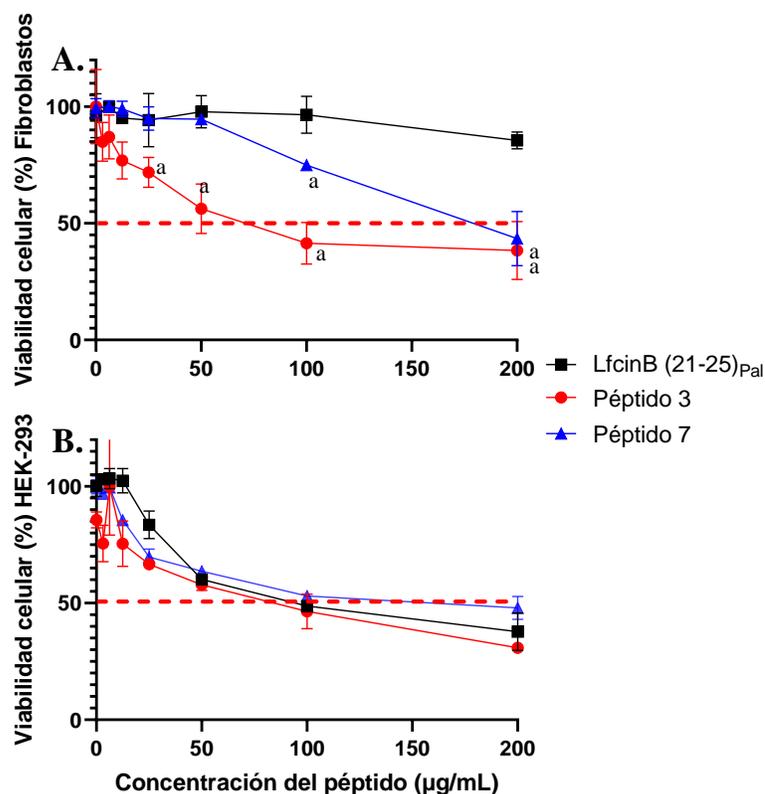


Figura 26: Efecto citotóxico de los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal}, **3** y **7** en células no cancerosas. Las células fueron tratadas con el péptido por 2h y la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo MTT. (A) Fibroblastos, (B) Línea celular HEK- 293. Los datos se expresan como la media \pm SD (n = 3). Se realizó una prueba ANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de los péptidos modificados comparados con el palíndromo ^ap < 0.05.

- Dimerización** (péptidos **13**, **14** y **15**): Debido a que el péptido LfcinB (21-25)_{Pal2} presentó mejor actividad que el péptido LfcinB (21-25)_{Pal}, se decidió evaluar los dímeros de los péptidos **3** y **7**. Además, se sintetizó el péptido dimérico **15** ((Ac-RWQWRWQWR)₂-K-Ahx-CONH₂), para determinar si el bloqueo del grupo amino libre del N-terminal afectaba la actividad. Para estos casos, la actividad solo se evaluó frente a la línea celular de cáncer de colon HT-29 que es la más resistente. Los resultados muestran que en todos los casos la dimerización de estas secuencias potenció el efecto citotóxico (**Tabla 16**). Los péptidos **14** y **15**, presentaron un efecto citotóxico significativo con valores de IC₅₀ de 12 µM.

Péptido	Secuencia	IC ₅₀ (μM/ μg/mL)
		HT-29
LfcinB(21-25) _{Pal}	H ₂ N-RWQWRWQWR-CONH ₂	100/149
LfcinB(21-25) _{Pal2}	(H ₂ N-RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	34/108
13	(H ₂ N-Ahx-RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	49/166
14	(H ₂ N-RWQWRWQW-Orn) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	12/39
15	(Ac-RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	12/40

Tabla 16: Efecto citotóxico de péptidos diméricos en la línea celular de cáncer de colon HT-29.

En cuanto a la selectividad de estos péptidos, se evaluó su efecto frente a fibroblastos y glóbulos rojos, encontrando una actividad hemolítica aproximadamente 10 veces menor que la del péptido lineal, lo que es determinante también en la selectividad. Los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal2} y **15** presentaron los mejores resultados con un IS mayor que 1 y no fueron hemolíticos a las concentraciones evaluadas. Estos resultados sugieren que la dimerización de secuencias derivadas del péptido palindrómico es una estrategia viable para aumentar la actividad y la selectividad (**Tabla 17**).

Código	Secuencia	IC ₅₀ (μM/ μg/mL) Fibroblastos	IS Fibroblastos/HT-29	Hemólisis (%)
LfcinB (21-25) _{Pal}	H ₂ N-RWQWRWQWR-CONH ₂	>134/>200	>2.0	13
LfcinB (21-25) _{Pal2}	(H ₂ N-RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	>134/>200	>1,9	2.2
13	(H ₂ N-Ahx-RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	19/66	0,4	1.3
14	(H ₂ N-RWQWRWQW-Orn) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	4/13	0,3	1.2
15	(CH ₃ -CO-RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	>61/>200	>5	3.5

Tabla 17: Efecto hemolítico, efecto citotóxico de los péptidos diméricos contra fibroblastos, e índice de selectividad. La actividad hemolítica de los péptidos se presenta a 200 μg/mL*.

- **Librería de la secuencia RRWQWR, péptidos (16 y 17).** Los resultados muestran que ninguno de los péptidos a las concentraciones evaluadas presentó efecto citotóxico contra la línea celular HT-29 (**Tabla 18**). Lo que indica que ni la inclusión del Ahx y ni la biotina mejoraron la actividad de esta secuencia.

Código	Secuencia	IC ₅₀ (μM/ μg/mL)
		HT-29
LfcinB (20-25)	H ₂ N-RRWQWR-CONH ₂	>203/>200
16	H ₂ N-Ahx-RRWQWR-CONH ₂	>226/>200
17	Biotina-Ahx-RRWQWR-CONH₂	>273/>200

Tabla 18: Efecto citotóxico de péptidos con la secuencia RRWQWR en la línea celular de cáncer de colon HT-29.

Nuestros resultados muestran que ninguno de los péptidos LfcinB (20-25), **16** y **17** presentaron actividad citotóxica en células HT-29. Estos resultados son similares a los obtenidos para la línea celular Caco-2, donde el péptido LfcinB (20-25) tampoco presentó efecto citotóxico a las concentraciones evaluadas. En reportes previos se ha evaluado la actividad anticancerosa de este péptido, específicamente en cáncer oral, cáncer de mama, leucemia, donde se ha evidenciado que este péptido no presentó efecto citotóxico a las concentraciones evaluadas. Por otra parte, se destaca que este péptido contenido en liposomas que internalizaron células Jurkat fue capaz de inducir la muerte celular mediada por apoptosis, sugiriendo que el péptido es solo activo al interior de la célula²³. Es interesante el hecho que las diferencias de las secuencias del motivo mínimo (H₂N-RRWQWR-CONH₂) y el péptido palindrómico (H₂N-RWQWRWQWR-CONH₂) son la ausencia de un residuo de Arg en el extremo N-terminal y el motivo WQWR en el extremo C-terminal, indicando que esta región es relevante para la actividad citotóxica potenciada en las células Caco-2 y HT-29.

8.3.2 Librería derivada del péptido hit ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂

La librería desarrollada a partir del péptido ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂ se basó en los resultados obtenidos con la librería del péptido LfcinB (21-25)_{Pal}. En la **Tabla 19** se, muestran los resultados del efecto citotóxico de los péptidos en las líneas de cáncer de colon HT-29 y Caco-2.

Los resultados muestran que todos los péptidos diméricos presentaron actividad citotóxica en al menos una línea celular derivada de cáncer de colon evaluada. Los péptidos ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, **18-20** y **22-25** presentaron efecto citotóxico significativo contra ambas líneas celulares evaluadas. Todos los péptidos presentaron mayor efecto citotóxico que el péptido palindrómico hit LfcinB (21-32)_{Pal}, indicando que la dimerización puede incrementar significativamente la actividad citotóxica. Se puede observar que los péptidos ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, **22**, **24** y **25** presentaron el mayor efecto citotóxico en ambas líneas celulares, destacándose los péptidos ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂ y **22**. Contrario a lo observado, los péptidos ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, **18**, **24** y **25** presentaron menor actividad citotóxica en las células

Caco-2 respecto a las células HT-29, sugiriendo que el comportamiento observado en los péptidos lineales monoméricos es diferente al de los péptidos diméricos. Estos resultados son concordantes con resultados reportados anteriormente donde se evidencia que la polivalencia de secuencias monoméricas derivadas de LfcinB potenció la actividad citotóxica en líneas celulares derivadas de cáncer oral, cáncer de mama como también la actividad antibacteriana en cepas Gram positivas y Gram negativas²⁰¹.

Código	Secuencia	IC ₅₀ (μM/ μg/mL)	
		HT-29	Caco-2
²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	(H ₂ N-RRWQWRFKKLK) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	12/39	18/58
18	(H ₂ N- Orn -RWQWRFKKLK) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	18/60	38/123
19	(H ₂ N- R-Orn -WQWRFKKLK) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	30/99	12/41
20	(H ₂ N-RRWQW- Orn -FKKLK) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	49/161	10/33
21	(H ₂ N- ^d RRWQWRFKKLK) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	>59/>200	45/150
22	(H ₂ N- ^d R-Orn -WQWRFKKLK) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	20/65	11/37
23	(H ₂ N- ^d RRWQW-Orn -FKKLK) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	35/115	16/52
24	(H ₂ N- Ahx -RRWQWRFKKLK) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	19/66	25/89
25	(Biotin -Ahx-RRWQWRFKKLK) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	17/69	20/78
26	(Ac-Ahx -RRWQWRFKKLK) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	24/86	ND

Tabla 19: Efecto citotóxico de los péptidos diméricos de la librería de la secuencia ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂ en líneas celulares de cáncer de colon.

Cambios secuenciales Arg/Orn (Péptidos 18, 19 y 20): El péptido ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂ presentó efecto citotóxico significativo contra ambas líneas celulares. Es importante resaltar que es este péptido también presentó efecto citotóxico significativo contra líneas celulares de cáncer de mama sugiriendo que su actividad es de amplio espectro en diferentes tipos de cáncer²⁰. Para este caso se puede observar que la inclusión de la Orn en diferentes sitios de la secuencia no afecta significativamente la actividad, sin embargo se debe resaltar que a medida que el residuo de la Orn se localiza más hacia el extremo N-terminal de la secuencia la actividad citotóxica en las células HT-29 se incrementó mientras que en las células Caco-2 disminuyó, sugiriendo que la actividad citotóxica en ambas células se ve afectada por la posición de la Orn en la secuencia, a pesar de que los tres péptidos tienen la misma composición de aminoácidos y la misma carga neta. En forma similar a lo observado anteriormente con los péptidos monoméricos lineales, también se observa que la actividad

citotóxica de los péptidos diméricos es diferencial entre las células HT-29 y Caco-2, sugiriendo que los péptidos interactúan de forma diferente dependiendo del tipo de célula cancerosa. También se debe considerar que cuando se cambiaron alguna de las dos Arg que hacen parte del motivo mínimo se incrementó la actividad citotóxica en mayor grado, lo que podría sugerir que las modificaciones en la zona del motivo mínimo tienen mayor impacto en la actividad (**Figura 27**).

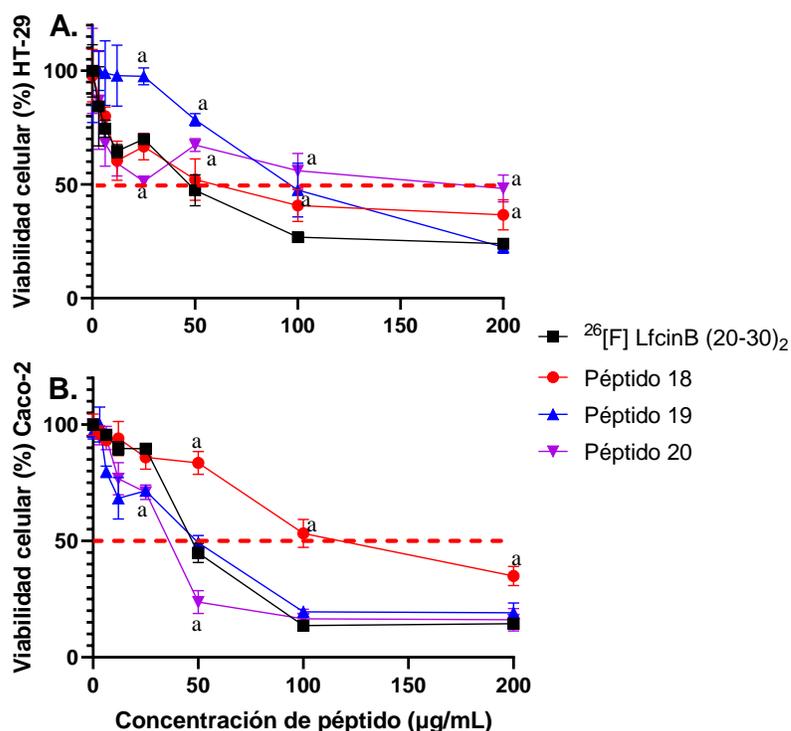


Figura 27: Efecto citotóxico de los péptidos $^{26}\text{[F]LfcinB (20-30)}_2$, **18**((Orn-RWQWRFKKL G) $_2$ -K-Ahx), **19**((R-Orn-WQWRFKKL G) $_2$ -K-Ahx) y **20**((RRWQW-Orn-FKKL G) $_2$ -K-Ahx). Las células fueron tratadas con el péptido por 2h y la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo MTT. (A) Línea celular HT-29 (B) Línea celular Caco-2. Los datos se expresan como la media \pm SD (n = 3). Se realizó una prueba ANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de los péptidos modificados comparados con el dímero original $^a p < 0.05$.

El cambio por D-Arg en el extremo N-terminal llevó a la pérdida de actividad del péptido **21** en la línea celular HT-29 y disminución de la actividad en la línea Caco-2. Al comparar la actividad de los péptidos **22** y **23** con sus homólogos de **19** y **20**, no se encontraron cambios significativos en la actividad, sugiriendo que la presencia de Orn en la secuencia es relevante para la actividad.

Los péptidos con moléculas no peptídicas en el extremo N-terminal (**24-26**) presentaron similar actividad que el péptido hit $^{26}\text{[F]}$ -LfcinB (20-30)₂, sugiriendo que la funcionalización del extremo N-terminal en secuencias diméricas no afecta significativamente el efecto (**Figura 28**). Es importante resaltar que la incorporación de la biotina mantuvo la actividad, posibilitando el uso de este péptido como una posible sonda de marcación. Caso contrario a lo observado previamente con el péptido palindrómico, esto posiblemente a que el impedimento estérico causado por la biotina en la secuencia dimérica tiene un menor impacto global.

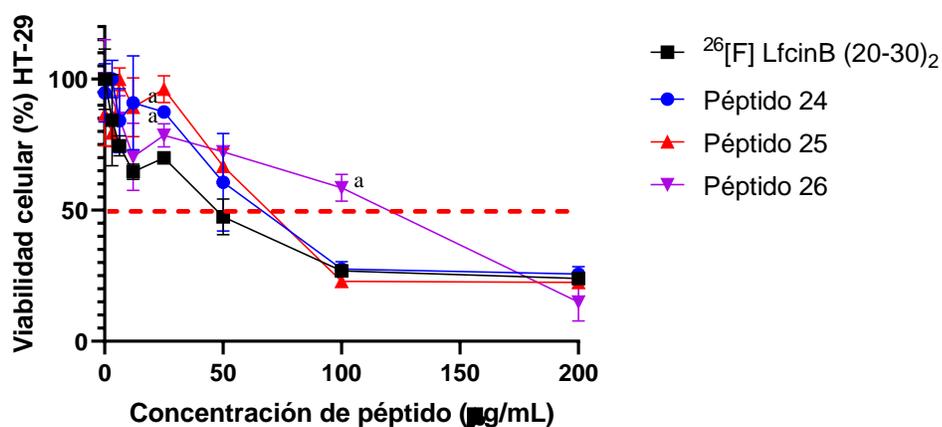


Figura 28: Efecto citotóxico de los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal2}, **24**((Ahx-RRWQWRFKKLK)₂-K-Ahx), **25**((Biotina-Ahx-RRWQWRFKKLK)₂-K-Ahx) y **26**((Ac-Ahx-RRWQWRFKKLK)₂-K-Ahx) en la línea celular HT-29. Las células fueron tratadas con el péptido por 2h y la viabilidad fue determinada mediante el ensayo MTT. Los datos se expresan como la media \pm SD (n = 3). Se realizó una prueba ANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas del péptido 7 comparado con el palíndromo ^ap < 0.05.

La actividad hemolítica de los péptidos diméricos a la máxima concentración evaluada (200 µg/mL) fue menor al 9%, sugiriendo su baja toxicidad en células normales. Los resultados muestran que los péptidos $^{26}\text{[F]}$ -LfcinB (20-30)₂, **19** y **20** presentaron valores de IS mayores que 1 en todos los casos indicando su selectividad por las líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y Caco-2 (**Tabla 20**).

Código	IC ₅₀ (μM/ μg/mL)		Hemólisis (%) [*]	Índice de selectividad			
	HEK 293	Fibroblastos		HEK 293/ HT-29	Fibroblastos/ HT-29	HEK 293/ Caco-2	Fibroblastos/ Caco-2
²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	22/72	34/111	6	1,8	2,8	1,2	1,8
18	25/82	20/68	3	1,4	1,1	0,7	0,5
19	41/134	17/56	5	1,4	0,6	3,4	1,4
20	>61/>200	>61/>200	5	>1,2	>1,2	6,1	6,1
22	14/46	9/31	5	0,7	0,5	1,3	0,8
23	25/81	23/74	7	0,7	0,7	1,6	1,4
24	19/67	29/104	5	1,0	1,5	0,8	1,2
25	16/62	49/197	6	0,9	2,9	0,8	2,5
26	ND	19/68	9	ND	0,8	ND	ND

Tabla 20: Actividad hemolítica, efecto citotóxico contra células HEK-293 y fibroblastos e índice de selectividad de los péptidos diméricos de la librería ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂. *La actividad hemolítica se evaluó a 200 μg/mL.

De esta etapa se alcanzaron los siguientes logros (**Figura 29**):

- Se determinó que 15 de los 34 péptidos evaluados en las librerías peptídicas presentaron actividad citotóxica frente a ambas líneas celulares de cáncer de colon a las concentraciones evaluadas.
- Se identificaron péptidos monoméricos (LfcinB (21-25)_{Pal}, **3** y **7**) y diméricos (LfcinB (21-25)_{Pal2}, ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, **13-15**, **18-20**, y **22-26**) con actividad anticancerosa en líneas celulares derivadas de cáncer de colon.
- Se estableció que la polivalencia potenció el efecto citotóxico en las líneas celulares derivadas de cáncer de colon evaluadas.
- Se estableció que el péptido palindrómico y algunos de sus análogos actúan de forma diferencial con las células HT-29 y Caco-2, siendo esta última las más sensible.
- En cuanto a los análogos del péptido palindrómico, se observó que a pesar de que se mantenía la carga neta de la secuencia y su composición de aminoácidos, algunos péptidos análogos presentaron mayor actividad citotóxica principalmente en células Caco-2.
- La inclusión de D-Arg en el extremo N-terminal de la secuencia palindrómica reduce significativamente la actividad citotóxica en las líneas de cáncer de colon indicando que la L-Arg es relevante para la actividad del péptido. Lo que sugiere que la interacción péptido-célula puede estar mediada por una interacción específica,

además de la interacción inespecífica electrostática característica de los péptidos catiónicos.

- A partir de los resultados se seleccionaron ocho péptidos como los más promisorios (péptidos optimizados) para continuar con los siguientes estudios: LfcinB (21-25)_{Pal}, **3**, LfcinB (21-25)_{Pal2}, **14**, **15**, ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, **19** y **20**.
- Se cumplió con el tercer objetivo específico planteado en este trabajo.

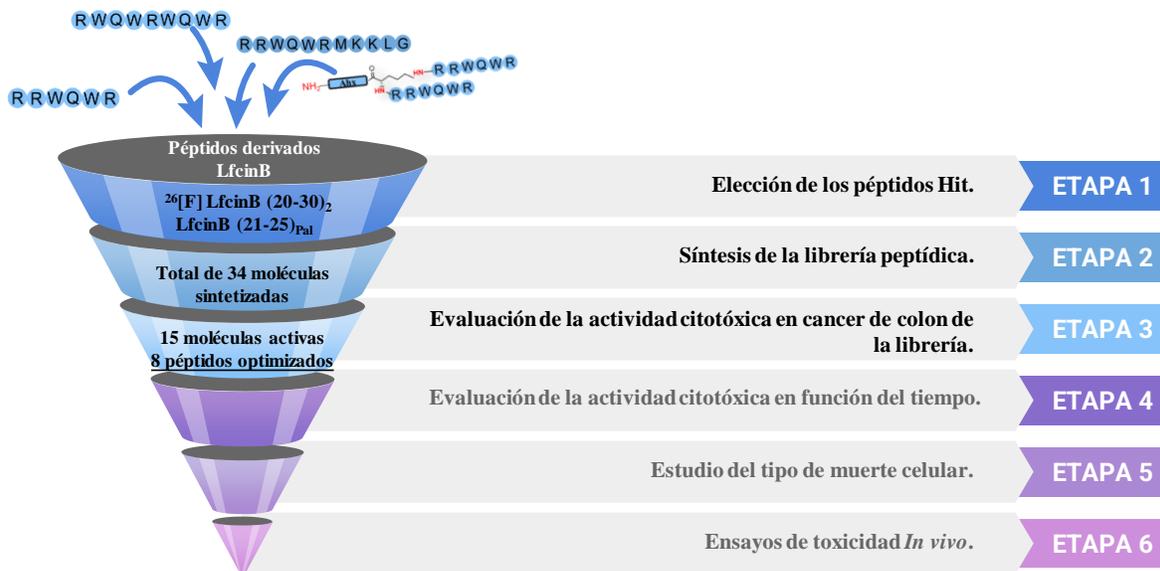


Figura 29: Etapa 3: Evaluación de la actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de colon. Finaliza con 15 moléculas que presentaron actividad citotóxica y 8 péptidos optimizados con la mejor actividad y selectividad.

8.4 Etapa 4 : Evaluación de la actividad citotóxica en función del tiempo.

1. Efecto citotóxico de los péptidos en función del tiempo de tratamiento

Para establecer si el efecto citotóxico de los péptidos cambiaba en función del tiempo de tratamiento, se evaluó el efecto citotóxico de los péptidos que presentaron los mejores resultados, tratando las células por 24 y 48 horas, teniendo en cuenta que el tiempo de duplicación de la línea celular de la línea celular HT-29 es de 22,4 horas (**Figura 30**).

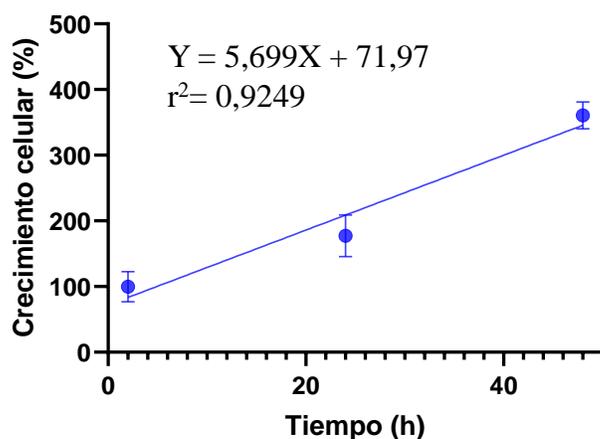


Figura 30: Crecimiento de las células HT-29 en función del tiempo.

Los resultados muestran que la actividad citotóxica de los péptidos en las células HT-29 se mantuvo hasta por 48 horas y que, en algunos casos, los valores del IC₅₀ disminuyeron, sugiriendo que estos péptidos ejercen su actividad de forma rápida y se mantiene a través del tiempo e incluso después del tiempo de duplicación de la línea celular (**Figura 31, Tabla 21**).

Péptido	Secuencia	IC ₅₀ (μM/ μg/mL)		
		Células HT-29		
		2h	24h	48h
LfcinB (21-25) _{Pal}	H ₂ N-RWQWRWQWR-CONH ₂	100/149	117/174	122/181
3	H ₂ N-RWQWRWQW- Orn -CONH ₂	109/157	89/129	137/198
LfcinB (21-25) _{Pal2}	(H ₂ N-RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	34/108	7/22	11/35
14	(H ₂ N-RWQWRWQW- Orn) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	12/38	6/19	10/31
15	(Ac -RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	12/40	13/43	13/44
²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	(H ₂ N-RRWQWRFKKL) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	12/39	26/86	34/114
19	(H ₂ N-R- Orn -WQWRFKKL) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	30/99	10/33	9/31
20	(H ₂ N-RRWQW- Orn -FKKL) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	49/160	29/94	27/87

Tabla 21: Actividad citotóxica de péptidos contra la línea celular HT-29 a diferentes tiempos de determinación.

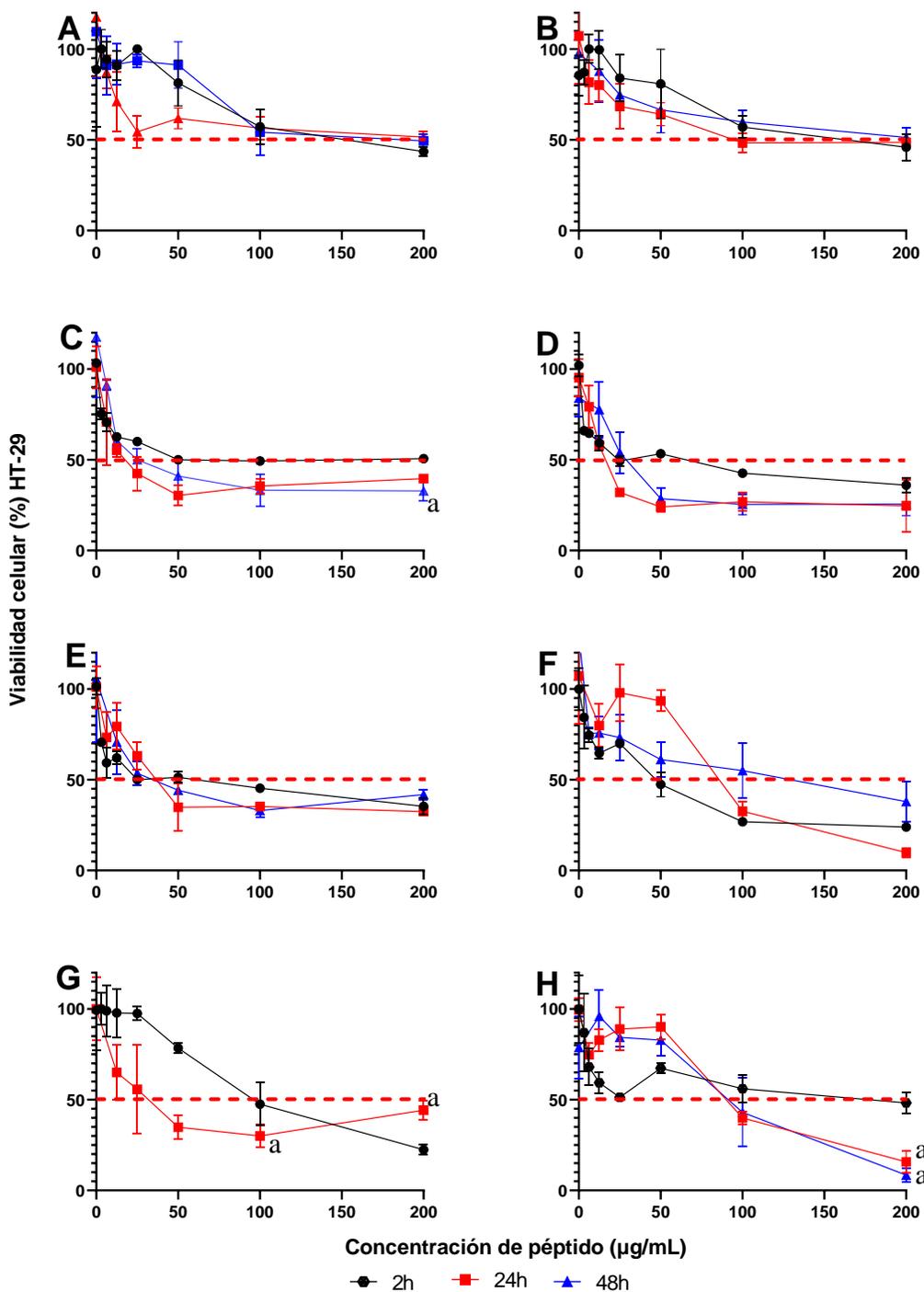


Figura 31: Efecto citotóxico en el tiempo de los péptidos optimizados frente a la línea celular HT-29. Las células fueron tratadas con el péptido por 2, 24 o 48 horas y la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Los datos se expresan como la media \pm SD ($n = 3$). A. LfcinB (21-25)_{Pal}, B. Péptido **3**, C. LfcinB (21-25)_{Pal2}, D. Péptido **14**, E. Péptido **15**, F. ²⁶[F] LfcinB (20-30)₂, G. Péptido **19**, H. Péptido **20**. Se realizó una prueba ANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de cada péptido comparado con su resultado a 2 horas ^a $p < 0.05$.

Para el péptido **3** se evaluó el efecto citotóxico en células Caco-2 también a las 72 horas, encontrando que los resultados fueron similares a los de la línea HT-29 (**Figura 32, Tabla 22**).

Código	Secuencia	IC ₅₀ (μM/ μg/mL)	
		2h	72h
Péptido 3	H ₂ N-RWQWRWQW-Orn-CONH ₂	33/57	6/12

Tabla 22: Efecto citotóxico del péptido **3** en la línea celular Caco-2 a diferentes tiempos de tratamiento.

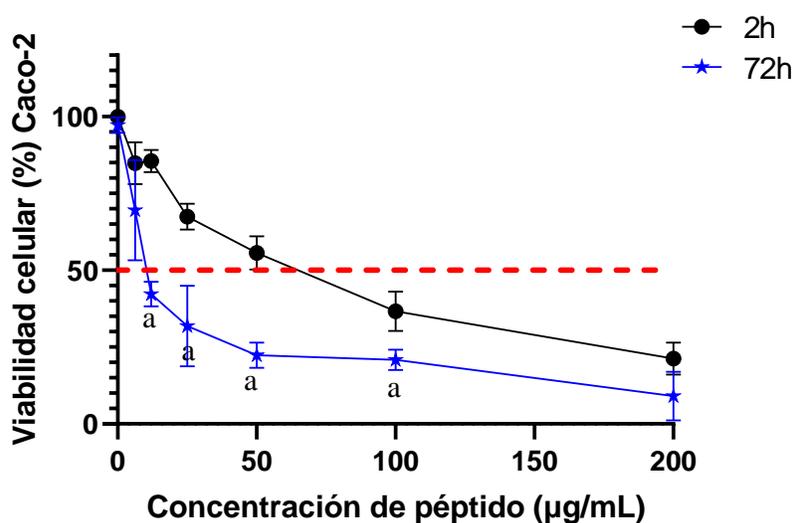


Figura 32: Efecto citotóxico en el tiempo del péptido **3** frente a la línea celular Caco-2. Las células fueron tratadas por 2 o 72h y la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo MTT. Los datos se expresan como la media ± SD (n = 3). Se realizó una prueba ANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de cada péptido comparado con su resultado a 2 horas ^ap < 0.05.

2. Efecto citotóxico de los péptidos en función del número de tratamientos

De los péptidos con mejores resultados, se seleccionó el péptido **3** debido a su disponibilidad y alta viabilidad sintética. En este caso se desarrolló la evaluación del efecto citotóxico del péptido en las células HT-29 con el fin de determinar el efecto ante un posible tratamiento multidosis (**Figura 33**). Para esto se realizaron los siguientes ensayos de manera simultánea utilizando concentraciones entre 6-200 μg/mL.

1. Las células fueron tratadas con el péptido a tiempo 0 min (tratamiento₁) e incubadas hasta las 48 h (**Figura 33**-Barra azul).

2. Las células fueron tratadas con el péptido a tiempo 0 min (tratamiento₁) e incubadas por 4 h, luego el sobrenadante fue retirado y las células fueron nuevamente tratadas con el péptido e incubadas hasta las 48 h (**Figura 33**-Barra roja).
3. Las células fueron tratadas con el péptido a tiempo 0 min (tratamiento₁) e incubadas por 24 h, luego el sobrenadante fue retirado y las células fueron nuevamente tratadas con el péptido e incubadas hasta las 48 h (**Figura 33**-Barra verde).
4. Las células fueron tratadas con el péptido a tiempo 0 min (tratamiento₁) e incubadas por 46h, luego el sobrenadante fue retirado y las células fueron nuevamente tratadas con el péptido e incubadas hasta las 48 h (**Figura 33**-Barra morada).

Esto nos permitiría establecer:

- i) Si las células que no murieron durante el tratamiento inicial fueron afectadas por el segundo tratamiento a diferentes tiempos.
- ii) Cuál es el efecto del segundo tratamiento en la viabilidad celular.

Al realizar el tratamiento (experimento 2), se observó una disminución de la viabilidad celular y del valor del IC₅₀, alcanzándose diferencias significativas comparado con el tratamiento único por 48 horas (experimento 1), lo que sugiere que las células que sobrevivieron al tratamiento inicial continuaron siendo susceptibles al segundo tratamiento. De la misma forma, se determinó que cuando se realizó el tratamiento a las 24 y 46 horas (experimentos 3 y 4) se alcanzó la menor viabilidad celular, posiblemente por el tiempo tan corto que tuvieron las células que quedaron viables para proliferar luego del tratamiento a las 24h (experimento 3) (**Tabla 23**).

Ensayo	IC ₅₀ (µM/ µg/mL)	Viabilidad celular a 200µg/mL(± SD)
Experimento 1	137/198	51.4 ± 5.2
Experimento 2	15/22	28.6 ± 12.1
Experimento 3	7/10	8.4 ± 3.2
Experimento 4	5/7	6.0 ± 2.3

Tabla 23: Actividad citotóxica del péptido 3 en la línea celular HT-29 en función del tiempo del segundo tratamiento.

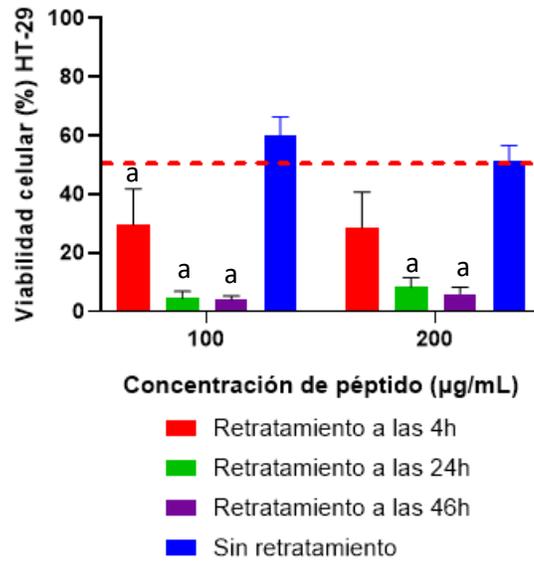


Figura 33: Efecto citotóxico ante el re-tratamiento del péptido **3** en células HT-29. Las células fueron tratadas inicialmente con diferentes concentraciones de péptido (tiempo cero), luego el medio de cultivo fue cambiado con medio que contenía el péptido (retratamiento a diferentes tiempos de 4, 24 y 46 h). Los datos se expresan como la media \pm SD ($n = 3$). Se realizó una prueba ANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de los diferentes tratamientos comparado con el tratamiento único durante 48 horas $^a p < 0.05$.

3. Evaluación del efecto citotóxico en la proliferación celular

Se trataron las células con el péptido y luego de 2h de incubación el sobrenadante fue retirado y se adicionó medio suplementado sin péptido y las células se incubaron hasta las 48 h (**Figura 34, Tabla 24**). Como control las células fueron tratadas con el péptido y fueron incubadas hasta 48 h.

Ensayo	IC ₅₀ (µM/ µg/mL)	Viabilidad celular a 200 µg/mL (\pm SD)
Tratamiento 48h	137/198	51.4 \pm 5.2
Tratamiento 2h y cambio a medio suplementado	>138/>200	61.6 \pm 4.2

Tabla 24: Actividad citotóxica del péptido **3** contra la línea celular HT-29 ante el cambio a medio suplementado (2h).

Los resultados muestran que las células tratadas por 2h y el medio fue cambiado por uno suplementado que no contenía péptido e incubadas hasta las 48 h, la viabilidad celular fue

61.6%, mientras que cuando las células fueron tratadas con el péptido por 48h, la viabilidad celular fue del 51.4%. Estos resultados indican que cuando el péptido fue retirado del medio a las 2h, las células viables posiblemente proliferaron, sin embargo, se observó un porcentaje significativo de la población (aprox. 40%) no viable, sugiriendo que el efecto del péptido permanece activo en el tiempo (**Figura 34**).

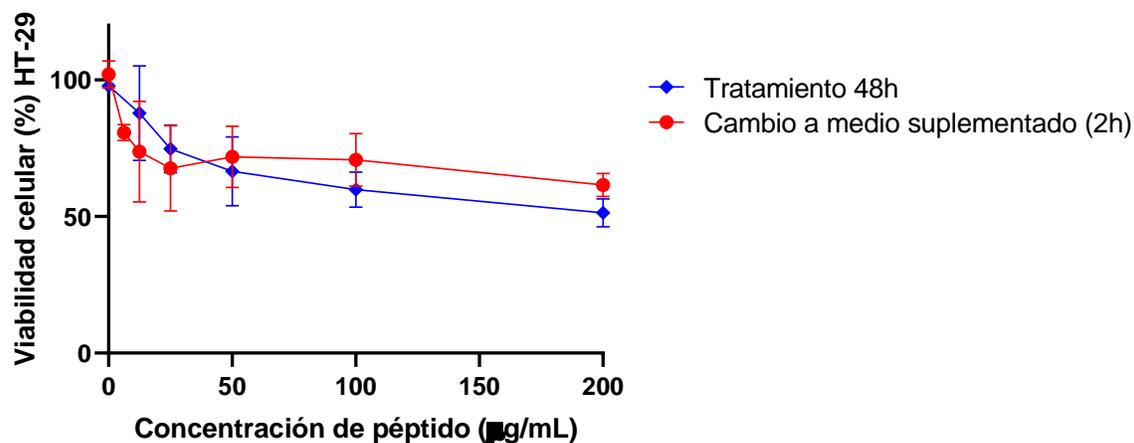


Figura 34: Efecto citotóxico del péptido 3 en células HT-29 ante el cambio a medio suplementado. Las células fueron tratadas con el péptido por 2h, luego el sobrenadante se retiró y se adicionó medio suplementado y se incubó por hasta las 48 h (línea continua en rojo). Los datos se expresan como la media \pm SD ($n = 3$). Se realizó una prueba ANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de los diferentes tratamientos comparado con el tratamiento único durante 48 horas $^a p < 0.05$.

4. Determinación del efecto citotóxico de los péptidos frente la línea celular DU-145.

Teniendo en cuenta que se ha reportado que pacientes con cáncer de colon presentan metástasis en otros órganos, incluyendo la próstata²⁵⁶, se evaluó el efecto citotóxico de algunos de los péptidos optimizados sobre la línea celular de cáncer de próstata DU-145 (**Tabla 25**).

Se encontró que 5 de los 6 péptidos evaluados presentaron actividad citotóxica frente a la línea celular DU-145, sugiriendo que estos péptidos tienen espectro de acción en otro tipo de cáncer. El péptido 20 fue el único péptido que presentó efecto citotóxico en las líneas celulares de cáncer de colon y no presentó actividad en las células DU-145.

Efecto citotóxico de los péptidos en las células DU-145		
Código	Secuencia	IC ₅₀ (μM/μg/mL)
LfcinB (21-25) _{Pal}	H ₂ N-RWQWRWQWR-CONH ₂	40/60
3	H ₂ N-RWQWRWQW- Orn -CONH ₂	62/89
LfcinB (21-25) _{Pal2}	(H ₂ N-RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	8/25
²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	(H ₂ N-RRWQWRFKKLG) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	17/56
19	(H ₂ N-R- Orn -WQWRFKKLG) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	29/96
20	(H ₂ N-RRWQW- Orn -FKKLG) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	>200

Tabla 25: Actividad citotóxica de péptidos contra la línea celular DU-145.

5. Evaluación del efecto citotóxico en diferentes lotes de síntesis de los péptidos 3 y 19

Dentro del proyecto de investigación del que hace parte este trabajo, se realizó el escalamiento de la síntesis química de los péptidos, con el fin de obtener cantidades suficientes para ensayos *in vivo* posteriores. Para esto se eligieron los péptidos **3** y **19**, se realizaron dos escalamientos de la síntesis de los péptidos utilizando 200 mg (Lote 01) y 700 mg (Lote 02) de resina de partida, lo cual fue realizado por el estudiante Juan Esteban Reyes en su trabajo de grado de pregrado. Los lotes fueron caracterizados por RP-HPLC, espectrometría de masas, RMN y espectroscopía FT-IT, observándose que el escalamiento no afectó la integridad y se mantuvo la identidad de los péptidos en los lotes obtenidos.

En este trabajo, se evaluó la actividad citotóxica de los lotes con el fin de establecer si el escalamiento de la síntesis afectaba su actividad citotóxica en la línea celular HT-29 (**Figura 35**).

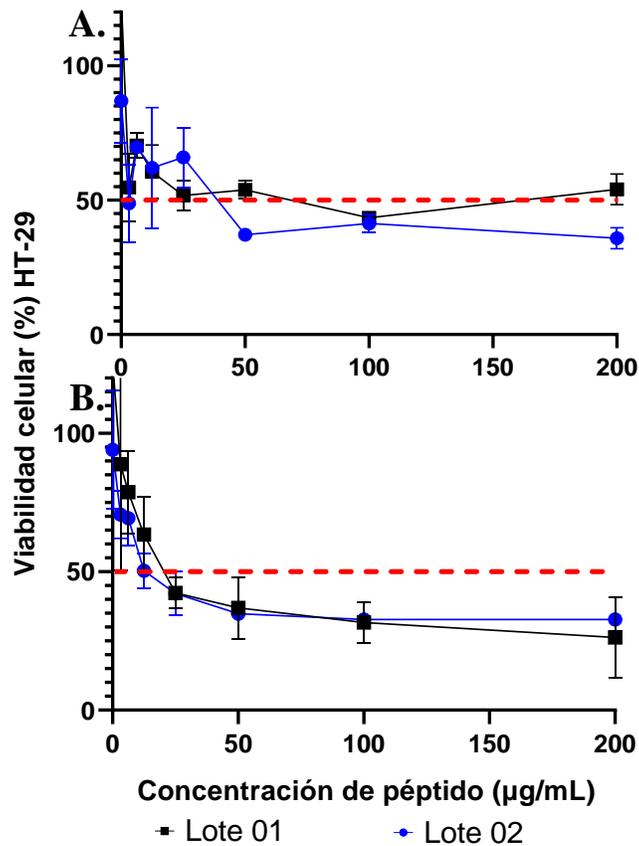


Figura 35: Viabilidad celular las células HT-29 tratadas con los lotes 01 y 02 de los péptidos **3** y **19**. A. Péptido **3** y B. Péptido **19**. Determinación realizada mediante el ensayo de viabilidad celular MTT a 2 horas en la línea celular HT-29. Los datos se expresan como la media \pm DE (n = 3). Se realizó una prueba ANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de los diferentes tratamientos.

Los resultados muestran que el efecto citotóxico de los dos lotes, de cada péptido, presentaron un comportamiento similar al observado con el péptido inicialmente evaluado. Indicando que los lotes y el péptido inicial que fueron sintetizados en diferentes tiempos y con variaciones de las condiciones de síntesis que requirieron los escalamientos no afectaron la actividad citotóxica de los péptidos. Este aspecto es importante ya que permitió implementar y optimizar la obtención de grandes cantidades de estos péptidos por SPPS y que los procesos de síntesis no afectaron la integridad, la identidad, ni la actividad citotóxica.

6. Evaluación del efecto citotóxico frente líneas celulares de otros cánceres.

Debido a que algunos péptidos presentaron efecto citotóxico frente a la línea celular derivada de cáncer de próstata DU-145, y a que este trabajo se enmarca en un proyecto que busca

identificar péptidos promisorios de amplio espectro de actividad frente a diversos cánceres, se determinó la actividad citotóxica de algunos péptidos (de acuerdo con su disponibilidad) frente a la línea celular MCF-7 de cáncer de mama y de cáncer de cuello uterino HeLa (**Tabla 26**).

Código	Secuencia	IC ₅₀ (μM/ μg/mL)	
		MCF-7	HeLa
LfcinB (21-25) _{Pal}	H ₂ N-RWQWRWQWR-CONH ₂	81/120^a	37/55
3	H ₂ N-RWQWRWQW- Orn -CONH ₂	>138/>200	>138/>200
LfcinB (21-25) _{Pal2}	(H ₂ N-RWQWRWQWR) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	ND	63/200
²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	(H ₂ N-RRWQWRFKKLK) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	23/79^b	7/24
19	(H ₂ N-R- Orn -WQWRFKKLK) ₂ -K-Ahx-CONH ₂	26/84	29/96

Tabla 26: Actividad citotóxica de péptidos contra la línea celular MCF-7 y HeLa. Reportado en: ^a226, ^b257

Los resultados se muestran que los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal}, ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂ y **19** presentaron actividad frente a las 5 líneas celulares evaluadas las cuales representan 4 tipos de cáncer (colon, mama, cuello uterino y próstata). Estos resultados están de acuerdo con reportes previos que muestran la versatilidad de los péptidos anticancerígenos, la cual ha sido atribuida a su mecanismo de acción²⁵⁸. Igualmente, estos péptidos representaron selectividad al compararse con líneas celulares normales y/o glóbulos rojos, por lo que son resultados positivos en la búsqueda de fármacos activos de amplio espectro para el tratamiento del cáncer. Nuevamente se observó que los péptidos tienen efecto citotóxico diferencial de acuerdo con el tipo de línea celular evaluada, sugiriendo que además de la interacción electrostática con la superficie celular (mecanismo reportado para los PACs), debe estar involucrada otro tipo de interacción posiblemente de naturaleza específica.

De esta etapa se alcanzaron los siguientes logros (**Figura 36**):

- Se determinó que los péptidos optimizados, por su efecto citotóxico sobre líneas celulares de cáncer de colon y selectividad fueron: LfcinB (21-25)_{Pal}, **3**, LfcinB (21-25)_{Pal2}, **14**, **15**, ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, **19** y **20**. Asimismo, algunos de estos péptidos presentan efecto mantenido incluso si se lleva a cabo la duplicación celular. Dos péptidos optimizados con los mejores resultados, se utilizaron para los análisis

posteriores (péptido **3** y péptido **19**) y el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} o el ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂ como controles.

- Se evidenció que para el efecto citotóxico del péptido **3**, el efecto se mantiene hasta las 48 h y que las células son susceptibles al menos a dos tratamientos.
- Se encontró que el escalamiento del péptido **3** y el péptido **19** no modificó la actividad citotóxica frente a la línea celular HT-29.
- Se determinó que los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal}, ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂ y **19** fueron activos frente a las 5 líneas celulares evaluadas, sugiriendo que posiblemente son de amplio espectro de acción en diferentes tipos de cáncer.

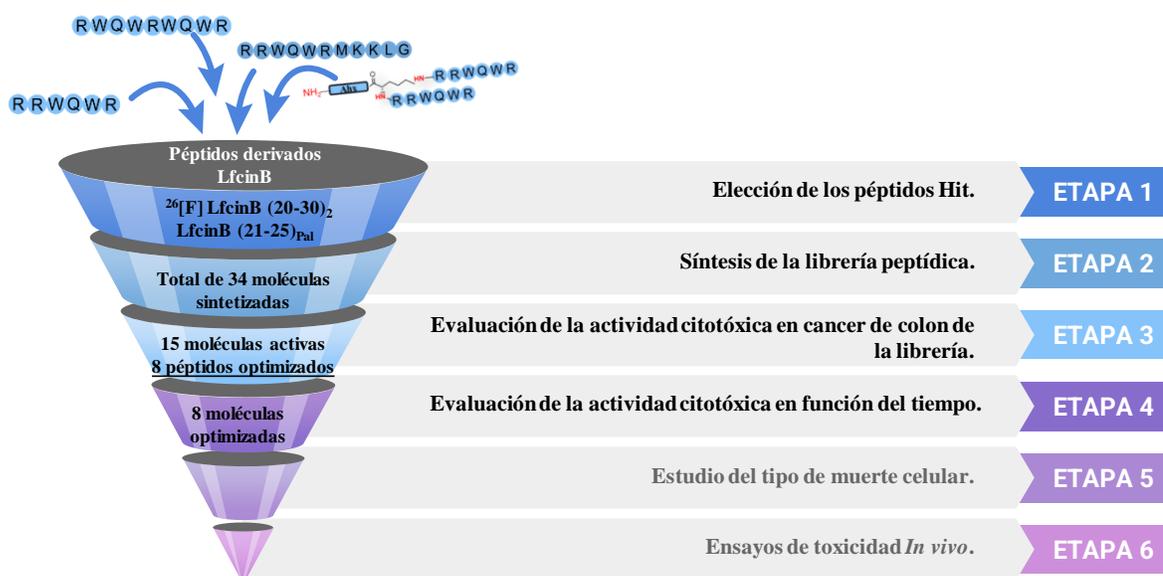


Figura 36: Etapa 4: Evaluación de la actividad citotóxica en función del tiempo y del tratamiento. Finaliza con la obtención de un total de 8 péptidos optimizados con actividad citotóxica a diferentes tiempos. En donde los péptidos **3** y **19** se eligieron como los péptidos optimizados representativos.

8.5 Etapa 5: Tipo de muerte celular

En esta etapa se determinó el tipo de muerte celular inducida en células HT-29 por los péptidos optimizados con los mejores resultados **3**, **19** y el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} como control. Además, se tuvo la posibilidad de determinar el tipo de muerte celular de algunos péptidos optimizados en las células Caco-2.

1. Cambios morfológicos causados por el efecto citotóxico

Las células HT-29 y Caco-2 fueron tratadas con los péptidos por 2h y luego se observó al microscopio la morfología celular. Los resultados muestran que las células tratadas presentan cambios morfológicos como redondeamiento, encogimiento celular y formación de vesículas. Se ha descrito que estos cambios morfológicos son característicos de las células que sufren apoptosis²⁵⁹ (**Figura 37**).

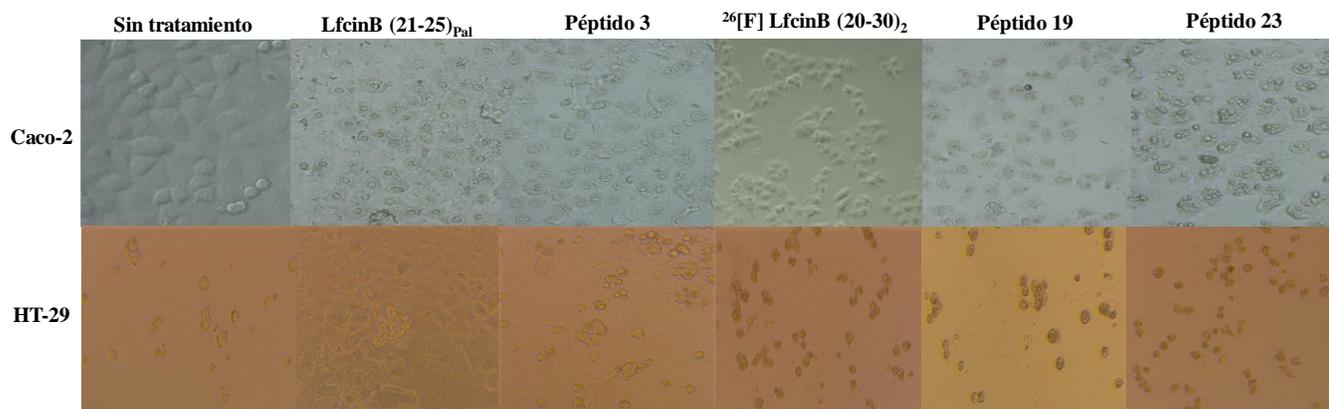


Figura 37: Micrografía de células de cáncer de colon HT-29 y Caco-2 tratadas durante dos horas con los péptidos a la concentración máxima (200 µg/ml) utilizando una cámara AxioCam ICc1.

2. Efectos sobre la línea celular HT-29

Para determinar mediante qué mecanismo de acción ocurría la muerte celular, se utilizó inicialmente el análisis mediante citometría de flujo bajo tinción con anexina V junto con un marcador de muerte celular, la 7-aminoactinomicina D (7AAD). El análisis mediante citometría de flujo indicó que el tipo de muerte celular principal, mediante el cual actúan los péptidos es el de apoptosis, encontrándose una mayor migración celular hacia las zonas de apoptosis temprana y tardía (**Figura 38**). Este comportamiento se había observado para el

péptido palindrómico LfcinB (21-25)_{Pal} frente a la línea celular de cáncer de mama MCF-7, en donde presentó eventos principalmente de apoptosis tardía²⁴¹. Así como previamente se ha reportado que la LfcinB y la LFB actúa sobre la línea celular HT-29 mediante mecanismos apoptóticos¹²⁵. Esto indicaría que las modificaciones cambiaron la potencia más no el efecto final sobre el tipo de muerte celular.

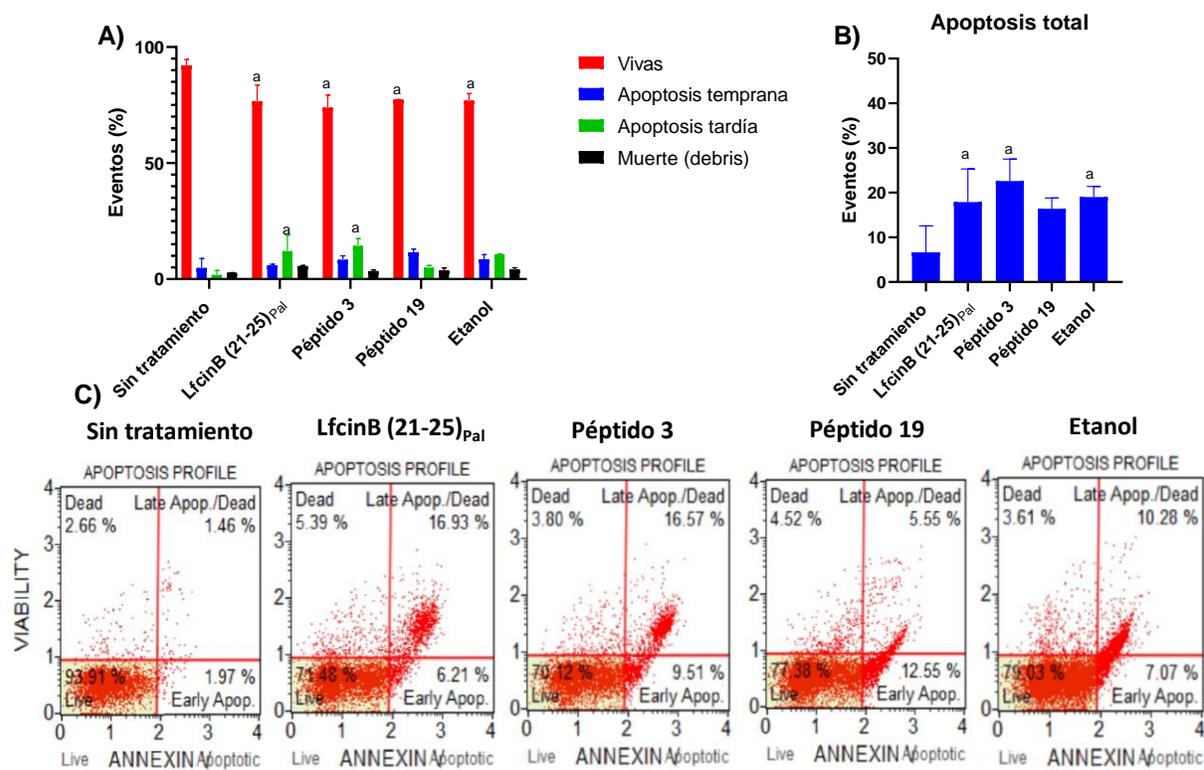


Figura 38: Evaluación de la apoptosis en la línea celular HT-29 utilizando Muse™ Anexina V para los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal}, **3** y **19**. Las células se trataron con los péptidos a la concentración del IC₅₀ durante 2h. A) Representación de las poblaciones halladas en el estudio B) El gráfico muestra el porcentaje de células con apoptosis. Los valores son media ± DE (n = 3). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba ANOVA. ^arepresenta un p < 0,05 e indica diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control (sin tratamiento). C) Cada gráfica es una figura representativa de las tres réplicas de cada determinación. Las células vivas con tinción negativa se encuentran en la parte inferior izquierda. Las células apoptóticas tempranas con anexina V positiva/marcador de células muertas negativas se encuentran en el cuadrante inferior derecho. Las células apoptóticas tardías con anexina V positiva/marcador de células muertas positivas se encuentran en la parte superior derecha, mientras que las células muertas con anexina V negativa/marcador de células muertas positivas se encuentran en el segmento superior izquierdo.

Adicional a la prueba de anexina, se desarrolló la evaluación de multicaspasas (caspasas: 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, y 9) después del tratamiento con los péptidos, encontrando que el porcentaje de caspasas aumentó significativamente al compararse con las células sin tratar, en todos los

casos. Esto soporta los resultados anteriores, debido a que la sobreexpresión de caspasas se relaciona con eventos apoptóticos²⁶⁰ (**Figura 39**). La apoptosis puede darse mediante dos vías principalmente, la apoptosis intrínseca o mitocondrial y la apoptosis extrínseca o mediada por receptor, ambos tipos generan activación de caspasas. Para el caso de la apoptosis intrínseca se desarrollan diversos procesos, iniciando con una señal apoptótica por estrés que genera la activación de las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, posteriormente se da la permeabilización de la membrana mitocondrial mediante la formación de poros, lo que lleva a la liberación de proteínas mitocondriales, especialmente el citocromo C, que posteriormente se une a Apaf-1 y ATP, formando así el apoptosoma, que activa la caspasa 9 y posteriormente a las caspasas ejecutoras (3, 6 y 7), lo que lleva a la fragmentación de ADN y los cambios morfológicos mencionados anteriormente, para que posteriormente las células sean fagocitadas²⁶¹. Adicionalmente, se ha demostrado que p53 ejerce una función apoptótica en la interacción con Bcl-2, lo que favorece la apoptosis intrínseca²⁶². Previamente se ha evidenciado que tanto la LF con la LfcinB en la línea celular HT-29 generan una sobreexpresión de p53, lo que podría indicar efecto sobre esta vía, sin embargo, la actividad de la caspasa 9 no fue significativa y no se evaluaron otros parámetros¹²⁵, y se necesita mayor investigación acerca de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis por parte de LfcinB y LF en esta línea celular. Por lo contrario, para la línea celular AGS de cáncer gástrico se ha reportado que la LfcinB induce la activación de ambas vías de la apoptosis¹⁰⁶. De la misma forma, para el péptido modificado derivado del LfcinB (21-25)_{Pal}, RR-1-R, se demostró que este activó la apoptosis intrínseca en la línea celular MCF-7²⁴¹.

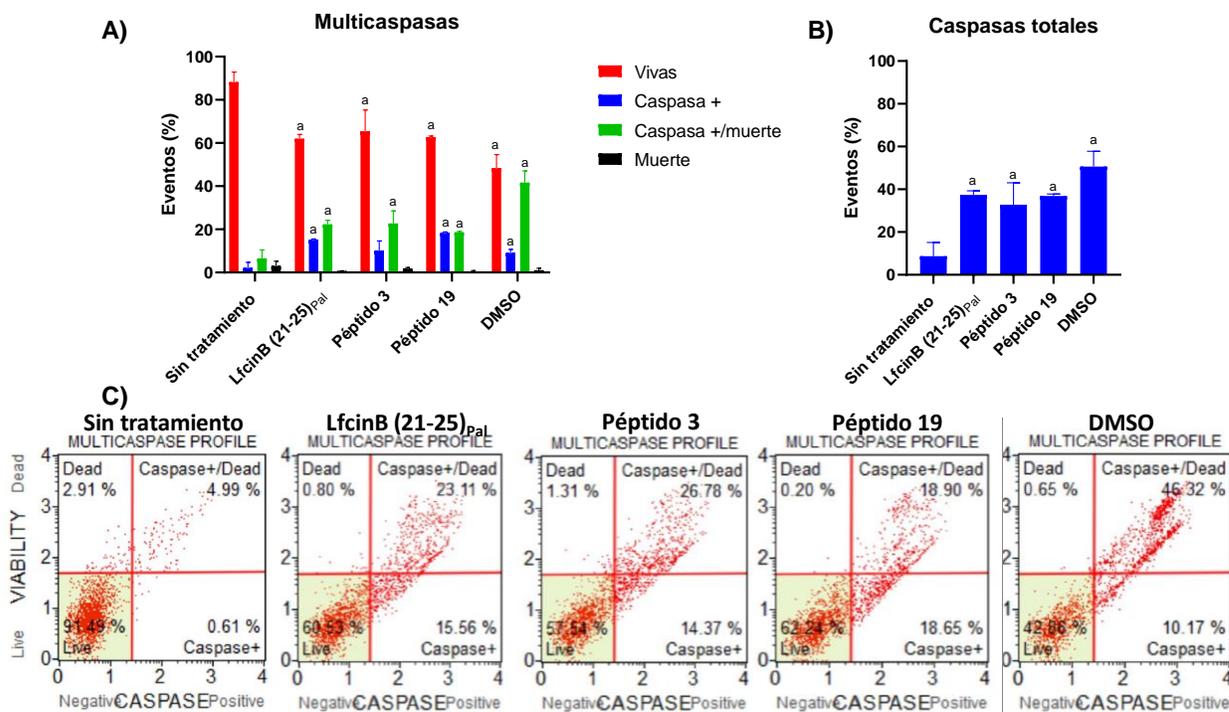


Figura 39: Efecto de los péptidos LfcinB (21-25)_{Pal}, **3** y **19** sobre multicaspasas en células HT-29. Las células se trataron con los péptidos a la concentración del IC₅₀ durante 2h. Las multicaspasas se determinaron utilizando el kit Muse® MultiCaspasa. A). Representación de las poblaciones halladas en el estudio B) El gráfico muestra el porcentaje de células actividad caspasa. Los valores son media ± DE (n = 3). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba ANOVA. ^arepresenta un p < 0,001 e indica diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control (sin tratamiento). C) Cada gráfica es una figura representativa de las tres réplicas de cada determinación. Las células vivas con tinción negativa se encuentran en la parte inferior izquierda.

En cuanto a la apoptosis extrínseca, esta ocurre mediante un estímulo externo que activan receptores en la superficie celular, como por ejemplo el factor de necrosis tumoral (TNF), lo que genera la formación de un complejo de muerte y la posterior activación de caspasas, principalmente la caspasa 8, que posteriormente causa la activación de las caspasas efectoras, generando así los cambios morfológicos correspondientes. Para el caso de la línea celular HT-29, se ha demostrado la activación de la caspasa 8 en los procesos apoptóticos por parte de la LF y la LfcinB ¹²⁵.

Por último, para esta línea celular se evaluó el potencial de la membrana mitocondrial, cuya despolarización se encuentra relacionada con la apoptosis intrínseca, evaluando así los péptidos de LfcinB (21-25)_{Pal}, **3** y **19** (**Figura 40**). De forma interesante, en todos los casos se presentó una despolarización mayor a la del control, sin embargo esta solo fue significativa para el péptido LfcinB (21-25)_{Pal}, indicando que, puede que los péptidos modificados,

induzcan en menor grado efectos de apoptosis intrínseca que su péptido palindrómico. Los resultados sugieren que al igual que la LfcinB, los péptidos evaluados ejercen un efecto citotóxico en las células HT-29 induciendo muerte celular mediada principalmente por apoptosis intrínseca y/o extrínseca.

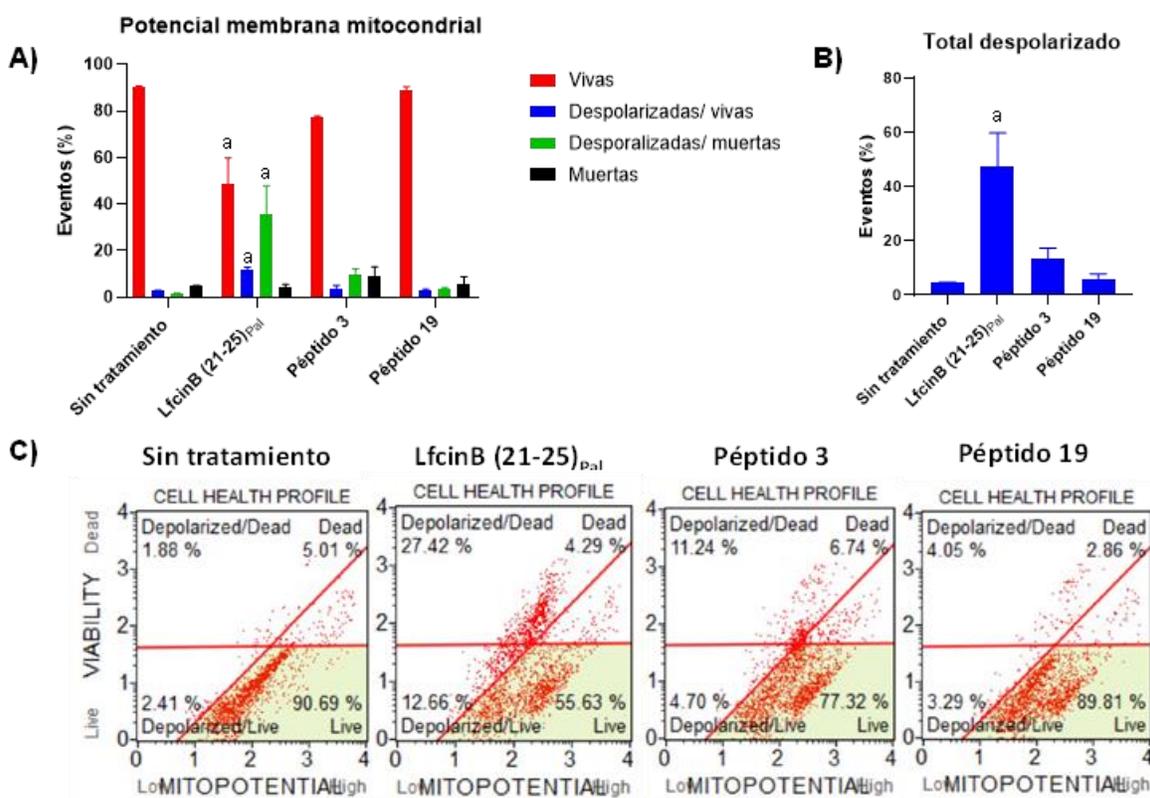


Figura 40: Evaluación del efecto sobre el potencial de la membrana mitocondrial tras el tratamiento sobre la línea HT-29 utilizando el kit de ensayo Muse MitoPotential. Las células se trataron con el péptido LfcinB (21-25)_{Pal} a la concentración del IC₅₀ durante 2h. La gráfica muestra el efecto del tratamiento A). Representación de las poblaciones halladas en el estudio B) El gráfico muestra el porcentaje de células con despolarización mitocondrial. C) Cada gráfica es una figura representativa de las tres réplicas de cada determinación. Los valores son media ± DE (n = 3). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba ANOVA. ^arepresenta un p < 0,0001 e indica diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control (sin tratamiento).

3. Efectos sobre la línea celular Caco-2

Habiendo analizado el efecto apoptótico de los péptidos sobre la línea celular HT-29, se evaluó con algunos péptidos optimizados si el efecto se mantenía para la línea celular Caco-2, en donde se encontró que efectivamente las células ante el tratamiento mantuvieron eventos de apoptosis, en donde los principales fueron los de apoptosis tardía (**Figura 41**).

Para este caso, se evaluó también el péptido **23**, debido a que este posee una D-Arg en su secuencia y se quería determinar si este efecto causaba un tipo de muerte celular diferente. Se encontró que no hubo un efecto diferencial, siendo la apoptosis el tipo de muerte celular predominante.

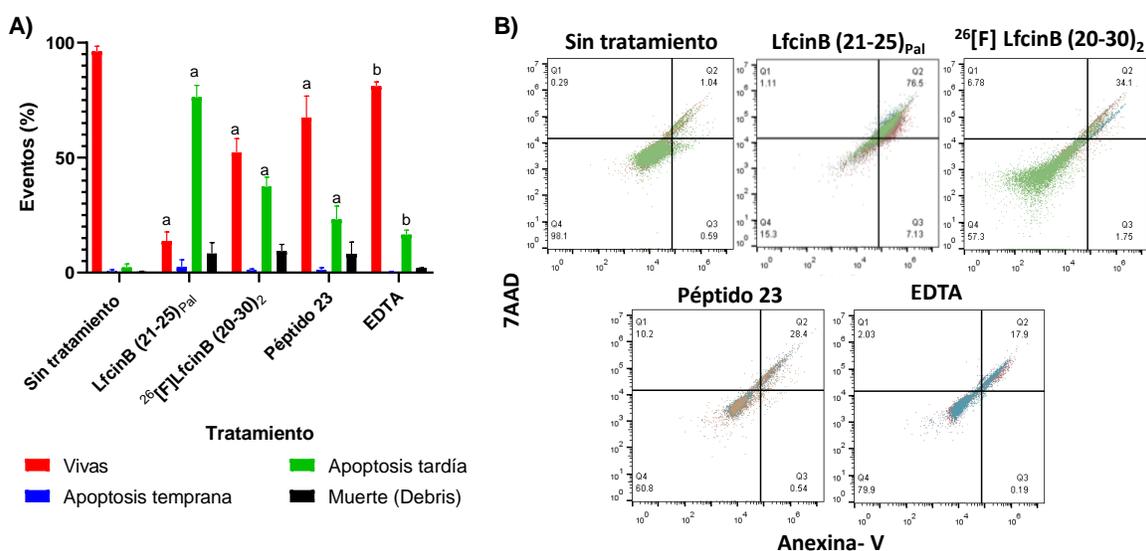


Figura 41: Evaluación de la apoptosis en la línea celular Caco-2 utilizando tinción con Anexina V y 7AAD para el péptido LfcinB (21-25)_{Pal}, ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂ y el péptido **23**. Las células se trataron con los péptidos a la concentración del IC₅₀ durante 2h. A) Representación de las poblaciones halladas en el estudio B) El gráfico muestra el porcentaje de células con apoptosis. Los valores son media ± DE (n = 3). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba ANOVA. ^arepresenta un p < 0,0001 y ^brepresenta un p < 0,001 e indica diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control (sin tratamiento). C) Cada gráfica es una figura representativa de las tres réplicas de cada determinación. Las células vivas con tinción negativa se encuentran en la parte inferior izquierda. Las células apoptóticas tempranas con anexina V positiva/marcador de células muertas negativas se encuentran en el cuadrante inferior derecho. Las células apoptóticas tardías con anexina V positiva/marcador de células muertas positivas se encuentran en la parte superior derecha, mientras que las células muertas con anexina V negativa/marcador de células muertas positivas se encuentran en el segmento superior izquierdo.

Por último, se evaluó el efecto sobre la despolarización de la membrana mitocondrial mediado por el péptido ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, en donde se encontró, tal como en los casos anteriores, un aumento en la despolarización (**Figura 42**), lo que indicaría procesos de apoptosis intrínseca.

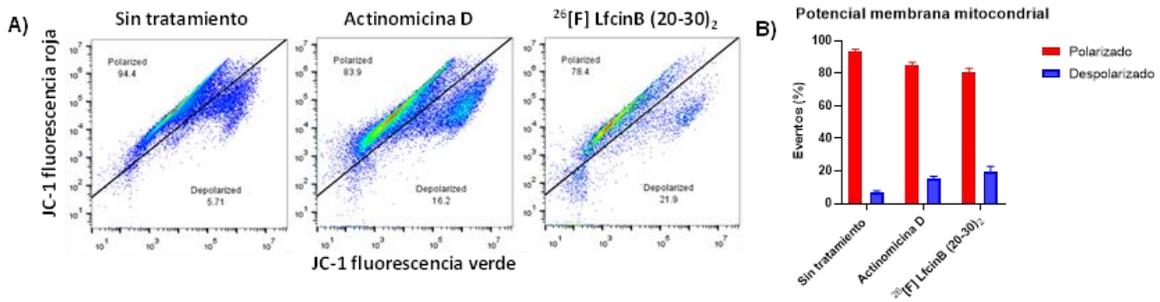


Figura 42: Evaluación de la despolarización de membrana en presencia del fluoróforo JC-1 en la línea celular Caco-2 para el péptido $^{26}\text{[F]}$ -LfcinB (20-30) $_2$. Las células se trataron con los péptidos a la concentración del IC₅₀ durante 2h. A) Cada gráfica es una figura representativa de las tres réplicas de cada determinación B). Representación de las poblaciones halladas en el estudio. Los valores son la media \pm DE (n = 3). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba ANOVA. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas

Teniendo en cuenta los resultados de las etapas 1-5, se eligió el péptido optimizado **19** como el de los mejores resultados a lo largo del trabajo.

De esta etapa se alcanzaron los siguientes logros (**Figura 43**):

- Se determinó que el efecto citotóxico de los péptidos en las líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y Caco-2, está asociado con cambios morfológicos en las células tratadas, causando encogimiento celular, pérdida de extensiones y redondeamiento, característicos de células en apoptosis.
- El efecto citotóxico de los péptidos optimizados está asociado principalmente a eventos apoptóticos, presentando así la sobreexpresión de caspasas y la despolarización de la membrana mitocondrial, lo que indica procesos de apoptosis intrínseca en ambas líneas celulares.
- Los ensayos de citometría de flujo indican que los péptidos optimizados monoméricos y diméricos ejercen efecto citotóxico en las células derivadas de cáncer de colon HT-29 y Caco-2 el cual induce muerte celular mediada principalmente por apoptosis en las cuales se evidenciaron poblaciones celulares en apoptosis tardía y temprana
- Independientemente sí el péptido es monomérico o dimérico el tipo de muerte celular inducida en las células tratadas está asociada con eventos apoptóticos, sugiriendo que

los cambios realizados en las secuencias potenciaron el efecto citotóxico manteniendo el tipo de muerte celular principalmente apoptosis.

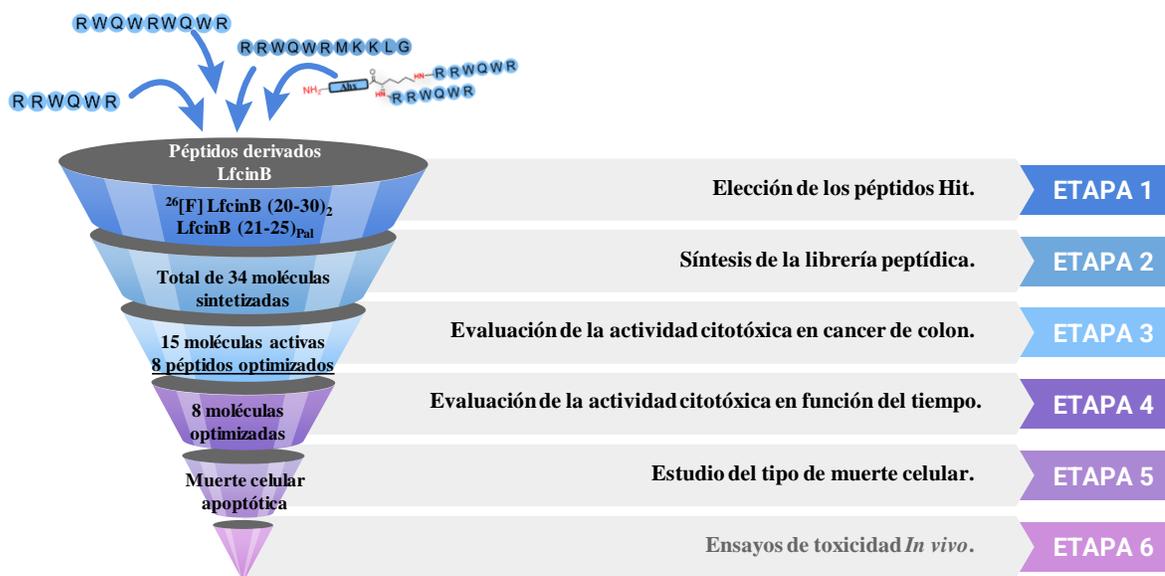


Figura 43: Etapa 5: Estudio del tipo de muerte celular. Este finaliza con la identificación del péptido optimizado 19 como el que presentó los mejores resultados para continuar con los ensayos *In vivo*.

8.6 Etapa 6: Ensayos *in vivo*.

8.6.1 Toxicidad aguda de los péptidos evaluada mediante el modelo de *Galleria mellonella*

Se evaluó la toxicidad de los péptidos optimizados **3**, **19**, LfcinB (21-25)_{Pal}, LfcinB (21-25)_{Pal2} y ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, en el modelo de *Galleria mellonella* (**Figura 44**). Este es un modelo versátil, económico, el cual no tiene las implicaciones éticas ni legales propias de la investigación con vertebrados, asimismo, este ha demostrado una amplia correlación con los resultados de toxicidad en mamíferos^{263,264}. La determinación de la toxicidad mediante el uso de las larvas de *Galleria mellonella* se lleva a cabo mediante la inyección intraperitoneal de la sustancia a evaluar, posteriormente se realiza el seguimiento durante algunos días para determinar su efecto en estudios de toxicidad aguda. Esta prueba es complementaria en la investigación de fármacos peptídicos, ya que la evaluación de la toxicidad mediante cultivo celular puede sobreestimar el perfil de toxicidad de los compuestos²⁶³.



Figura 44: Fotografía de larvas de *Galleria mellonella* utilizadas en este estudio

Debido a la disponibilidad de péptido, la dosis máxima evaluada fue de 100 mg/Kg, lo que en la clasificación de Loomies & Hayes (**Tabla 27**) indica que la máxima toxicidad evaluada sería la de moléculas moderadamente tóxicas o de mayor toxicidad.

DL ₅₀	Clasificación
<5mg/kg	Extremadamente tóxico
5-50 mg/kg	Altamente tóxico
50-500 mg/kg	Moderadamente tóxico
500-5000 mg/kg	Ligeramente tóxico
5000-15000 mg/kg	Prácticamente no tóxico
>15000 mg/kg	Relativamente inocuo

Tabla 27: Clasificación de toxicidad aguda según Loomis & Hayes.²⁶⁵

Inicialmente, como control se evaluó la toxicidad del cisplatino en las larvas (**Figura 45**), encontrando una dosis letal para el 50% de la población (DL₅₀) de 13 mg/kg (($Y = 93.75X - 55.21$; $r^2 = 0,74$), esto se correlaciona parcialmente con otros estudios en *Galleria mellonella*, en donde se encontró una mortalidad del 60% a una dosis de 33mg/kg²⁶⁶, mientras que en ratones se encontró una DL₅₀ de 15.3 ± 1.6 mg/kg²⁶⁷. Es interesante resaltar que las larvas, después de 30 minutos de la administración del cisplatino presentaron contracciones corporales en la forma de tremores, lo que podría asociarse a la neurotoxicidad del cisplatino²⁶⁷.

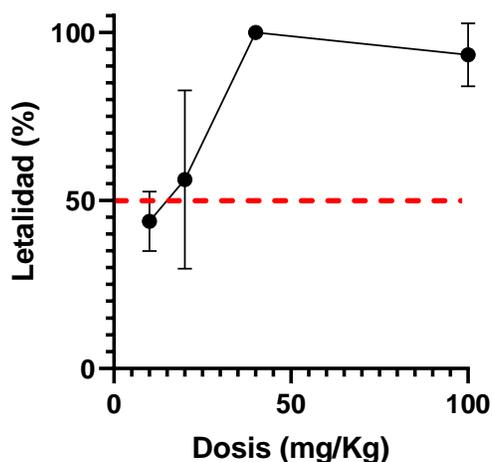


Figura 45: Curva dosis-respuesta para la prueba de toxicidad aguda de cisplatino en *Galleria mellonella*.

Posteriormente se evaluó la toxicidad aguda de los péptidos (**Tabla 28, Figura 46**), en donde se incluyó el péptido optimizado **19** y algunos de los otros péptidos optimizados, encontrando que a la máxima concentración evaluada (100 mg/kg), los péptidos no alcanzaron la DL₅₀, lo

que indicaría que son moderadamente tóxicos o menos. Igualmente, los péptidos no alcanzaron diferencias estadísticamente significativas al compararse con el control (larvas tratadas con solución salina), a excepción del péptido dimérico LfcinB (21-25)_{Pal2}, que resultó ser el más tóxico de los péptidos evaluados.

Código	Supervivencia (%)
LfcinB (21-25) _{Pal}	82±3
3	90±14
LfcinB (21-25) _{Pal2}	67±6
²⁶ [F]-LfcinB (20-30) ₂	85±7
19	80±10
Control (ss)	95±7
Cisplatino	9±6

Tabla 28: Supervivencia a los 10 días para el ensayo de toxicidad aguda en *Galleria mellonella* a una dosis de 100mg/kg. El control es solución salina estéril (ss) u el cisplatino se encuentra a una dosis de 100mg/kg.

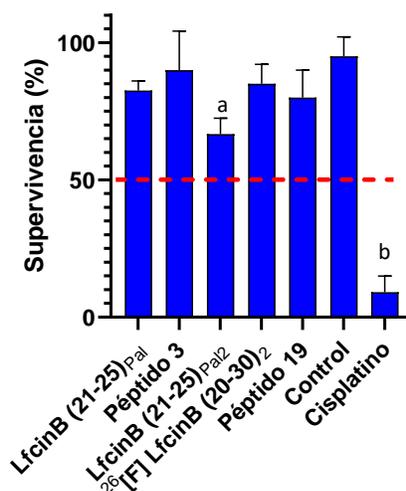


Figura 46: Evaluación de la toxicidad aguda de los péptidos en *Galleria mellonella*. Supervivencia a los 10 días para el ensayo de toxicidad aguda en las larvas a una dosis de 100 mg/kg. Los datos se expresan como la media ± SD (n = 2 con 10 larvas en cada grupo). Se realizó una prueba ANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de los diferentes tratamientos comparado con el control ^ap < 0.05, ^bp < 0.0001.

De igual forma, estos resultados pueden correlacionarse con el encontrado para el péptido ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, en donde bajo un estudio de toxicidad aguda en ratones, no se encontró mortalidad a dosis de hasta 70mg/kg, sin embargo, a una dosis de 140mg/kg hubo una

mortalidad del 100%, lo que podría sugerir que la letalidad se genera a dosis mayores de 100mg/kg²⁵⁷.

Estos resultados de toxicidad son positivos. En primer lugar, debido a que el estudio se adhiere a los principios de las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento), en segundo lugar, porque la toxicidad encontrada nos permite resaltar el potencial de los péptidos probados como alternativas más seguras a los medicamentos de quimioterapia tradicionales, como el cisplatino, con menores probabilidades de efectos adversos.

8.6.2 Prueba de Irwin: evaluación preliminar de la toxicidad de los péptidos en ratones.

Con el objetivo de evaluar de forma preliminar el efecto del péptido optimizado **19** sobre el sistema nervioso y siguiendo el principio de reducción, se realizó la prueba de Irwin con dos grupos de 4 ratones macho CD1, para los cuales se inyectaron 3 ratones por grupo con el péptido **19** a diferentes dosis y un ratón control por grupo con solución salina. El grupo 1 fue inyectado con una dosis de 70mg/kg y el grupo 2 con una dosis de 140mg/kg. La elección de las dosis de 70mg/kg y 140 mg/kg se basó en reportes previos para el péptido hit ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂²⁵⁷. Debido a que el péptido **19** es un derivado de este, el desarrollo fue similar al previamente reportado. De igual forma, la inyección realizada fue de forma peritoneal, esto debido a que esta es una vía con alta biodisponibilidad, que permite obtener un efecto sistémico rápido, así como su uso induce bajo estrés y menor daño para los animales²⁶⁸.

La prueba de Irwin se realizó con el objetivo de determinar los efectos del péptido **19** sobre el sistema nervioso central²⁶⁹. Dicha prueba se encuentra avalada por el Consejo Internacional para la Armonización (ICH por sus siglas en inglés) en la guía ICH S7A: *Estudios de farmacología de seguridad para productos farmacéuticos humanos*, como una de las pruebas de la batería realizada en animales²⁷⁰. Para el presente estudio se consideraron resultados cualitativos que permitieron evaluar de forma inicial la seguridad farmacológica (**Figura 47, Tabla 29**).

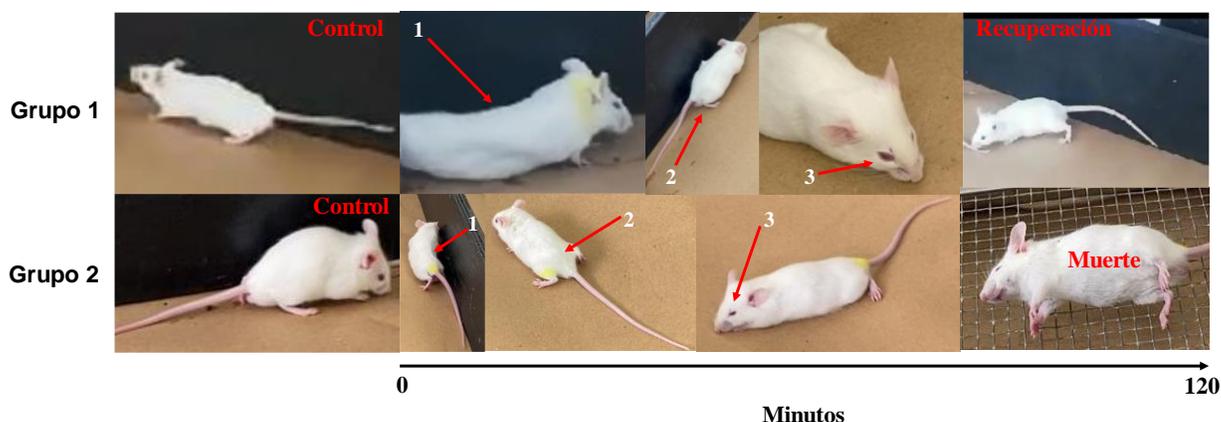


Figura 47: Resultados después de la inyección i.p del péptido **19** para ambos grupos de ratones macho CD-1. Las flechas indican eventos específicos: (1). Ratón que presenta contorsiones posteriores a la administración del péptido. (2). Pérdida de la postura normal, afectación en la marcha. (3). Sedación disminución en la abertura palpebral.

Ítem a evaluar	Sin diferencias	Presentado por 1 ratón	Presentado por 2 ratones	Presentado por 3 ratones	
	Grupo 1			Grupo 2	
	<5 min	15min	> 30min	<5 min	15min > 30min
Autonómico					
Salivación					
Lacrimación					
Piloerección					↑
Orina excesiva					
Diarrea					
Respiración anormal					↓↓ ↓↓
Neuromuscular					
Postura anormal	↓↓	↓↓		↓↓	↓↓ ↓↓
Tono muscular	↓↓	↓↓		↓↓	↓↓ ↓↓
Tremores					
Convulsiones					
Catalepsia					
Cola de Straub					
Exoftalmos					
Moto sensorial					
Respuesta al tacto	↓	↓		↓↓	↓↓↓ ↓↓↓
Reflejo del pabellón auricular					
Respuesta a la tracción	↓	↓		↓	↓↓ ↓↓↓
Comportamental					
Sedación	↑	↑↑		↑↑	↑↑↑
Reactividad al manejo	↓	↓		↓	↓↓ ↓↓↓
Actividad espontánea	↓↓	↓		↓	↓↓ ↓↓↓
Rascado	↑↑↑			↑↑↑	
Muerte					

Tabla 29: Resultados para la prueba de Irwin. La gráfica representa el número de ratones a los que se les administró el péptido **19** a una dosis de 70mg/kg (grupo 1; n=3) o 140mg/Kg (grupo 2; n=3). Se evidenciaron diferencias en cuanto a los ítems evaluados al compararse con el grupo control (inyección con solución salina) (n=2). La flecha ↑ indicaba aumento del efecto y ↓ una disminución de este. La intensidad del efecto se evaluó

mediante el número de flechas presentes (por ejemplo: ↓: Intensidad leve, ↓↓; Intensidad moderada; ↓↓↓ Intensidad alta).

Para el análisis de los efectos se consideraron, en primer lugar, los efectos inmediatos a la administración (<5 minutos), estos se presentaron para ambos grupos y algunos se encuentran principalmente asociados a la irritación local y/o dolor por la administración, también se observaron contorsiones (**Figura 47**) y la disminución de la actividad espontánea.

Al pasar el tiempo (15 minutos) se observaron otros efectos mantenidos, en donde la afectación neuromuscular primó, específicamente la postura y el desplazamiento anormal, a lo que se le adicionaron cambios comportamentales, tales como la sedación, relacionado también con la disminución de la apertura palpebral (**Figura 47**), una baja reactividad al manejo y baja actividad espontánea, que para el caso del grupo 2, llegó a ser nula a los 30 minutos. Cabe aclarar que, los sujetos del grupo 1, lograron recuperarse y a los 30 minutos ya no presentaban ningún signo de toxicidad.

Es de interés notar que, para el péptido **19** se determinó que este causaba una afectación de carácter dosis-dependiente, en donde los efectos más marcados se encontraron de los 30 a 90 minutos después de la administración para el grupo 2. Los efectos encontrados desde el punto de vista autonómico se presentaron en este tiempo, en donde hubo una afectación en la capacidad respiratoria y posteriormente la muerte en dos de los individuos evaluados. Dichos resultados indicarían una depresión del sistema nervioso, y debido al daño motor pronunciado que se generó desde el momento de la administración, esta podría asociarse con efectos sobre el sistema nervioso central, como un efecto adverso del uso del péptido **19** a altas dosis. Además, podría sugerir la capacidad de este péptido, de atravesar la barrera hematoencefálica, al igual que su proteína de origen, la lactoferrina^{271,272}, lo que incluso podría ser de utilidad para el tratamiento de tumores sólidos cerebrales, como el glioblastoma, para el cual la lactoferrina ha mostrado efecto citotóxico²⁷³ y debido a que los efectos del péptido **19** fueron determinados de forma rápida, esto podría indicar alta potencia en su efecto cerebral²⁷⁴. Así mismo, se ha reportado que el receptor de LF se encuentra sobre expresado en las células endoteliales microvasculares cerebrales y del glioma, lo que favorece la incorporación de la LF²⁷⁵, aunque aún se desconoce si el péptido **19** o péptidos derivados de

LfcinB, son reconocidos por este receptor, ítem en el que se debe profundizar y que esta fuera del alcance de este trabajo.

En el reporte previo para el péptido $^{26}\text{[F] LfcinB (20-30)}_2$ se encontró que, al hacer una administración subcutánea, a los 30 minutos hubo una disminución de las funciones motoras y piloerección, con una recuperación a las 24 horas sin afectaciones en la supervivencia de estos. Por el contrario, la administración intraperitoneal causó disminución en la función motora, contracciones abdominales, ataxia y pérdida de coordinación, efectos similares a los obtenidos para el péptido **19**, en donde para el péptido $^{26}\text{[F] LfcinB (20-30)}_2$, a la mayor dosis la mortalidad fue del 100% mientras que para el péptido **19** a la misma dosis (140 mg/kg) la mortalidad fue del 66% (**Tabla 30**). Mientras que cuando se administró la dosis de 70mg/kg, tanto para el péptido $^{26}\text{[F] LfcinB (20-30)}_2$ y el péptido **19**, hubo una recuperación total de los individuos. Estos resultados sugieren que los cambios realizados en el péptido **19** no incrementaron la toxicidad en el modelo de ratones CD1.

Grupo	Dosis	Supervivencia (%)	
		$^{26}\text{[F]-LfcinB (20-30)}_2^{257}$	Péptido 19
Control	-	100	100
1	70mg /kg	100	100
2	140 mg/kg	0	33

Tabla 30: Supervivencia final a los ocho días de la administración intraperitoneal de las moléculas. La información del péptido $^{26}\text{[F]-LfcinB (20-30)}_2$ fue previamente reportada²⁵⁷.

8.6.3 Evaluación de toxicidad en el modelo de pez cebra.

Para realizar la evaluación de toxicidad en este modelo, se utilizaron larvas de pez cebra (3 dpf), las cuales fueron expuestas (en el medio de cultivo) al péptido **19** durante 72 horas (administración por difusión), en dos grupos de concentraciones (**Tabla 31**). El objetivo para determinar la toxicidad en este modelo fue principalmente obtener las concentraciones no tóxicas de evaluación para el estudio de eficacia xenoinjerto de pez cebra.

Este modelo presenta ventajas como lo son la posibilidad de hacer pruebas de cribado rápidas, de menores costos y con baja demanda de la sustancia a evaluar, mientras que es un modelo vertebrado complejo que se considera posee alta confiabilidad y similitudes de sus vías moleculares y fisiología con la humana^{276,277}, siendo de utilidad como pruebas de toxicidad antes de avanzar a pruebas completas con animales complejos²⁷⁷.

Grupo 1: Concentraciones bajas									
Concentración (µg/mL)	0.5	1	2	4	6	8	10	12	14
Supervivencia (%)	96	100	100	100	100	96	100	98	100
Grupo 2: Concentraciones altas									
Concentración (µg/mL)	15	20	25	30	40	50			
Supervivencia (%)	100	80	0	0	0	0			

Tabla 31: Concentraciones utilizadas para la evaluación de supervivencia de larvas de pez cebra (*Danio rerio*) ante la administración del péptido 19. Grupo 1 (n= 450), grupo 2 (n=40).

Para las concentraciones bajas de péptido, la supervivencia fue, en todos los casos, mayor al 96%, por el contrario, para el grupo 2, se encontró que a las mayores concentraciones (40 y 50 µg/mL) hubo una mortalidad rápida, posterior a los 30 minutos iniciales de contacto con el péptido, con un comportamiento acelerado, sin ser posible evaluar otras afectaciones como la deformación de la cabeza o de la cola. Por otra parte, a las concentraciones de 25 y 30 (µg/mL) a las 24 horas de la administración, hubo una mortalidad del 100%. La mayoría de las larvas tratadas presentaron morfología normal (**Figura 48**), sin embargo, en pocas de estas se encontraron efectos inespecíficos de toxicidad, como la cola torcida (1), el edema pericárdico y vitelino (2 y 3). Estos son efectos comunes en la evaluación de sustancias tóxicas, tienden a encontrarse a bajas concentraciones y hasta el momento se desconoce su valor predictivo con la toxicidad en modelos de mamíferos²⁷⁸.

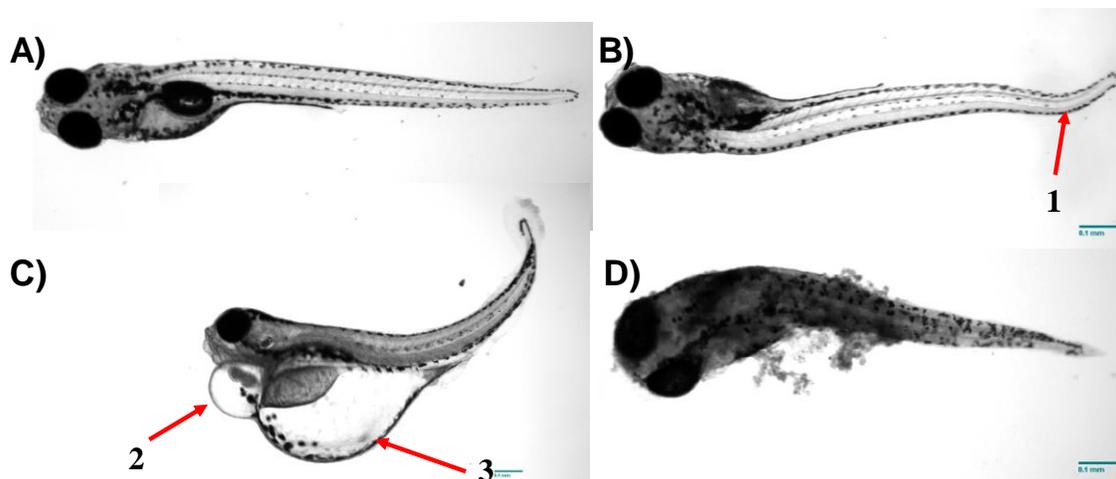


Figura 48: Cambios morfológicos de larvas de pez cebra ante el tratamiento con el péptido **19**. A) Larva con morfología normal. B) Larva que presenta la cola torcida (1). C) Larva que presenta edema pericárdico y vitelino (2 y 3 respectivamente) D) Larva muerta.

Debido a que el péptido **19** es un péptido derivado de $^{26}\text{[F]}\text{-LfcinB (20-30)}_2$, los resultados de este péptido se comparan con los previamente obtenidos (bajo proceso de publicación), encontrando que hubo una menor toxicidad para el péptido **19**, siendo este un resultado positivo, que indicaría que el cambio de Arg/Orn mejoró la selectividad *in vivo*, lo que se apoyaría también en los resultados encontrados en la prueba de Irwin (**Tabla 32, Figura 49**). Estos resultados sugieren que los compuestos son aptos para ser evaluados a concentraciones en donde la tasa de supervivencia sea mayor al 95%. Siendo la concentración ideal menor a $14\ \mu\text{g/mL}$ para el péptido **19** y menor a $5\ \mu\text{g/mL}$ para el péptido $^{26}\text{[F]}\text{-LfcinB (20-30)}_2$. Para el caso del péptido **19**, se determinó que la LC_{50} se encuentra entre $20\text{-}25\ \mu\text{g/mL}$.

Concentración de péptido ($\mu\text{g/mL}$)	1	10	15	20
Péptido	Supervivencia (%)			
$^{26}\text{[F]}\text{-LfcinB (20-30)}_2$	100	96	73	0
19	100	100	100	80

Tabla 32: Comparación de la supervivencia encontrada a diferentes concentraciones para el péptido $^{26}\text{[F]}\text{-LfcinB (20-30)}_2$ y el péptido **19**.

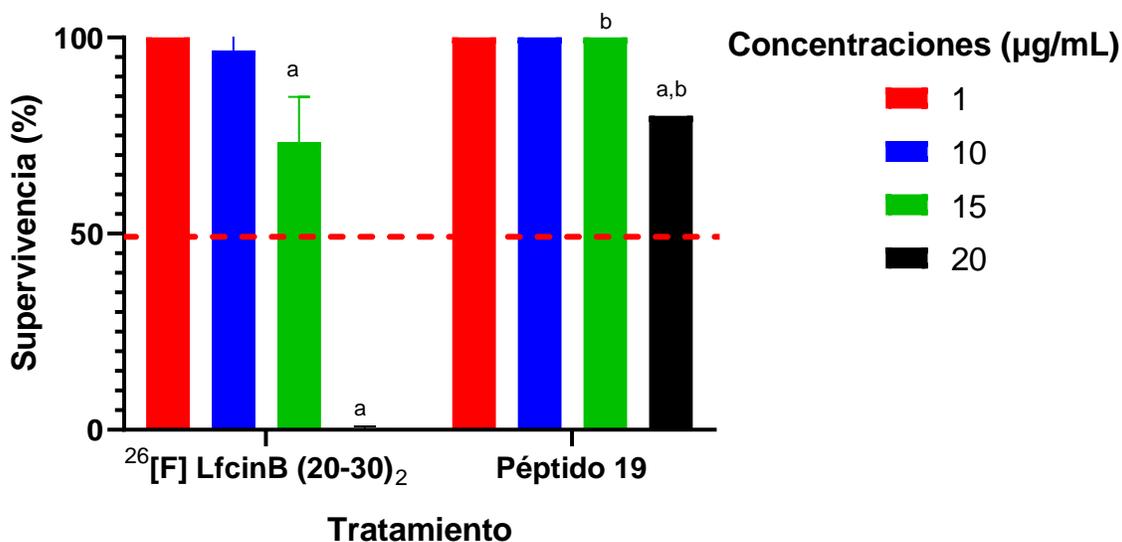


Figura 49: Comparación de la supervivencia encontrada a diferentes concentraciones para el péptido $^{26}\text{[F] LfcinB (20-30)}_2$ y el péptido 19. Para todos los casos, la supervivencia fue del 100% para los controles. Se realizó una prueba ANOVA seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de los diferentes tratamientos comparado con el control a y entre péptidos b con un $p < 0.0001$.

De esta etapa se alcanzaron los siguientes logros (**Figura 50**):

- Se determinó que los péptidos presentaron una toxicidad baja comparado con el cisplatino en el modelo de *Galleria mellonella*.
- En la prueba de Irwin, se determinó que los péptidos presentaron efectos sobre el sistema nervioso central a dosis desde 70mg/kg, encontrando que la DL_{50} se encuentra entre 70mg/kg y 140mg/kg.
- Se determinó que las larvas (3dpf) de pez cebra tienen una supervivencia superior al 95% para péptido **19** en concentraciones $\leq 14 \mu\text{g/mL}$ y que su LC_{50} se encuentra entre 20-25 $\mu\text{g/mL}$. Así mismo, se evidenció que este péptido presentó menor toxicidad *in vivo* que su péptido base $^{26}\text{[F] LfcinB (20-30)}_2$.

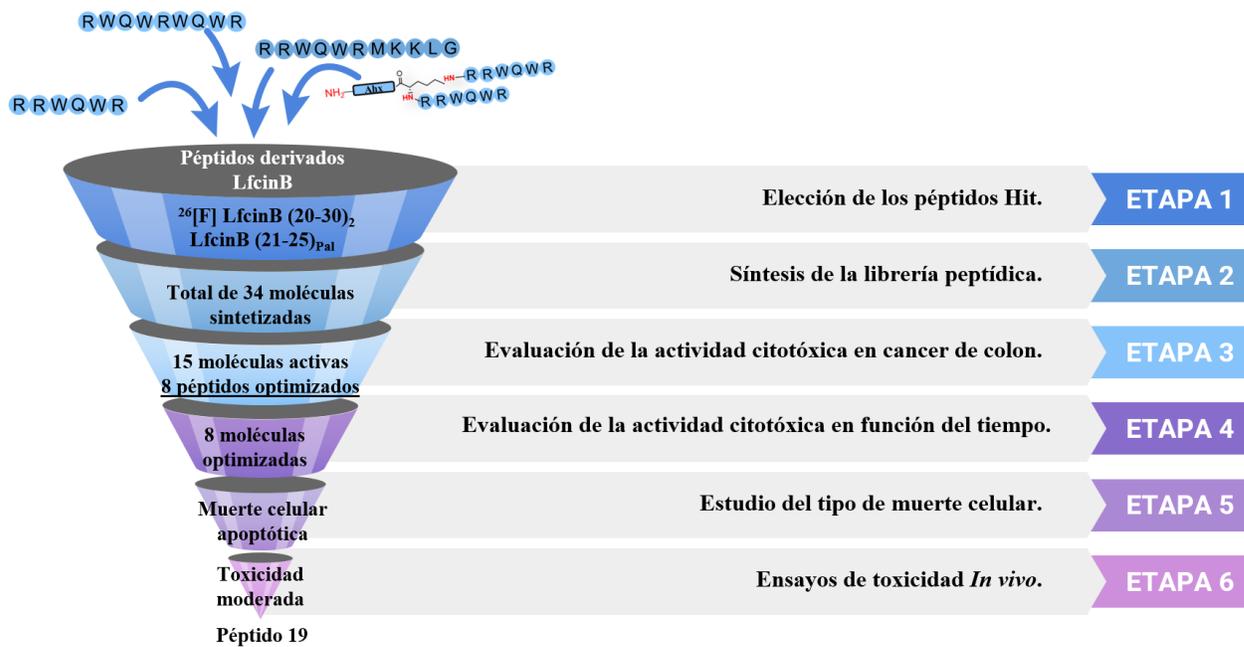


Figura 50: Etapa 6: Ensayos de toxicidad *In vivo*. Finaliza con la determinación de la toxicidad del péptido optimizado **19** en modelos *In vivo*.

9 Conclusiones

En conclusión, este estudio reveló que varios péptidos derivados de LfcinB, incluyendo LfcinB (20-25)₄, LfcinB (20-25)₂, LfcinB (20-30)₂, ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, LfcinB (21-25)_{Pal} y LfcinB (21-25)_{Pal2}, exhiben efectos citotóxicos significativos en las líneas celulares HT-29 y Caco-2 del cáncer de colon. Estos efectos fueron rápidos y dependientes de la concentración.

Los péptidos, ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂ y LfcinB (21-25)_{Pal}, presentaron efecto citotóxico selectivo y significativo en las líneas celulares derivadas de cáncer de colon Ht-29, Caco-2 y HCT-116 y fueron seleccionados como péptidos hit para desarrollar una librería peptídica, dando como resultado la síntesis, purificación y caracterización de un total de 34 moléculas.

Se hizo una matriz con datos experimentales de la síntesis de péptidos monoméricos y diméricos que puede ser insumo para la construcción de una herramienta predictiva de la facilidad o dificultad del proceso sintético de péptidos derivados de LfcinB. Además, se estableció una correlación entre los resultados experimentales y la puntuación SAScore.

De los 34 péptidos sintetizados, 15 mostraron actividad citotóxica a las concentraciones evaluadas contra las líneas celulares derivadas de cáncer de colon HT-29 y Caco-2. La evaluación de la citotoxicidad en líneas celulares control y glóbulos rojos permitió identificar ocho péptidos optimizados, **3**, **14**, **15**, **19**, **20**, (LfcinB (21-25)_{Pal}, LfcinB (21-25)_{Pal2} y ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂, con actividad sostenida de 2 a 72 horas.

El escalamiento de la síntesis de los péptidos **3** y **19** no afectó la integridad, la identidad ni tampoco su actividad citotóxica. Además, se encontró que los péptidos **3**, **19**, LfcinB (21-25)_{Pal} y ²⁶[F]-LfcinB (20-30)₂ exhibieron actividad contra líneas celulares de mama, cuello uterino y próstata, sugiriendo que estos péptidos son activos contra diferentes tipos de cáncer.

Se determinó que el tipo de muerte celular inducida por el efecto citotóxico de los péptidos **3**, **19** y LfcinB (21-25)_{Pal}, en células HT-29, es la apoptosis, donde se observaron poblaciones celulares en apoptosis temprana y tardía, despolarización de la membrana mitocondrial y sobre expresión de caspasas. Algunos péptidos también ejercieron el mismo tipo de muerte celular en células derivadas de cáncer de colon Caco-2.

Finalmente, se llevó a cabo la evaluación de la toxicidad del péptido **19** en diversos modelos. En el modelo de *Galleria mellonella*, se encontró que la dosis letal (DL₅₀) superó los 100 mg, indicando como mínimo una toxicidad moderada. La prueba de Irwin reveló efectos en el sistema nervioso central, con una DL₅₀ en el rango de 70 mg/kg a 140 mg/kg. Además, en el modelo de pez cebra, se determinó una concentración letal (LC₅₀) entre 20-25 µg/mL, confirmando la relativa seguridad del péptido.

Los resultados de (i) actividad citotóxica en células cancerosas, no cancerosas y glóbulos rojos, (ii) de los estudios de citometría de flujo, (iii) de los ensayos de toxicidad en modelos *in vivo*, respaldan la viabilidad del péptido **19** como candidato prometedor para futuros estudios, destacando su seguridad en los modelos de toxicidad evaluados.

El trabajo desarrollado y los resultados obtenidos evidencian que el proceso de optimización de secuencias monoméricas y diméricas derivadas de LfcinB, empleadas en este trabajo es una estrategia exitosa para la identificación de péptidos promisorios para estudios posteriores en el desarrollo de tratamientos del cáncer de colon (**Figura 51**).

10 Anexos

10.1 Anexo 1: Caracterización de los péptidos

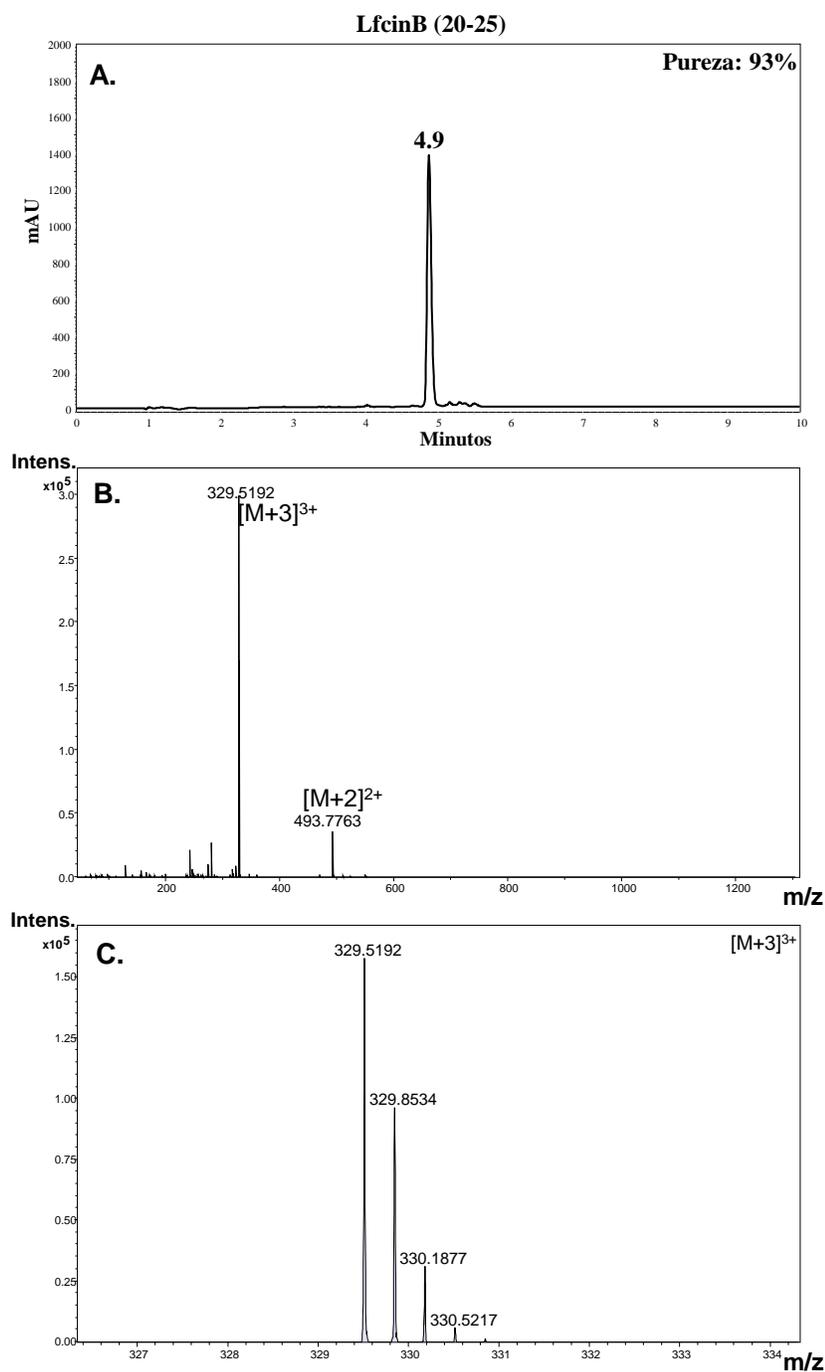


Figura A2.1. Caracterización del péptido LfcinB (20-25) (A) Cromatograma ; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies $[M+3]^{3+}$ and $[M+2]^{2+}$; (C) Espectro ampliado para la especie $[M+3]^{3+}$.

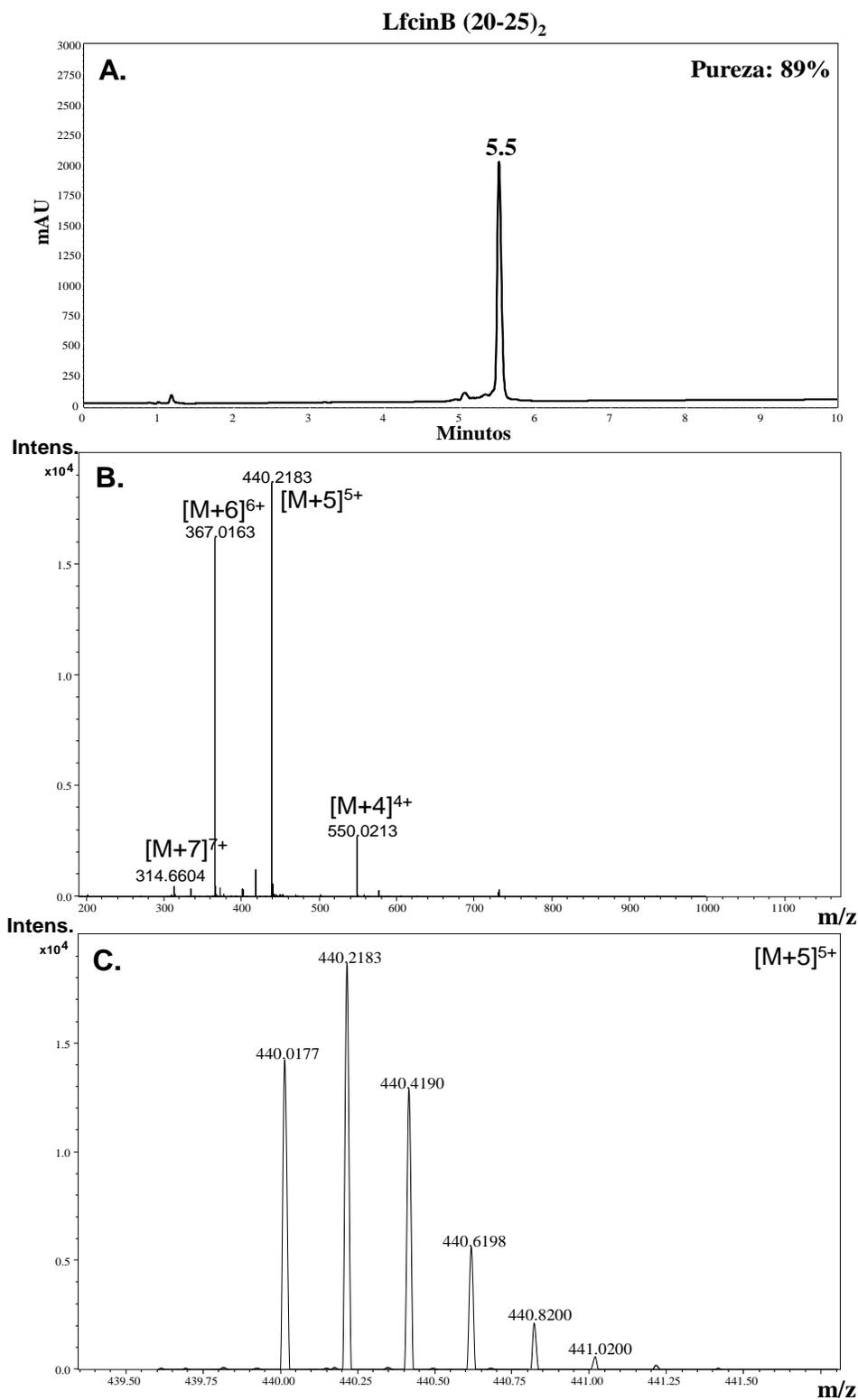


Figura A2.2. Caracterización del péptido LfcinB (20-25)₂ (A) Cromatograma ; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies [M+7]⁷⁺, [M+6]⁶⁺, [M+5]⁵⁺ y [M+4]⁴⁺ (C) Espectro ampliado para la especie [M+5]⁵⁺.

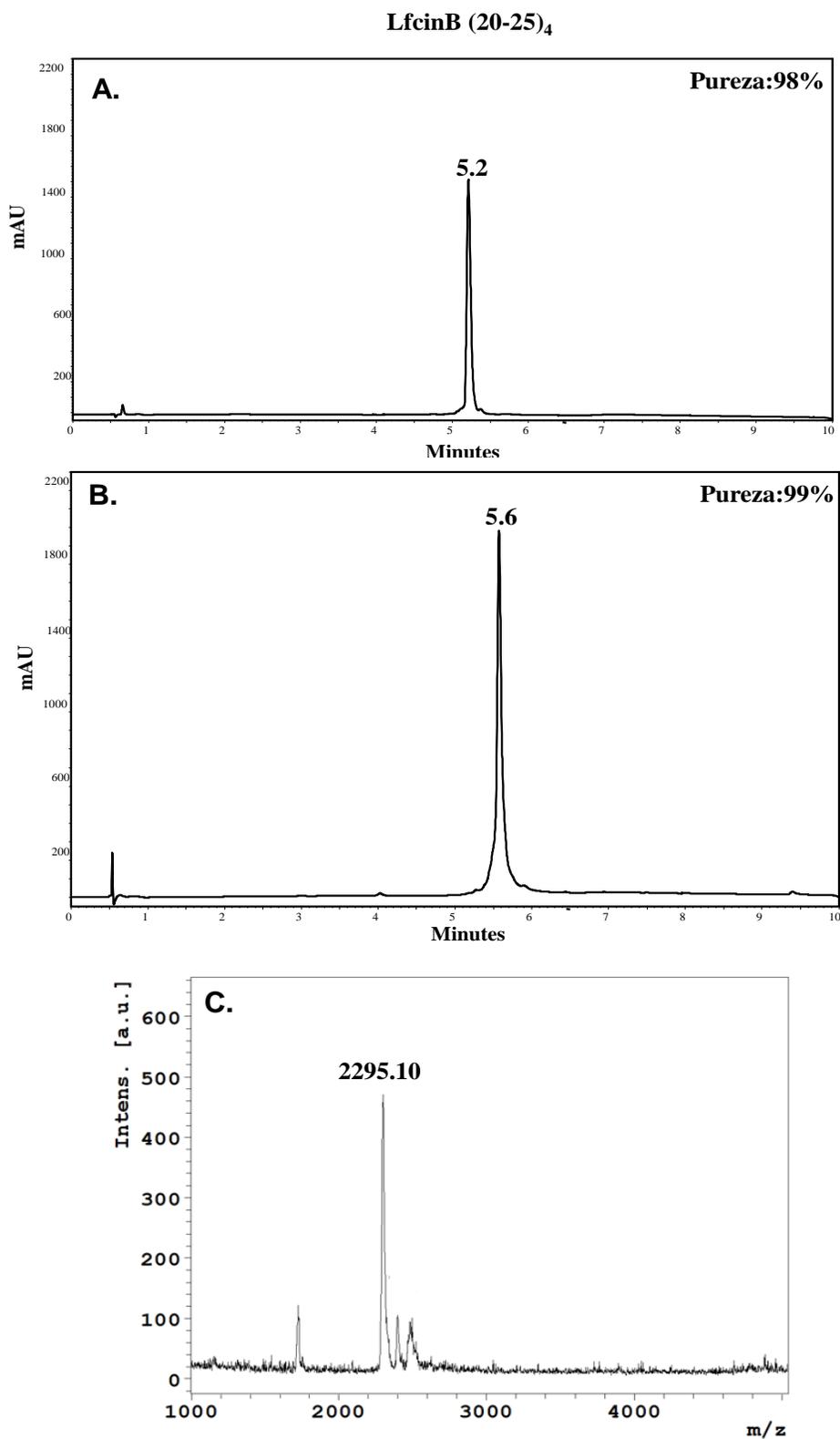


Figura A2.3. Caracterización del péptido LfcinB(20-25)₄ (A) Cromatograma del péptido previo a la oxidación (dímero); (B) Cromatograma del péptido posterior a la oxidación (C) Espectro MALDI-TOF de la molécula previo a la oxidación.

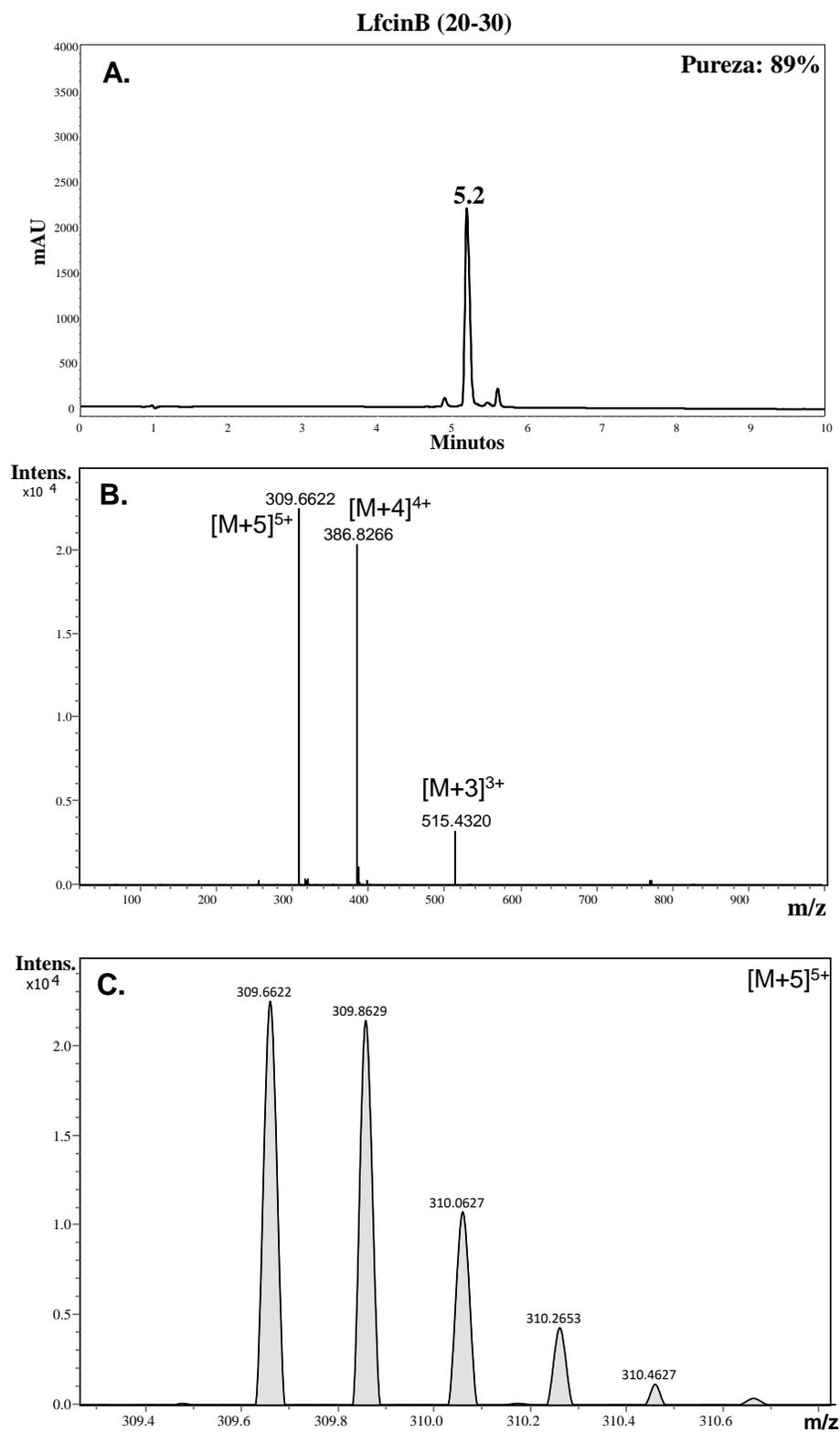


Figura A2.4. Caracterización del péptido LfcinB(20-30) (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies $[M+5]^{5+}$, $[M+4]^{4+}$ y $[M+3]^{3+}$; (C) Espectro ampliado para la especie $[M+5]^{5+}$.

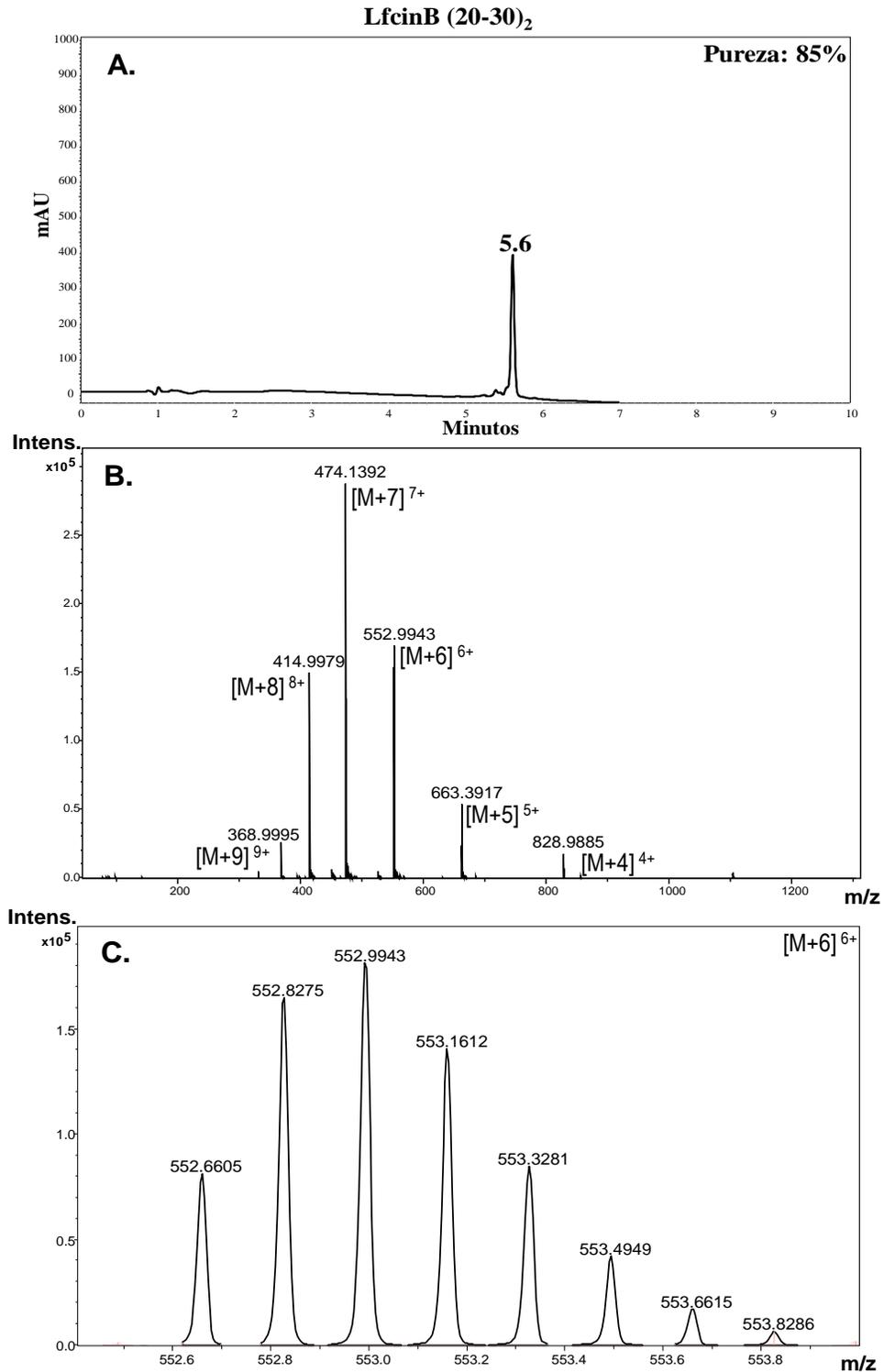


Figura A1.5. Caracterización del péptido LfcinB(20-30)₂ (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies [M+9]⁹⁺, [M+8]⁸⁺, [M+7]⁷⁺, [M+6]⁶⁺, [M+5]⁵⁺ y [M+4]⁴⁺; (C) Espectro ampliado para la especie [M+6]⁶⁺.

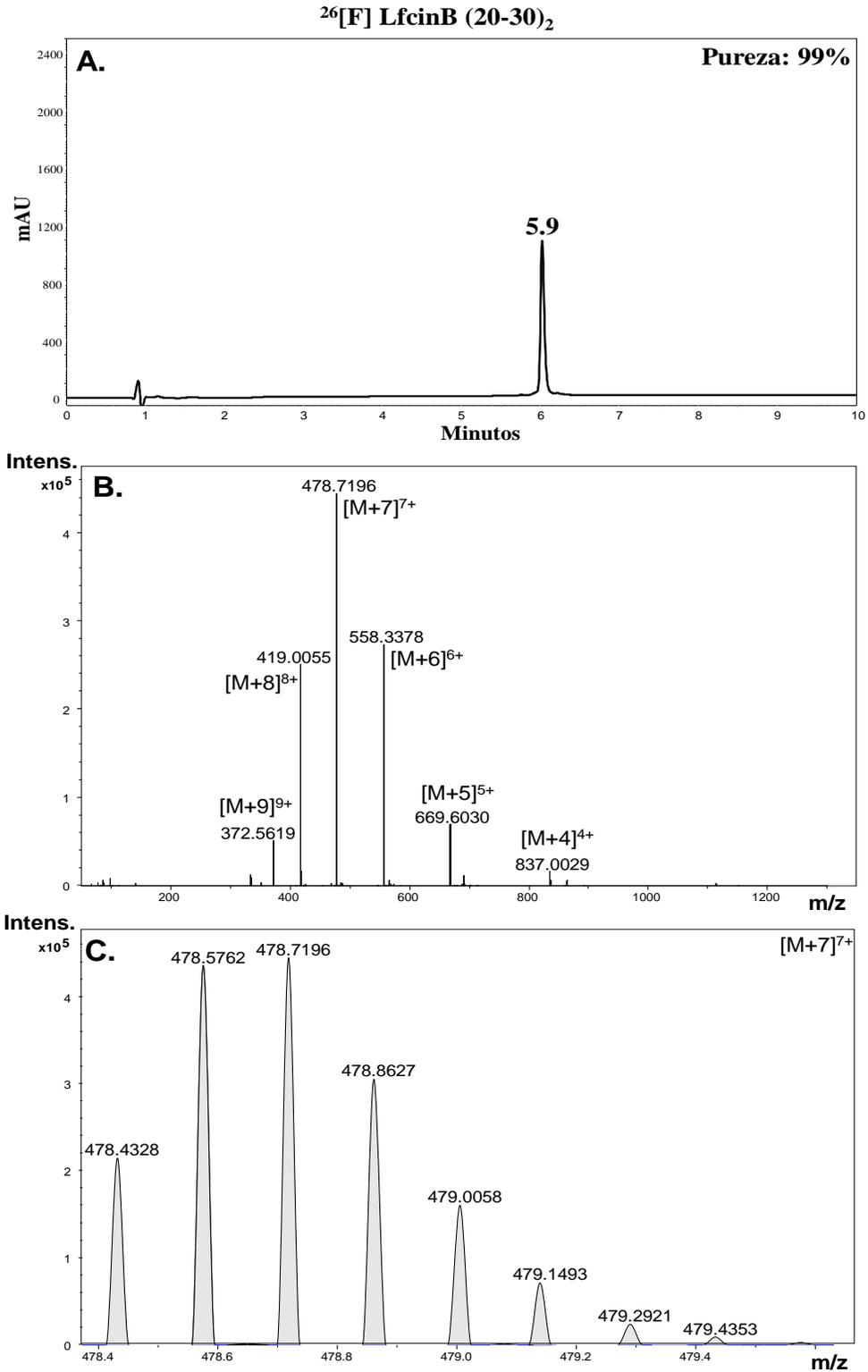


Figura A1.6. Caracterización del péptido ^{26}F LfcinB(20-30)₂ (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies [M+9]⁹⁺, [M+8]⁸⁺, [M+7]⁷⁺, [M+6]⁶⁺, [M+5]⁵⁺ y [M+4]⁴⁺; (C) Espectro ampliado para la especie [M+7]⁷⁺.

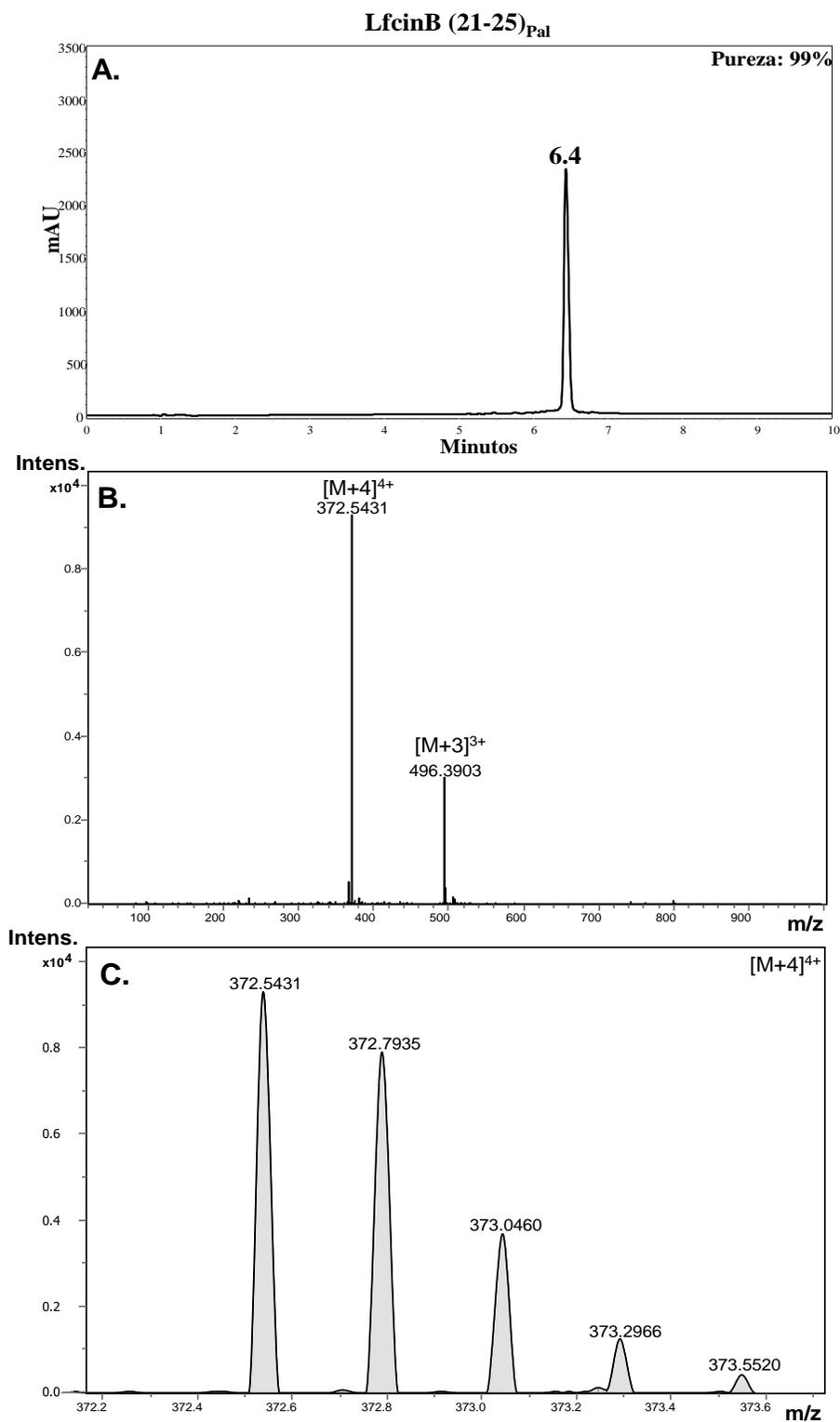


Figura A1.7. Caracterización del péptido LfcinB(21-25)_{Pal} (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies [M+3]³⁺ y [M+4]⁴⁺; (C) Espectro ampliado para la especie [M+4]⁴⁺.

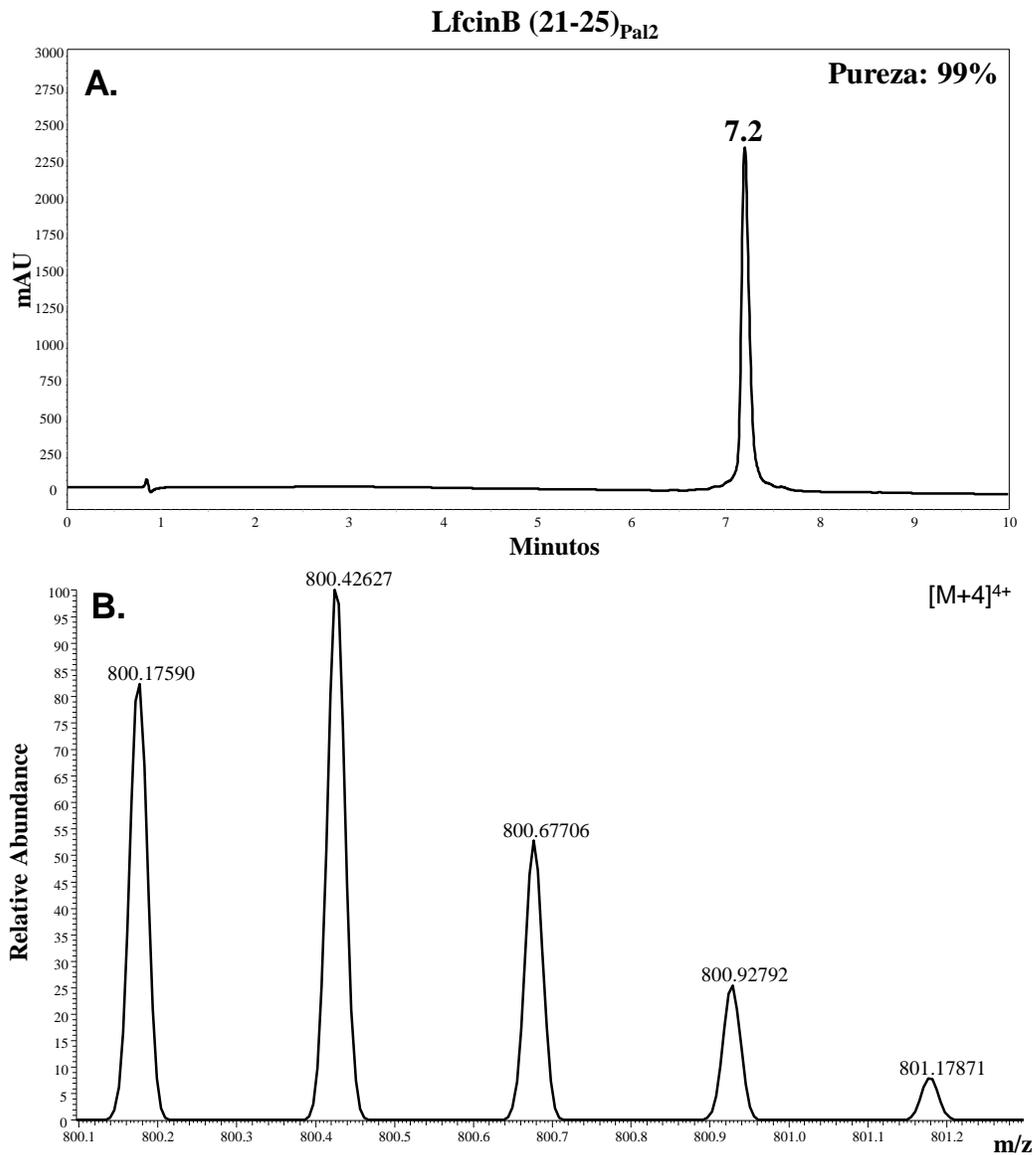


Figura A1.8. Caracterización del péptido LfcinB(21-25)_{Pal2} (A) Cromatograma; (B) Espectro ampliado para la especie [M+4]⁴⁺ realizado bajo un análisis de LC-MS.

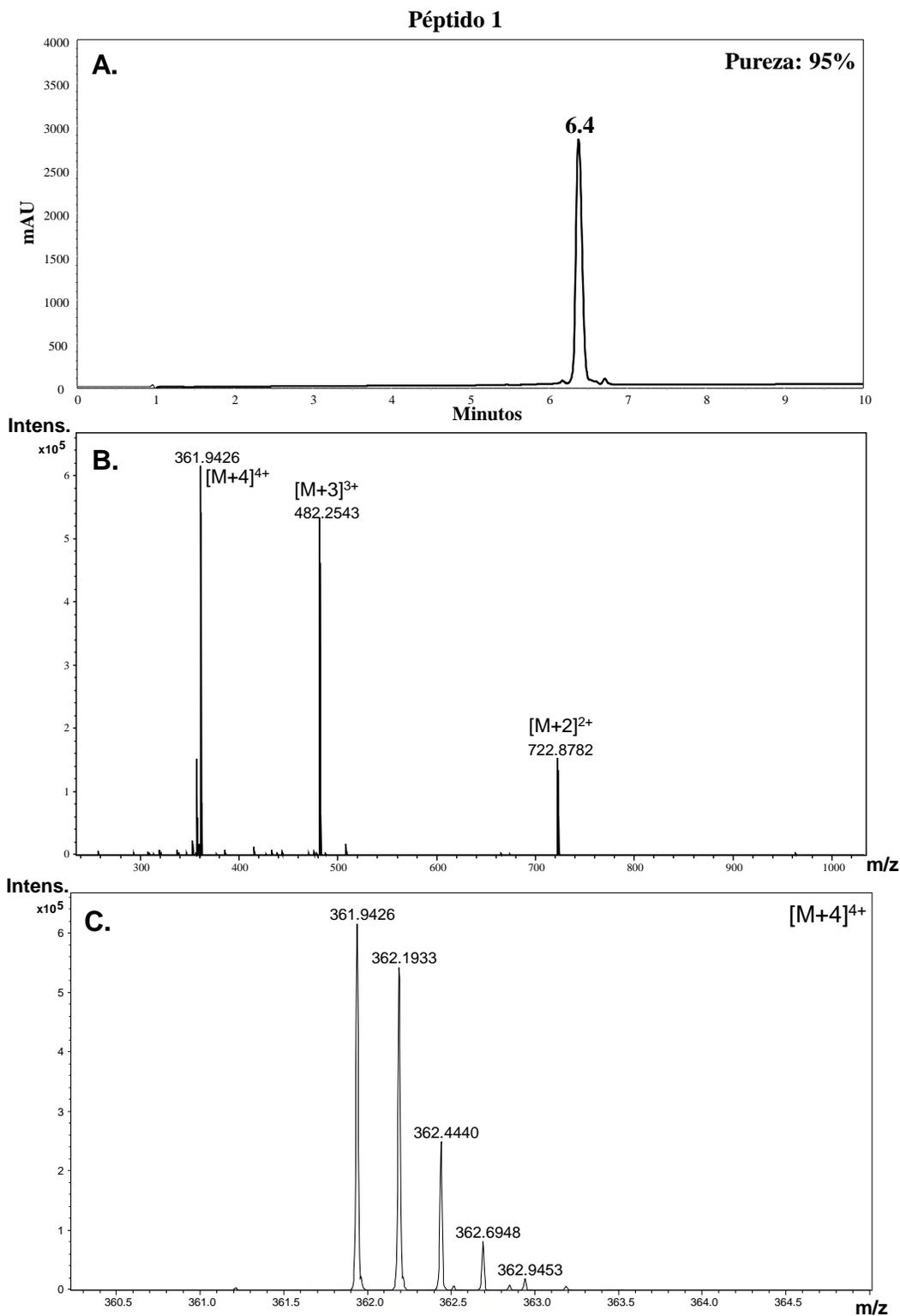


Figura A1.9. Caracterización del péptido 1 (**Orn-WQWRWQWR**) (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies $[M+4]^{4+}$, $[M+3]^{3+}$ y $[M+2]^{2+}$; (C) Espectro ampliado para la especie $[M+4]^{4+}$.

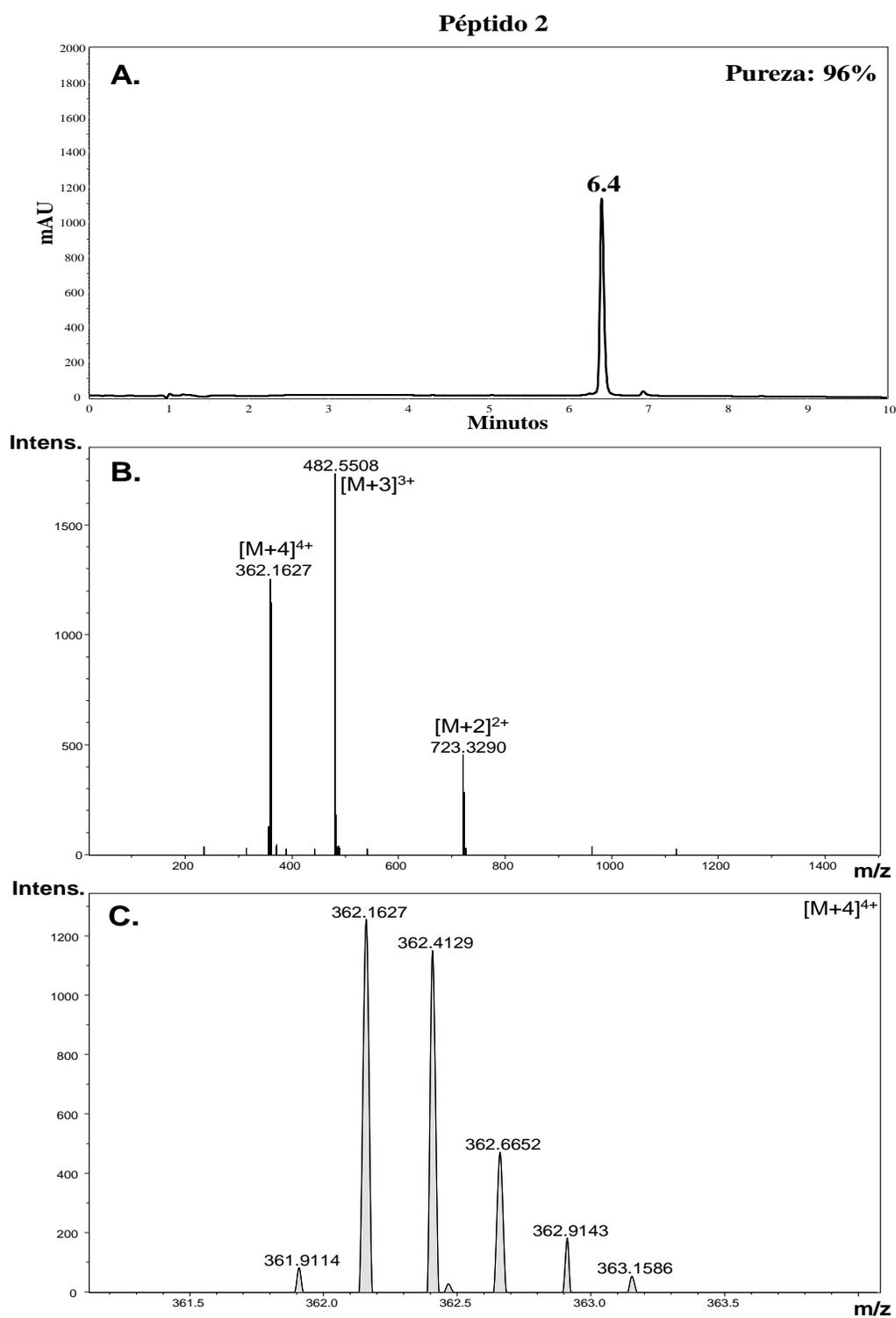


Figura A1.10. Caracterización del péptido 2 (RWQW-Orn-WQWR) (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies $[M+4]^{4+}$, $[M+3]^{3+}$ y $[M+2]^{2+}$; (C) Espectro ampliado para la especie $[M+4]^{4+}$.

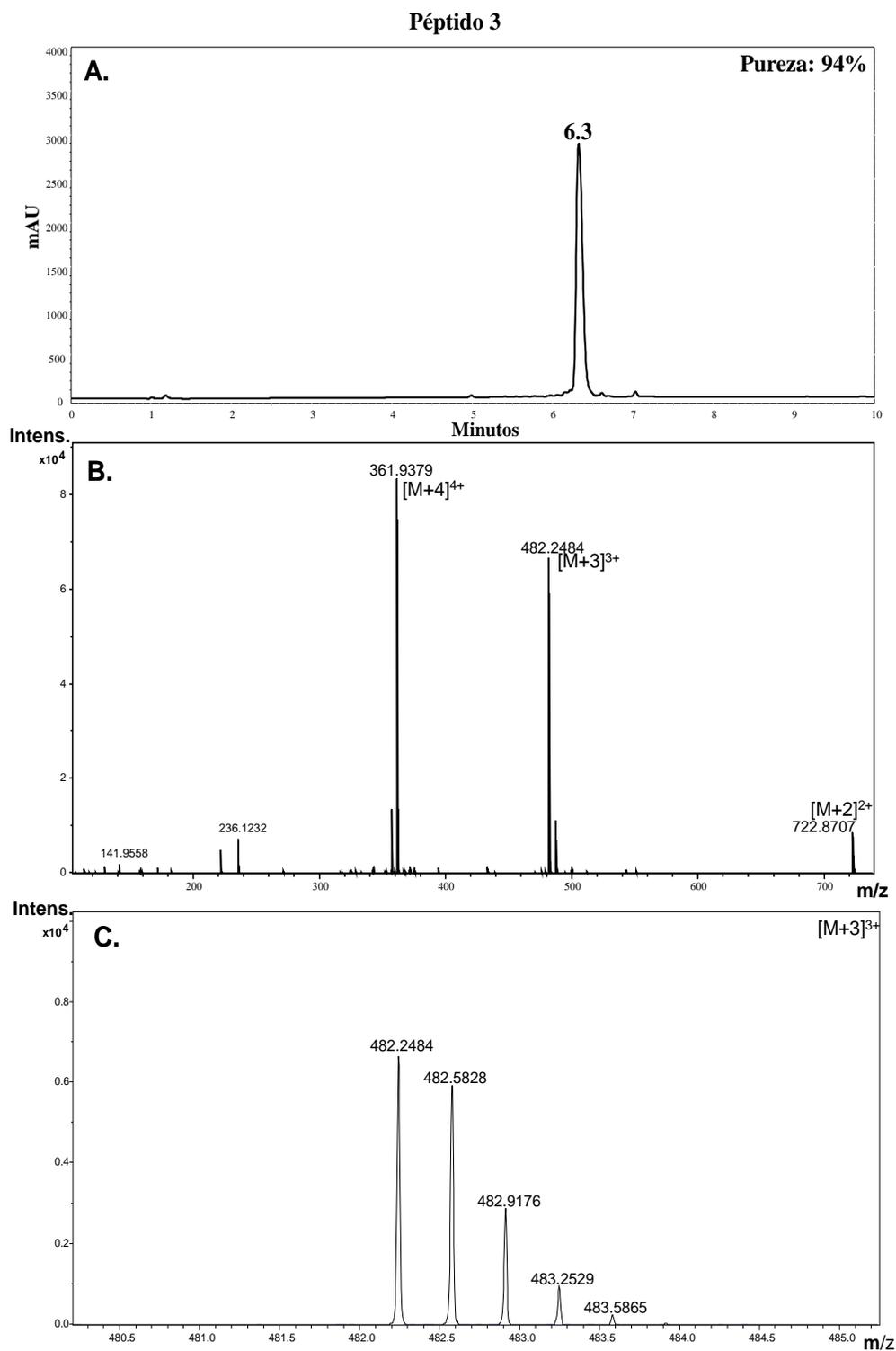


Figura A1.11. Caracterización del péptido 3 (RWQWRWQW-Orn) (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies $[M+4]^{4+}$, $[M+3]^{3+}$ y $[M+2]^{2+}$; (C) Espectro ampliado para la especie $[M+3]^{3+}$.

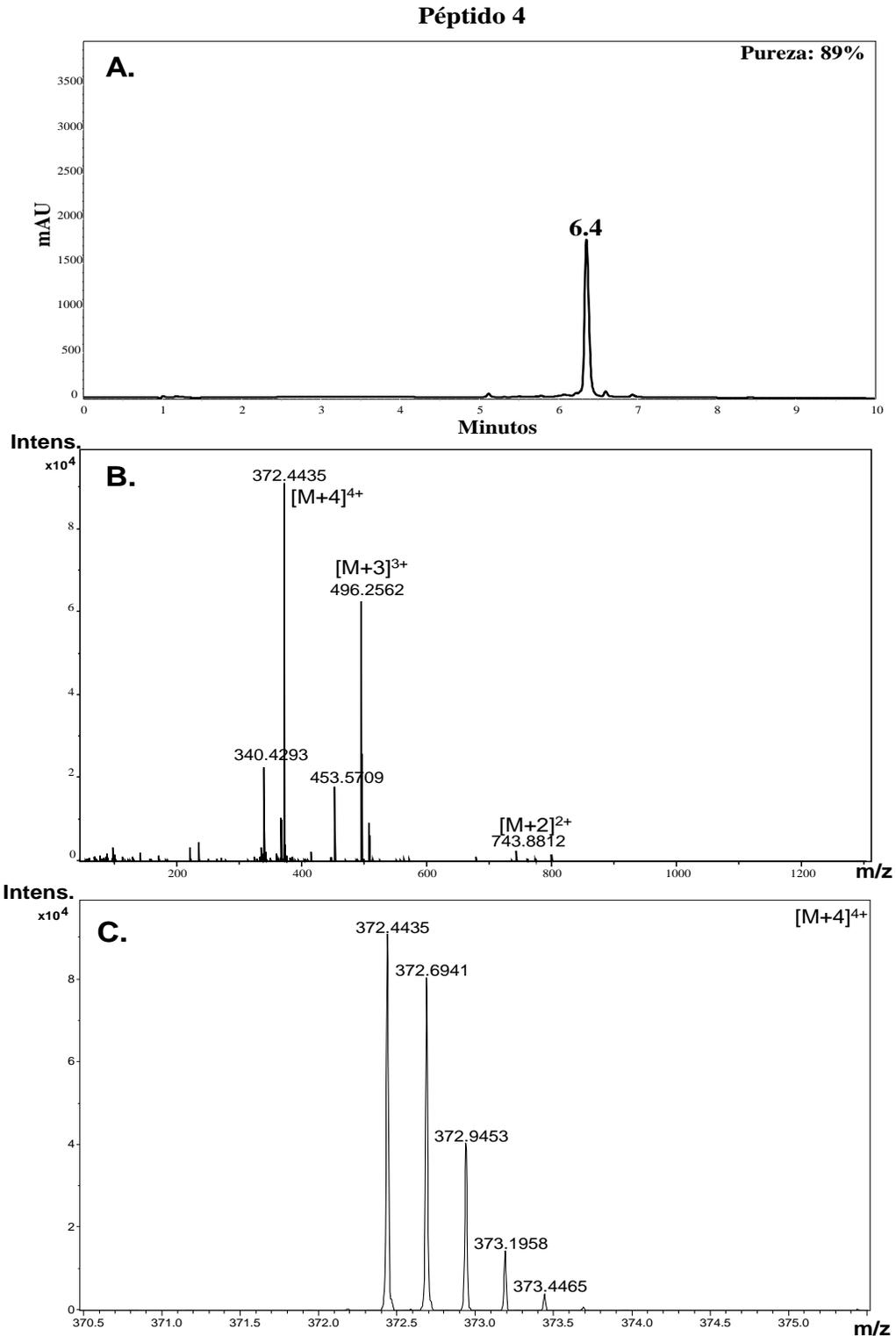


Figura A1.12. Caracterización del péptido 4 (^dRWQWRWQWR) (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies [M+4]⁴⁺, [M+3]³⁺ y [M+2]²⁺; (C) Espectro ampliado para la especie [M+4]⁴⁺.

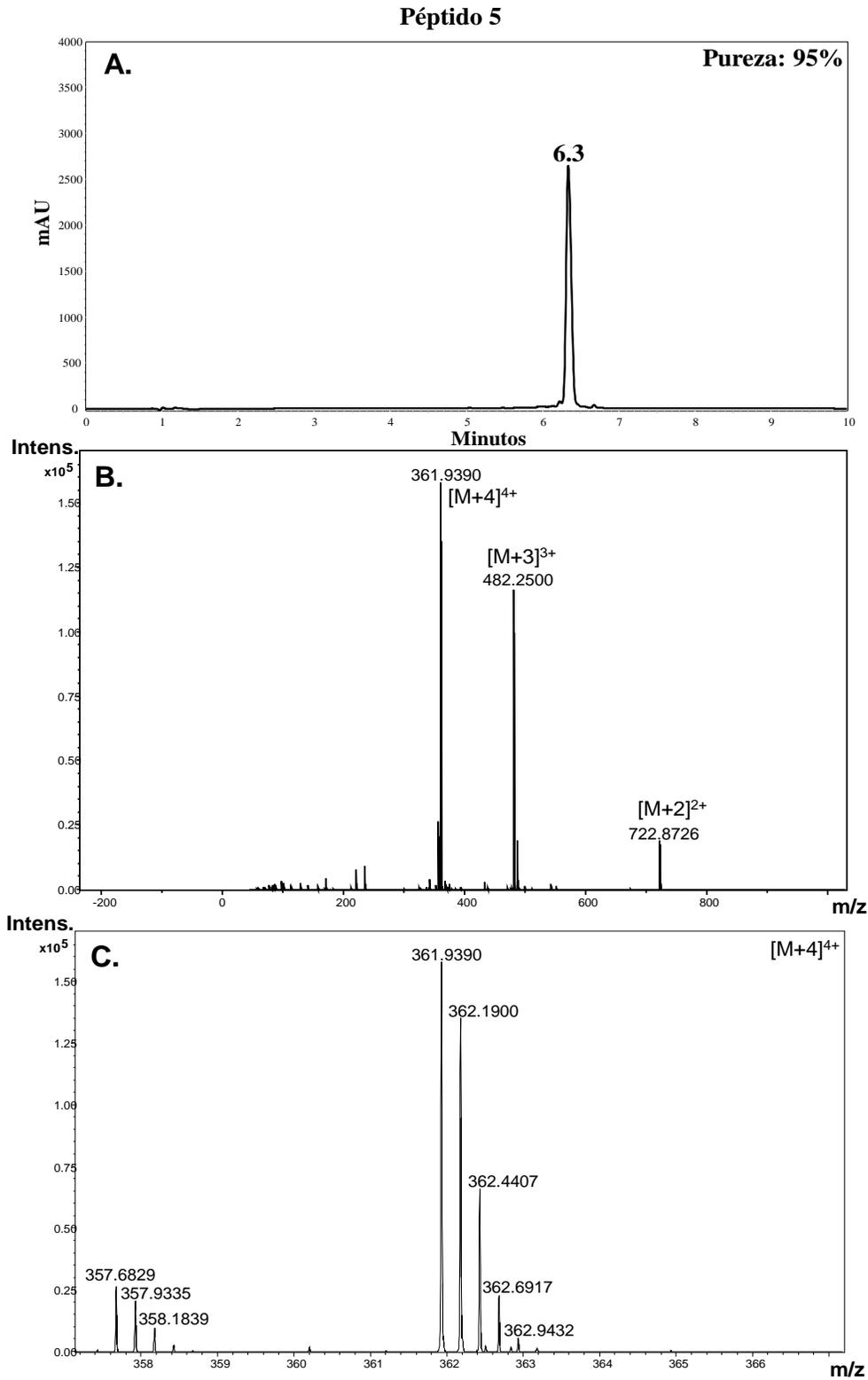


Figura A1.13. Caracterización del péptido 5 (^dRWQW-Orn-WQWR) (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies [M+4]⁴⁺, [M+3]³⁺ y [M+2]²⁺; (C) Espectro ampliado para la especie [M+4]⁴⁺.

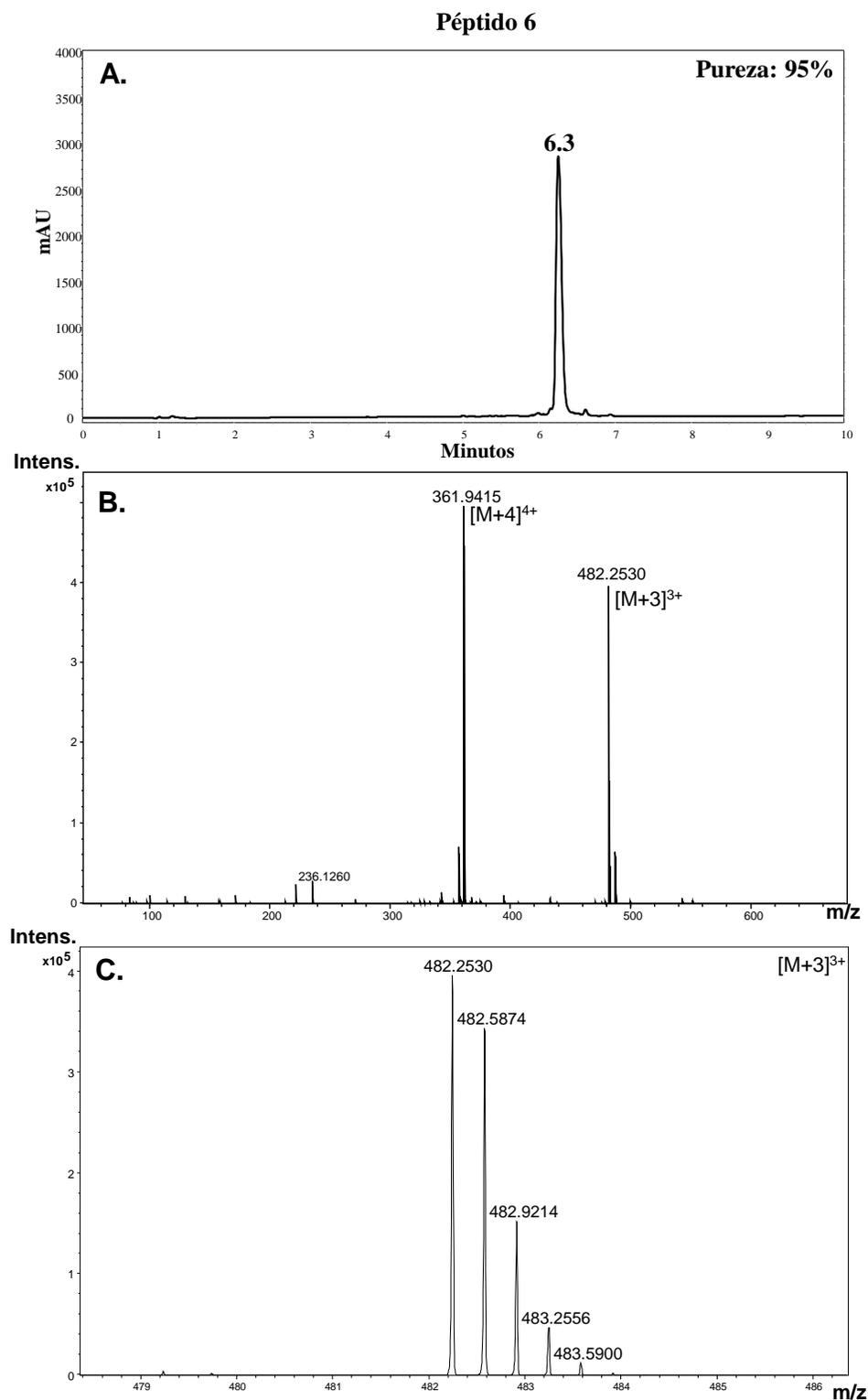


Figura A1.14. Caracterización del péptido 6 (^dRWQWRWQW-Orn) (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies [M+4]⁴⁺ y [M+3]³⁺; (C) Espectro ampliado para la especie [M+3]³⁺.

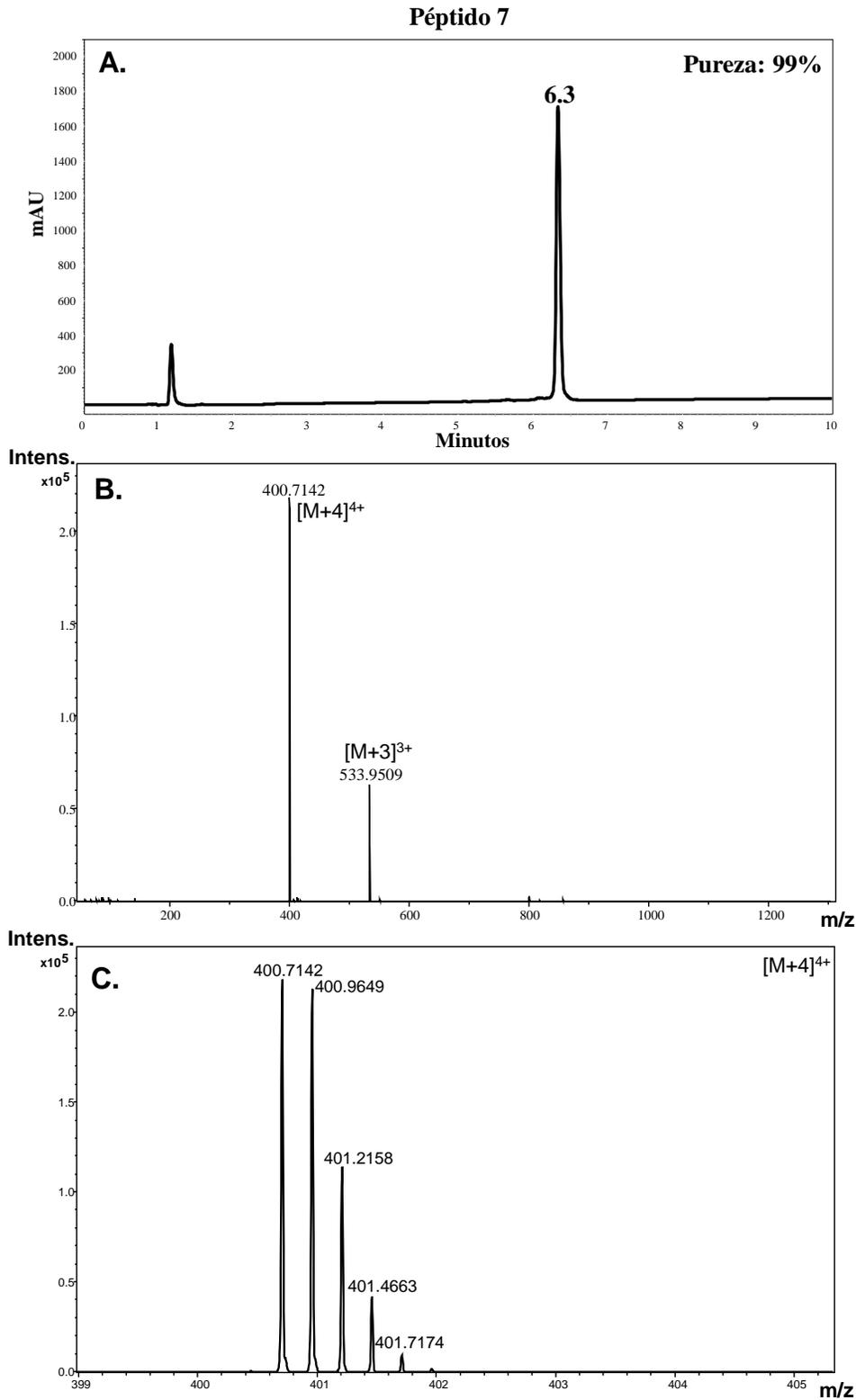


Figura A1.15. Caracterización del péptido 7 (**Ahx-RWQWRWQWR**) (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies $[M+4]^{4+}$ y $[M+3]^{3+}$; (C) Espectro ampliado para la especie $[M+4]^{4+}$.

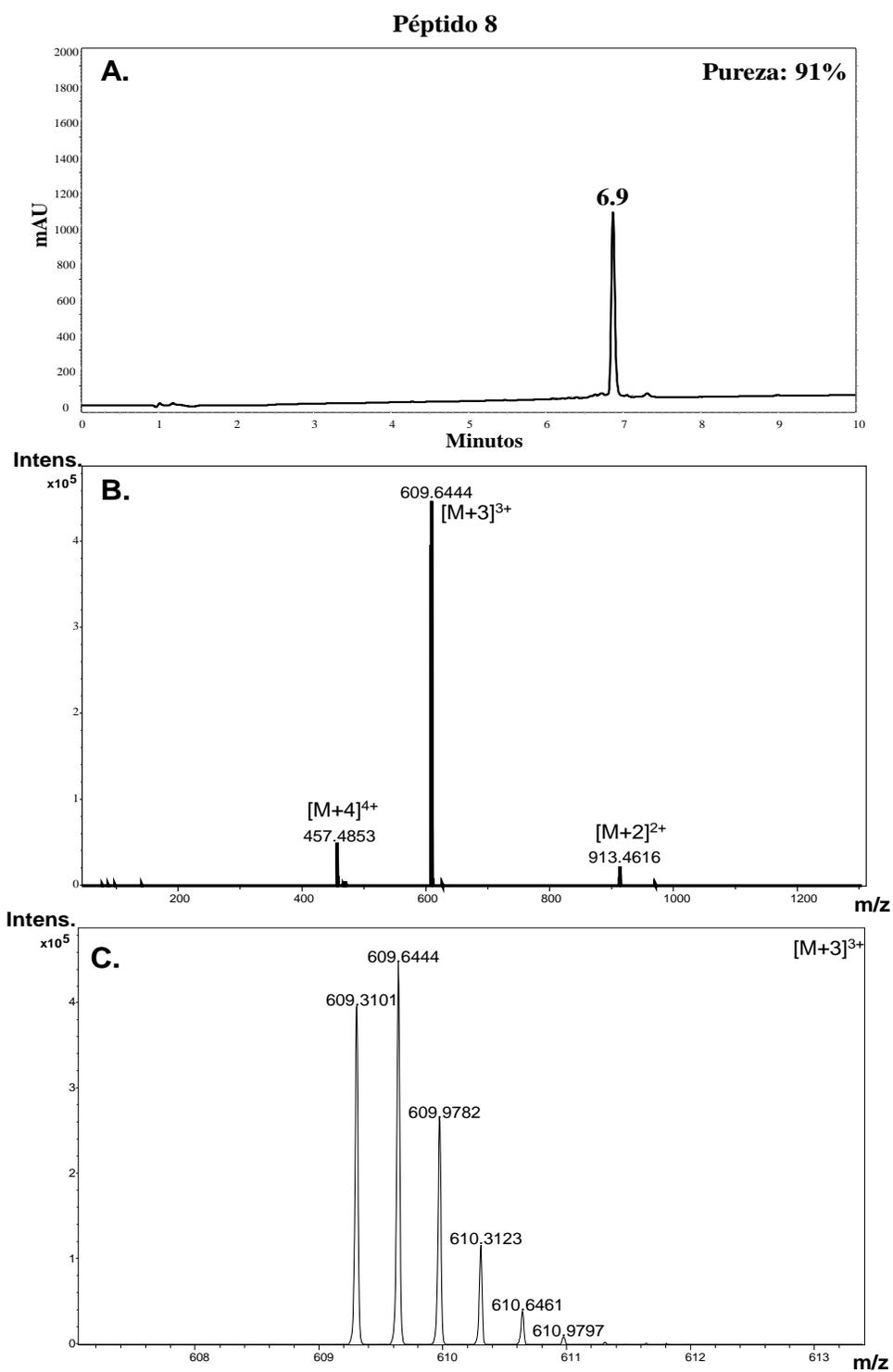


Figura A1.16. Caracterización del péptido 8 (**Biotina-Ahx-RWQWRWQWR**) (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies [M+4]⁴⁺, [M+3]³⁺ y [M+2]²⁺; (C) Espectro ampliado para la especie [M+3]³⁺.

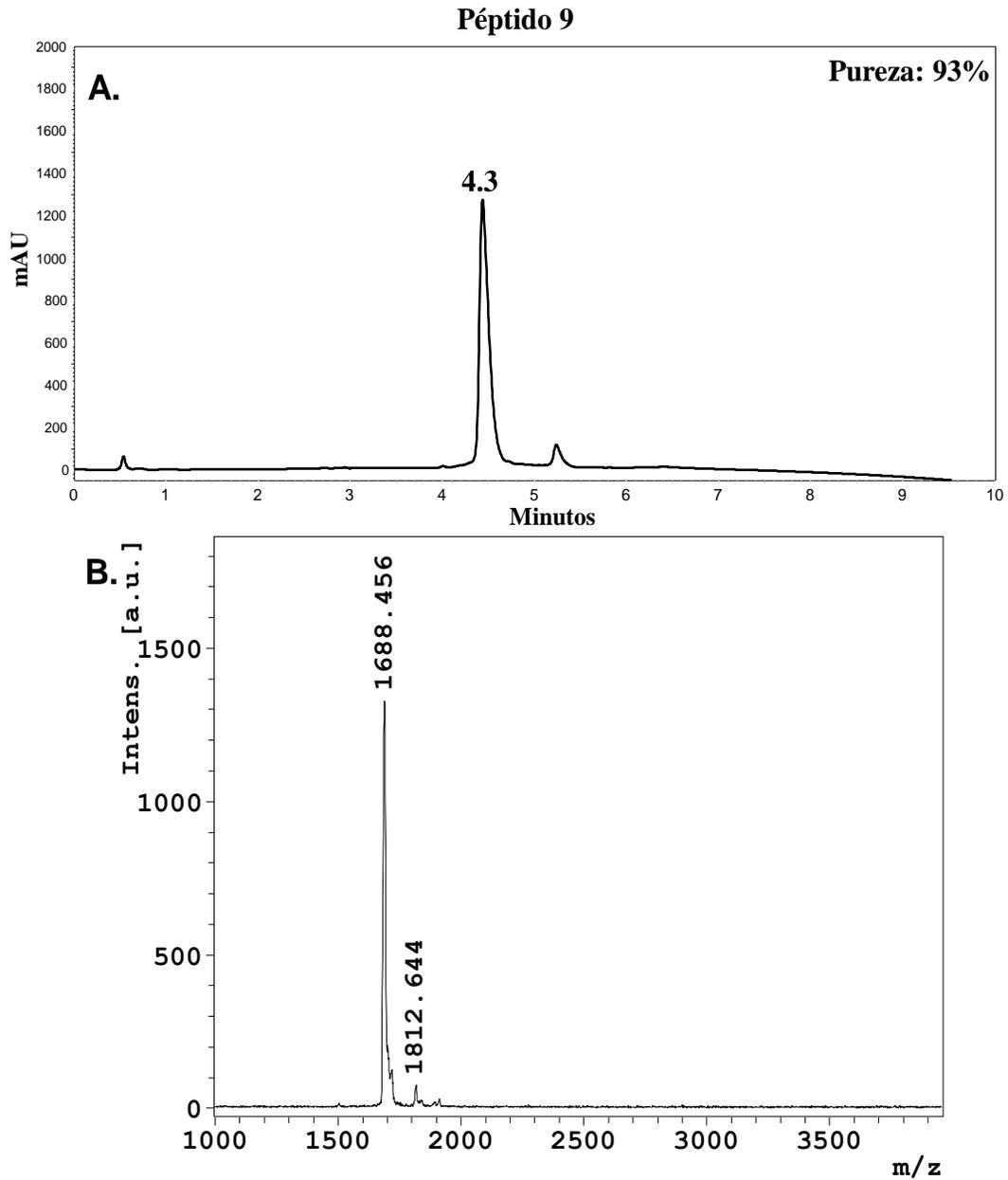


Figura A1.17. Caracterización del péptido 9 (**Amy-RWQWRWQWR**) (A) Cromatograma; (B) Espectro MALDI-TOF de la molécula.

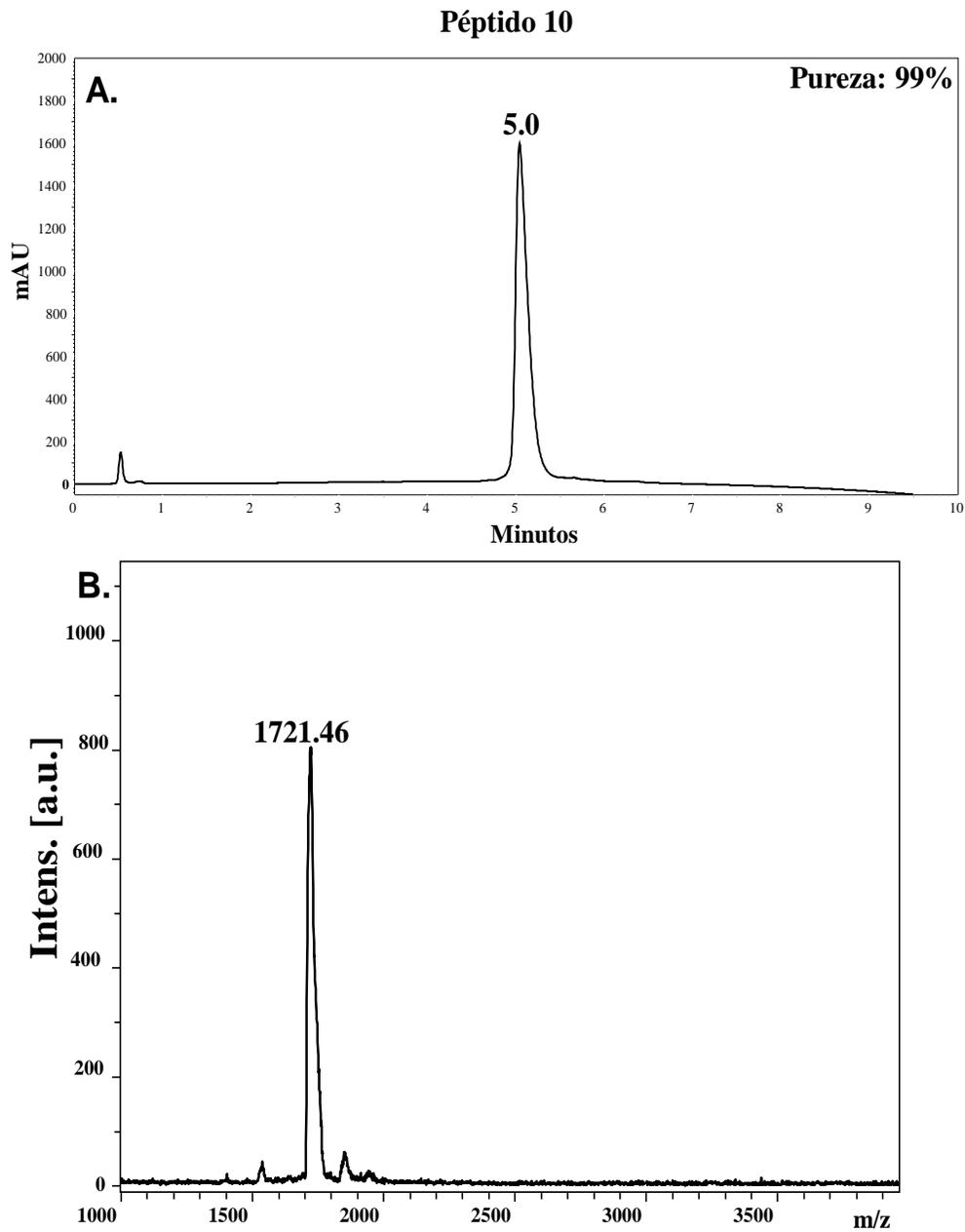


Figura A1.18. Caracterización del péptido 10 (**Pam-RWQWRWQWR**) (A) Cromatograma; (B) Espectro MALDI-TOF de la molécula.

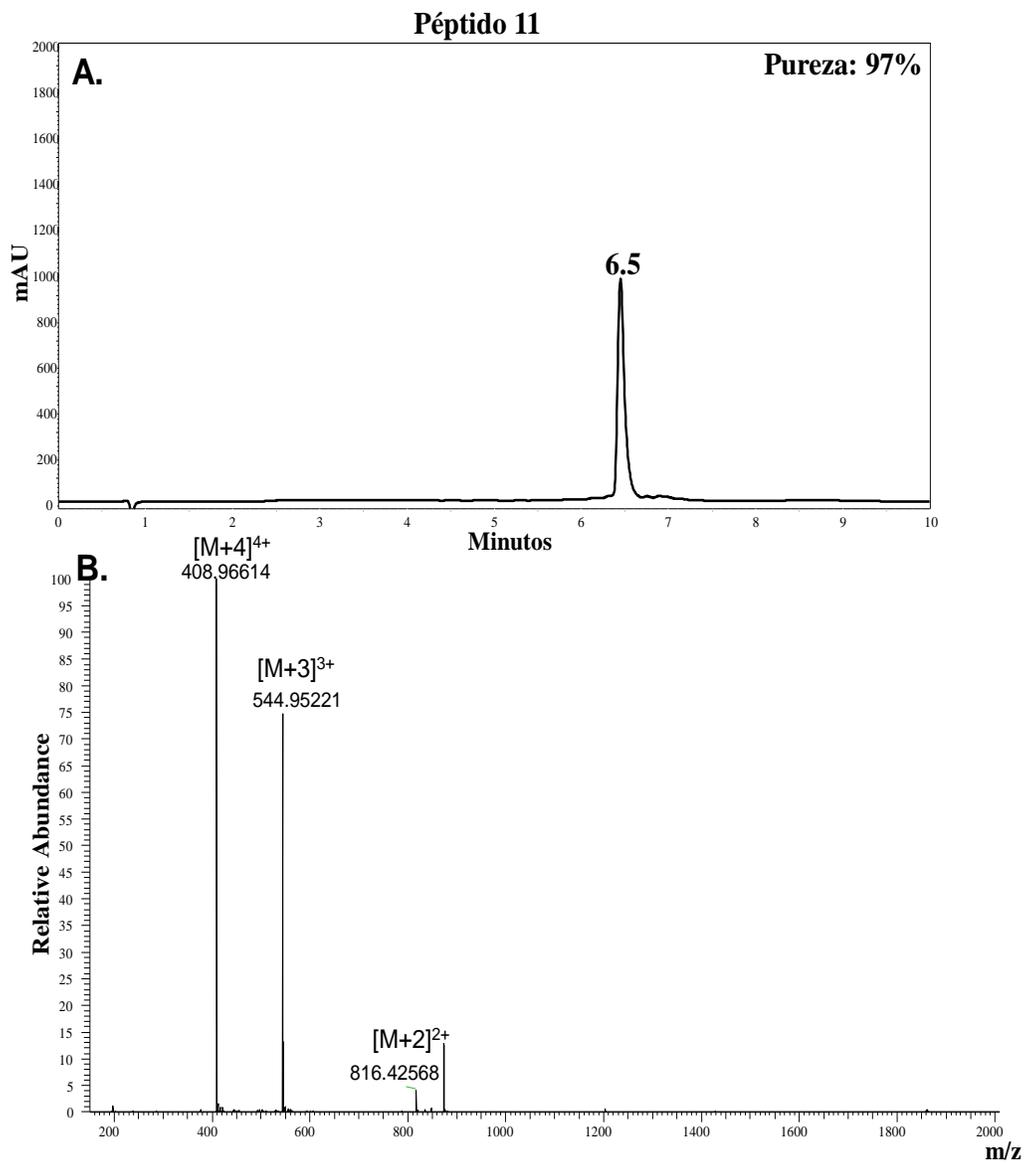


Figura A1.19. Caracterización del péptido 11 (**miniPEG-RWQWRWQWR**) (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies $[M+4]^{4+}$, $[M+3]^{3+}$ y $[M+2]^{2+}$.

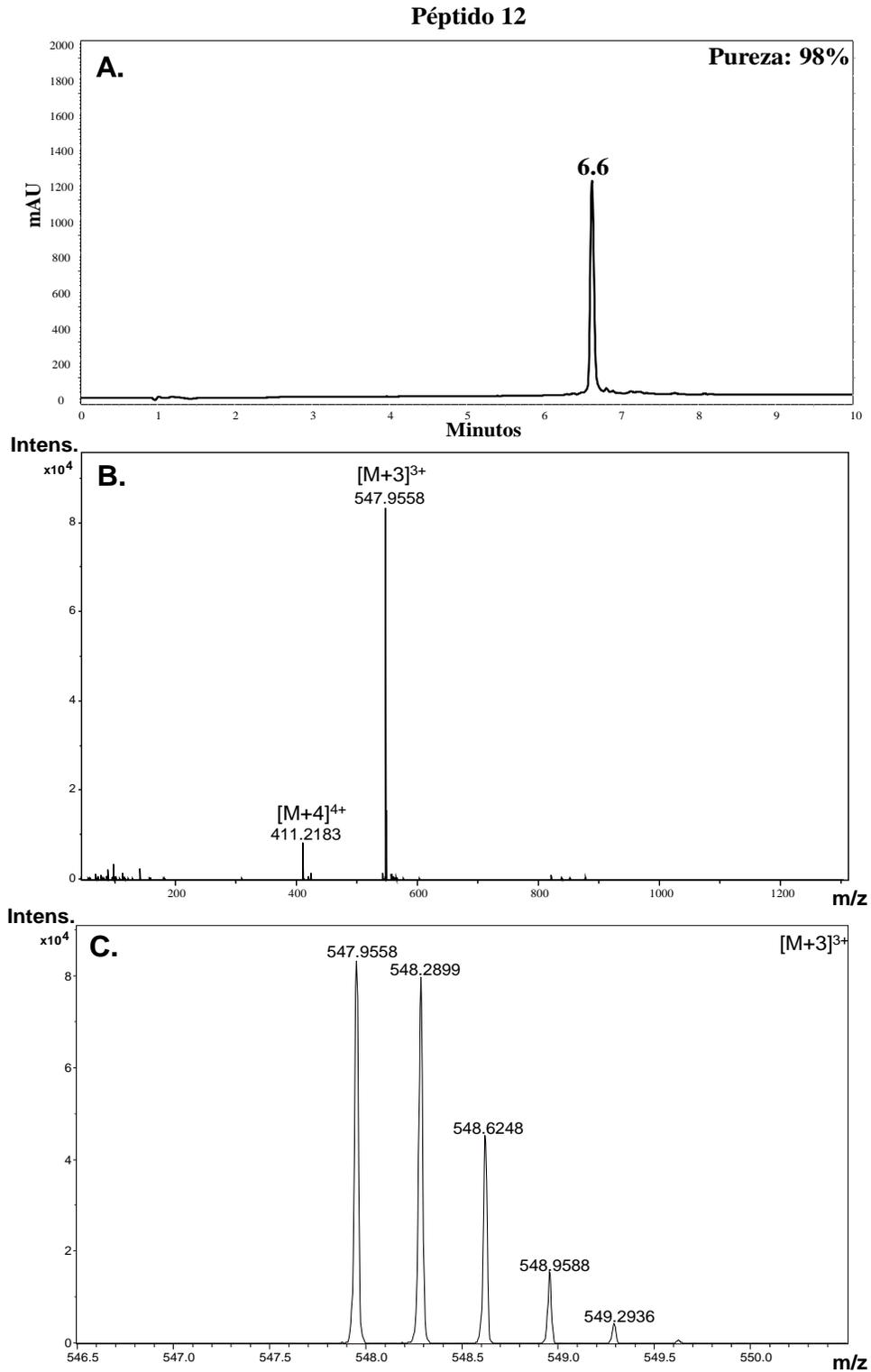


Figura A1.20. Caracterización del péptido 12 (Ac-Ahx-RWQWRWQWR) (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies [M+4]⁴⁺, [M+3]³⁺ y [M+2]²⁺; (C) Espectro ampliado para la especie [M+3]³⁺.

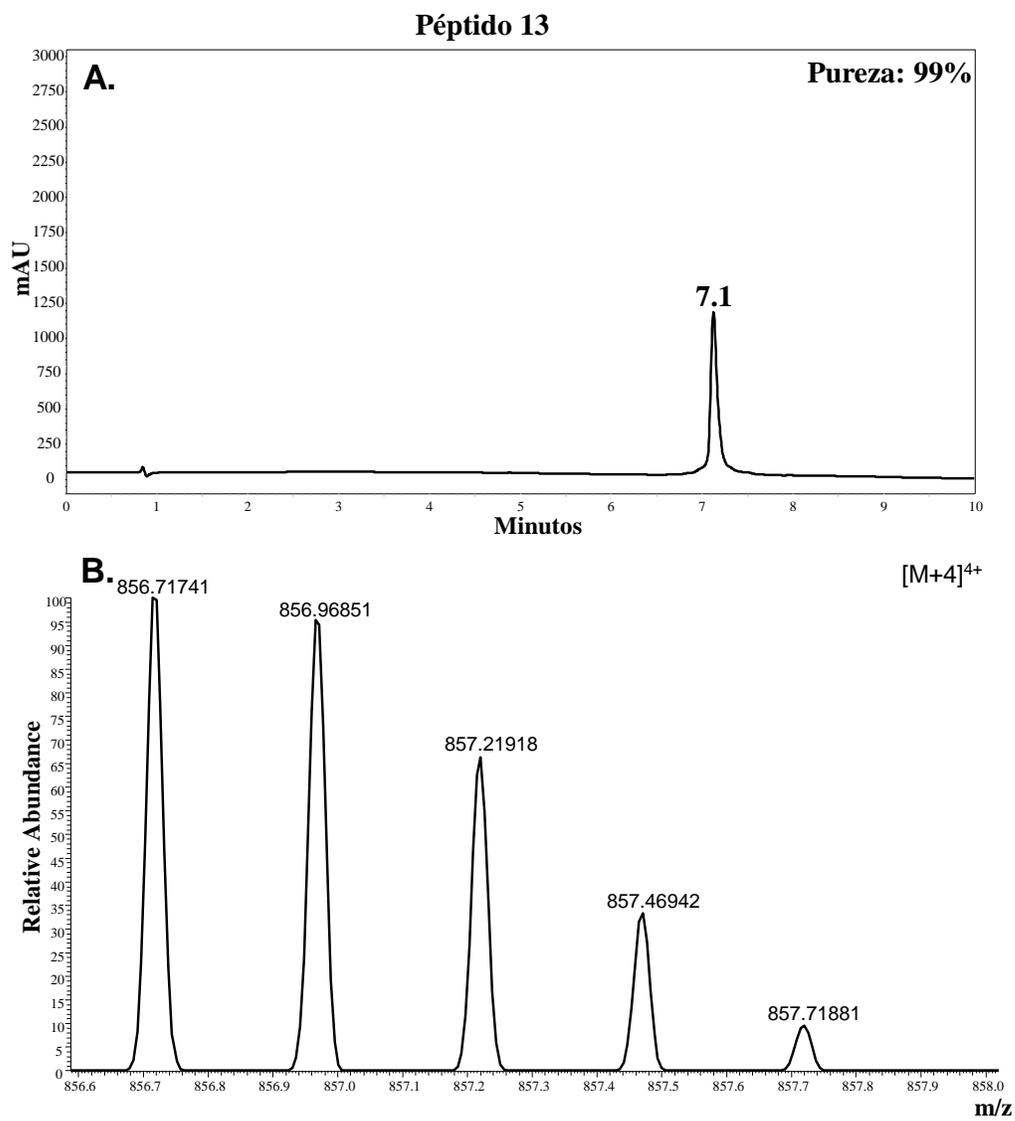


Figura A1.21. Caracterización del péptido 13 (**Ahx**-RWQWRWQWR)₂-K-Ahx (A) Cromatograma; (B) Espectro ampliado para la especie $[M+4]^{4+}$.

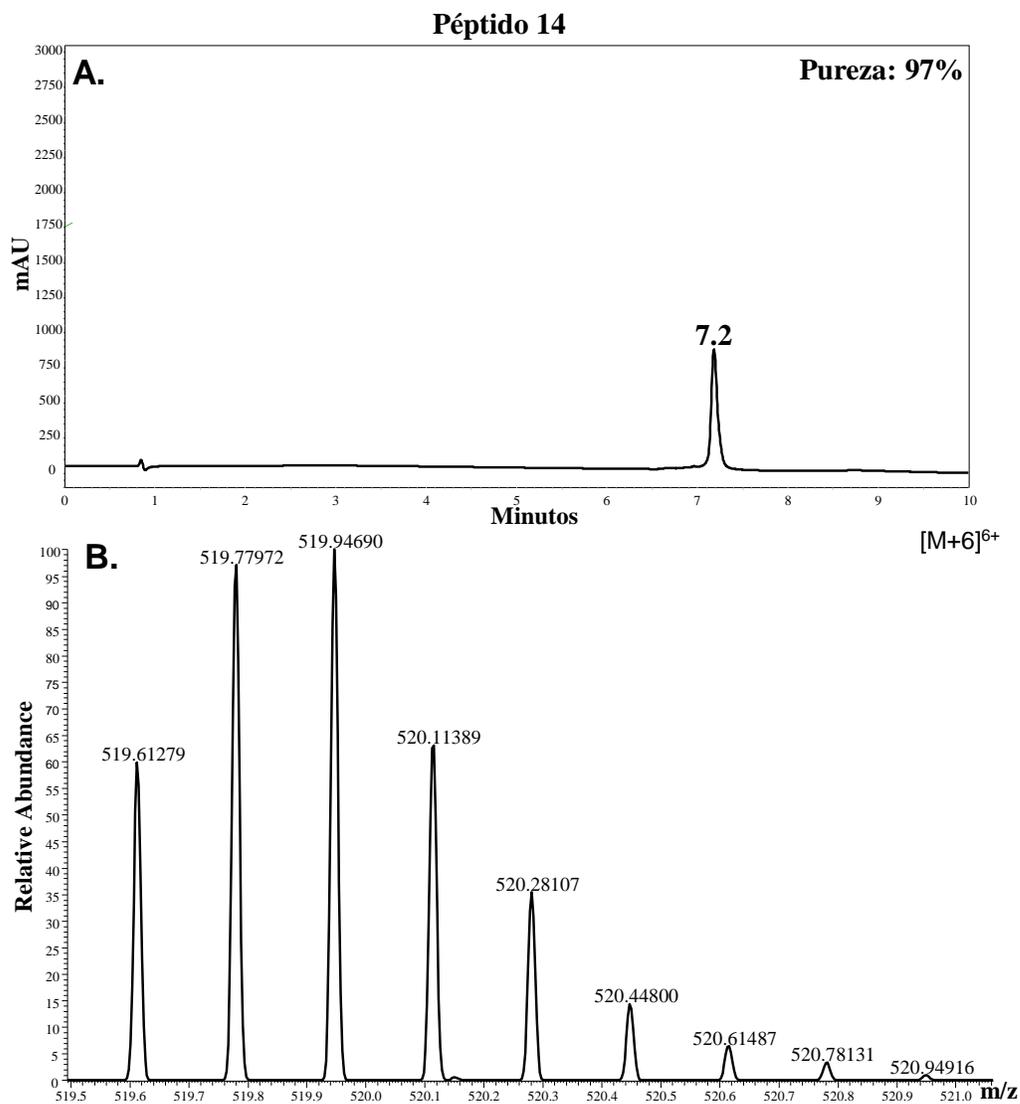


Figura A1.22. Caracterización del péptido 14 (RWQWRWQW-Orn)₂-K-Ahx (A) Cromatograma; (B) Espectro ampliado para la especie [M+6]⁶⁺.

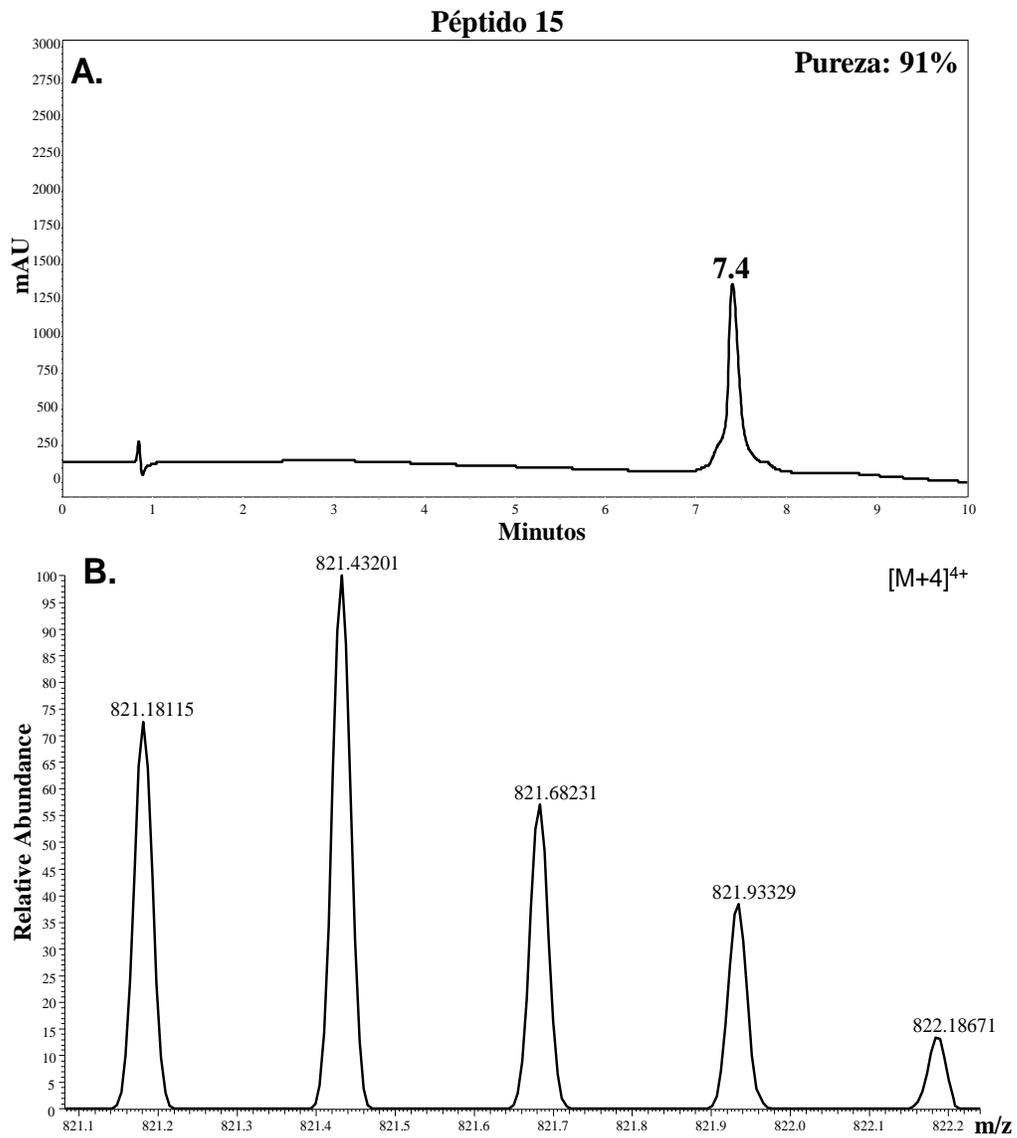


Figura A1.23. Caracterización del péptido 15 (Ac-RWQWRWQWR)2-K-Ahx)(A) Cromatograma; (B) Espectro ampliado para la especie $[M+4]^{4+}$.

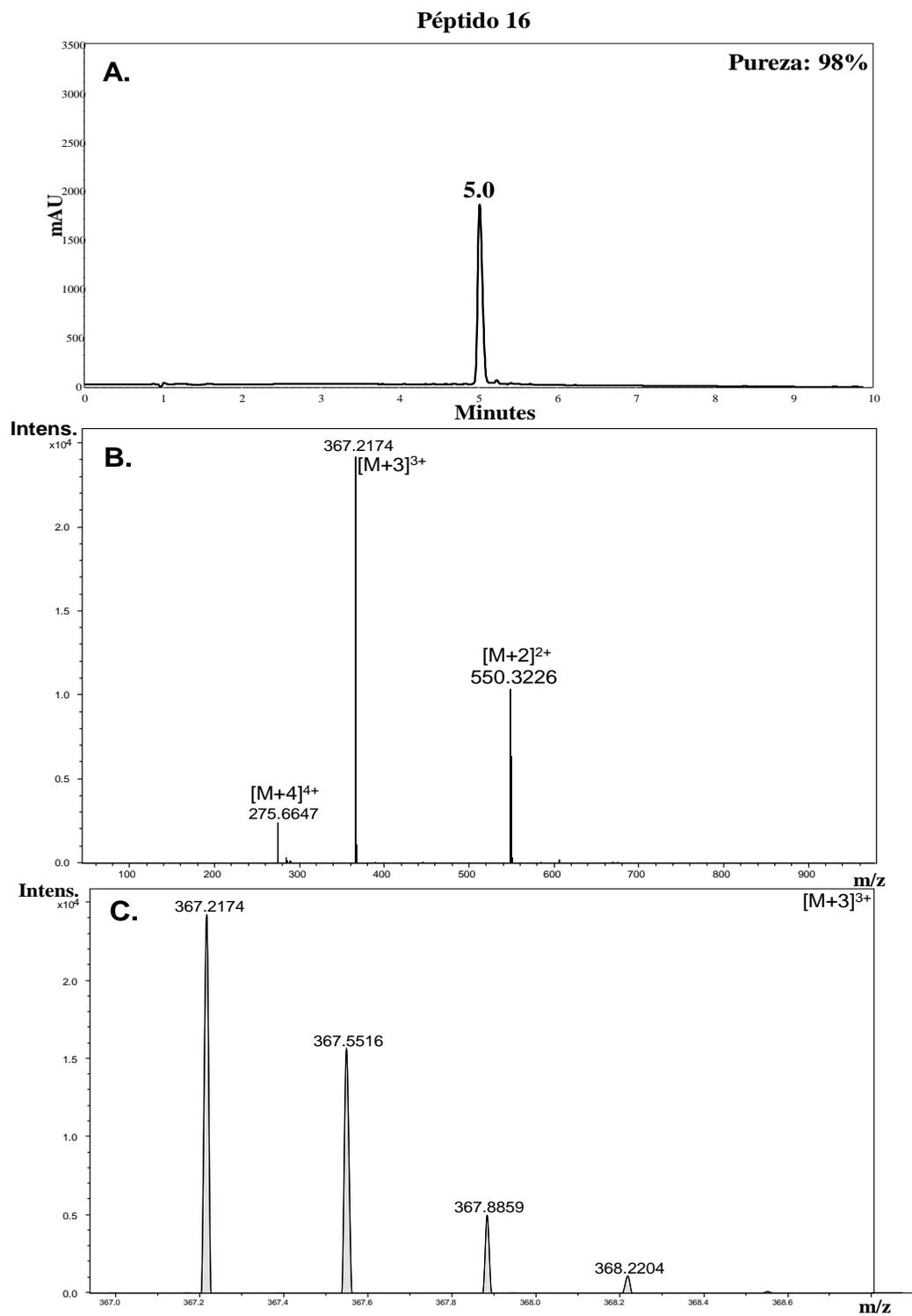


Figura A1.24. Caracterización del péptido 16 (**Ahx-RRWQWR**) (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies [M+4]⁴⁺, [M+3]³⁺ y [M+2]²⁺; (C) Espectro ampliado para la especie [M+3]³⁺.

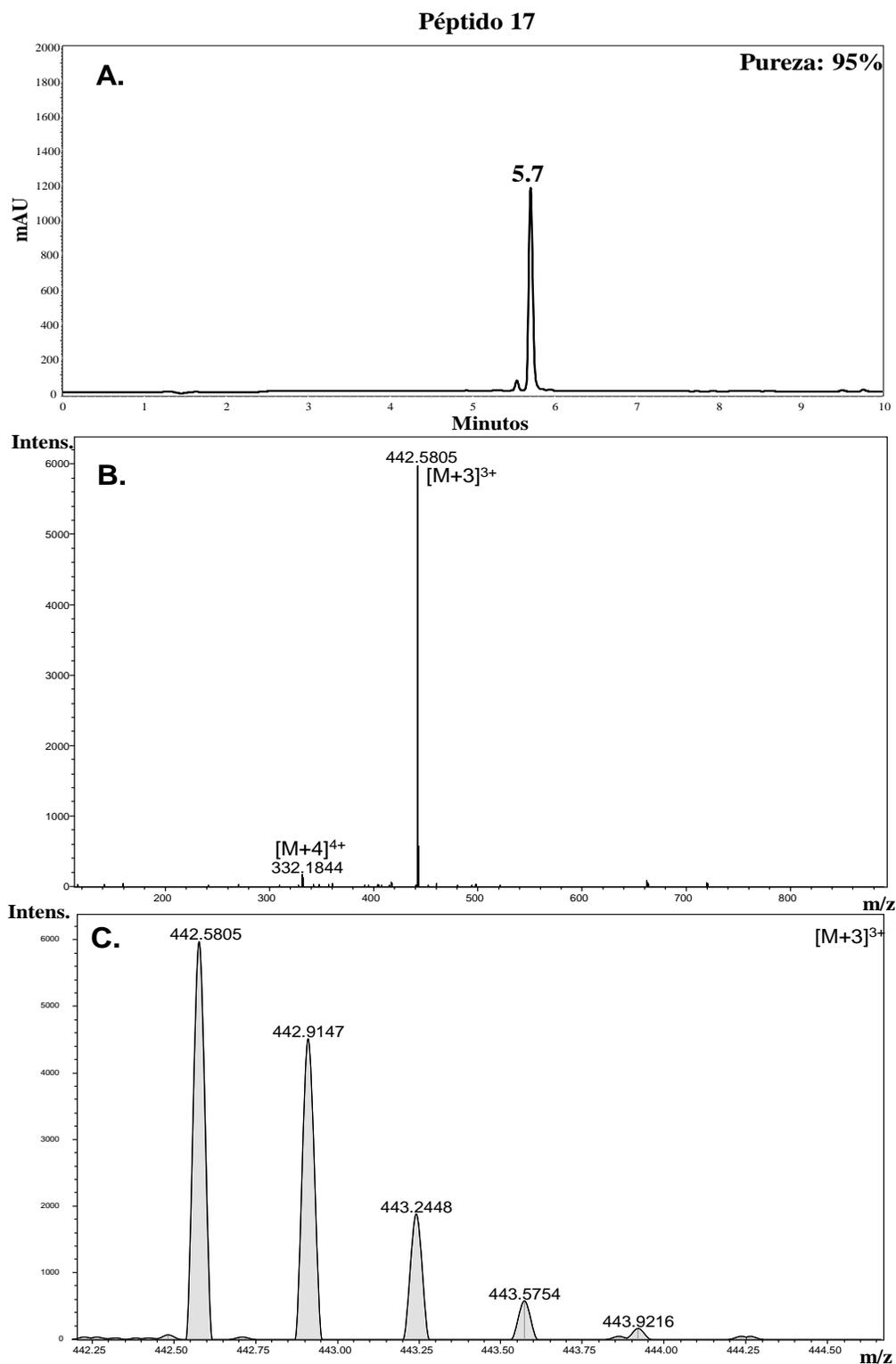


Figura A1.25. Caracterización del péptido 17 (**Biotina-Ahx-RRWQWR**) (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies $[M+4]^{4+}$ y $[M+3]^{3+}$; (C) Espectro ampliado para la especie $[M+3]^{3+}$.

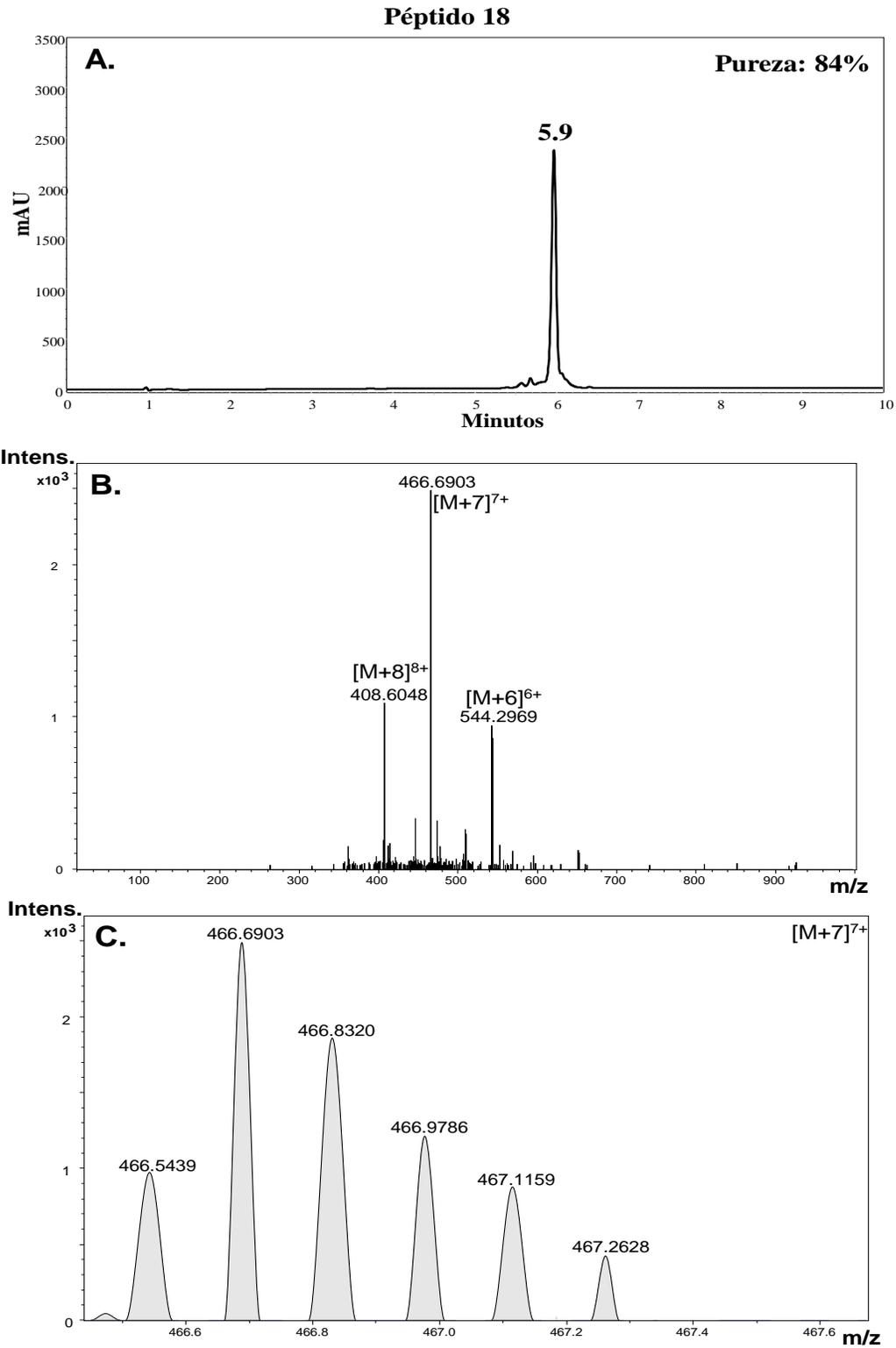


Figura A1.26. Caracterización del péptido 18 (**Orn-RWQWRFKKL**)₂-K-Ahx (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies [M+8]⁸⁺, [M+7]⁷⁺ y [M+6]⁶⁺; (C) Espectro ampliado para la especie [M+7]⁷⁺.

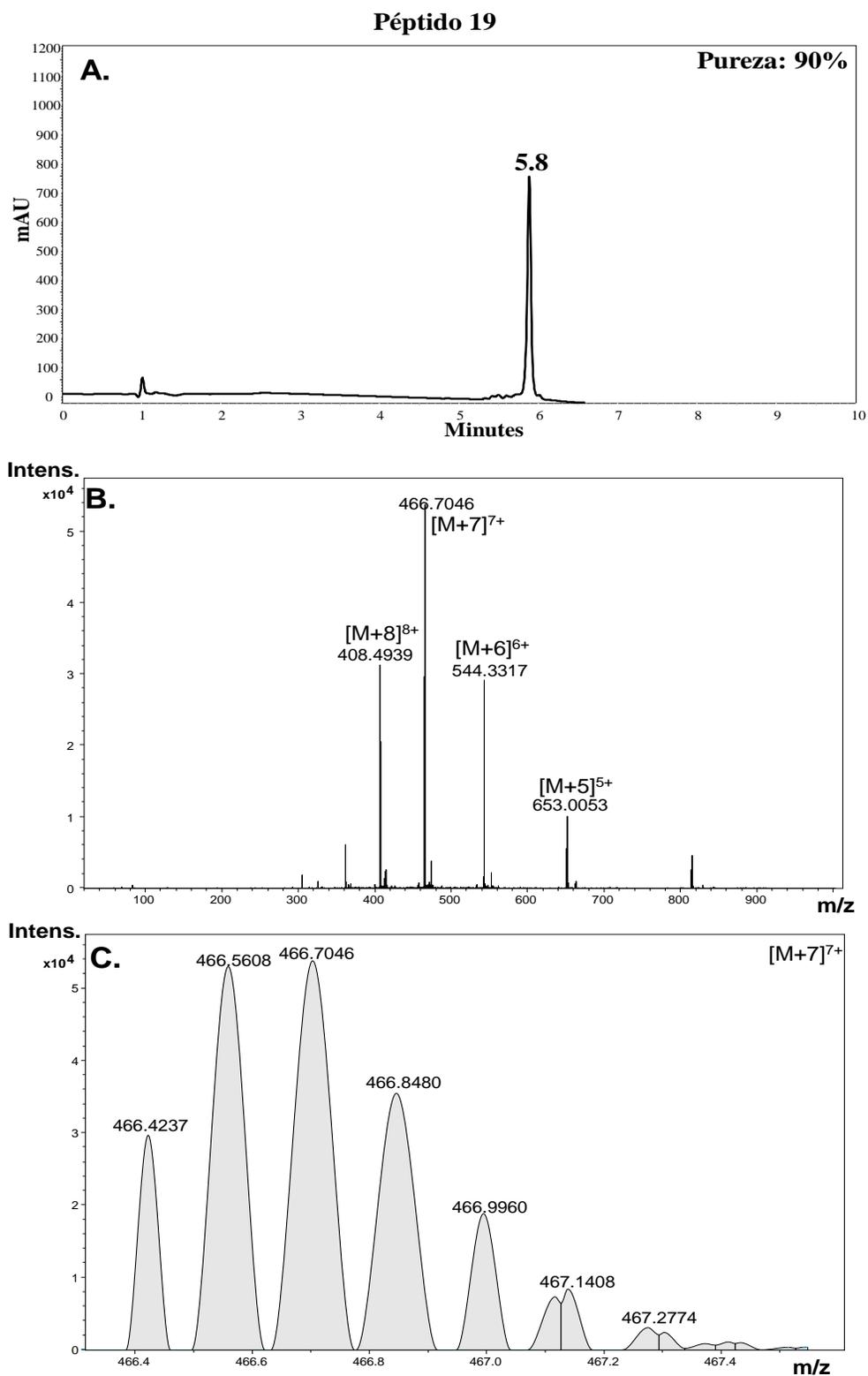


Figura A1.27. Caracterización del péptido 19 (R-Orn-WQWRFKKL₂-K-Ahx) (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies [M+8]⁸⁺, [M+7]⁷⁺, [M+6]⁶⁺ y [M+5]⁵⁺; (C) Espectro ampliado para la especie [M+7]⁷⁺.

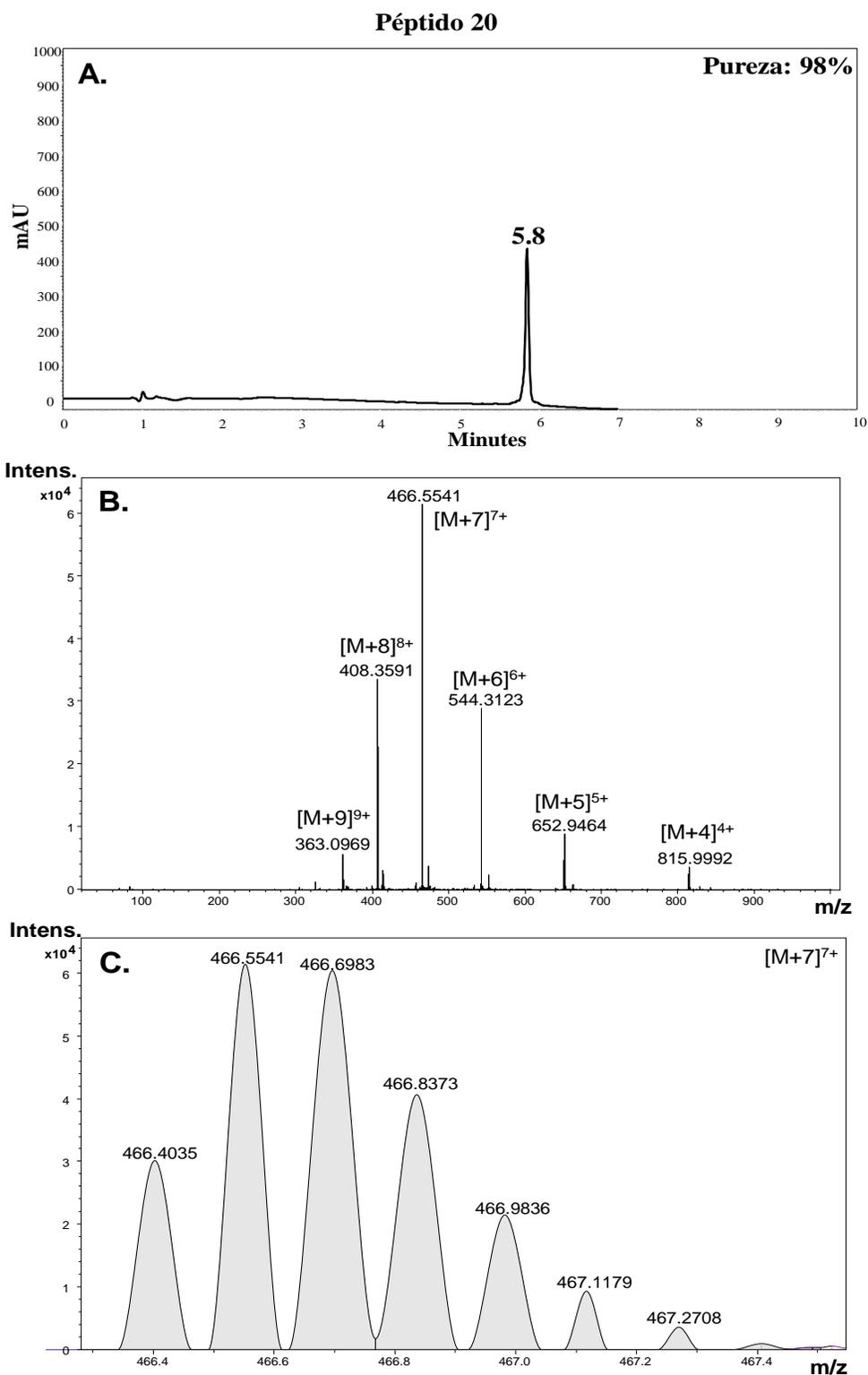


Figura A1.28. Caracterización del péptido 20 (RRWQW-Orn-FKKLG)₂-K-Ahx (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies [M+9]⁹⁺, [M+8]⁸⁺, [M+7]⁷⁺, [M+6]⁶⁺, [M+5]⁵⁺ y [M+4]⁴⁺; (C) Espectro ampliado para la especie [M+7]⁷⁺.

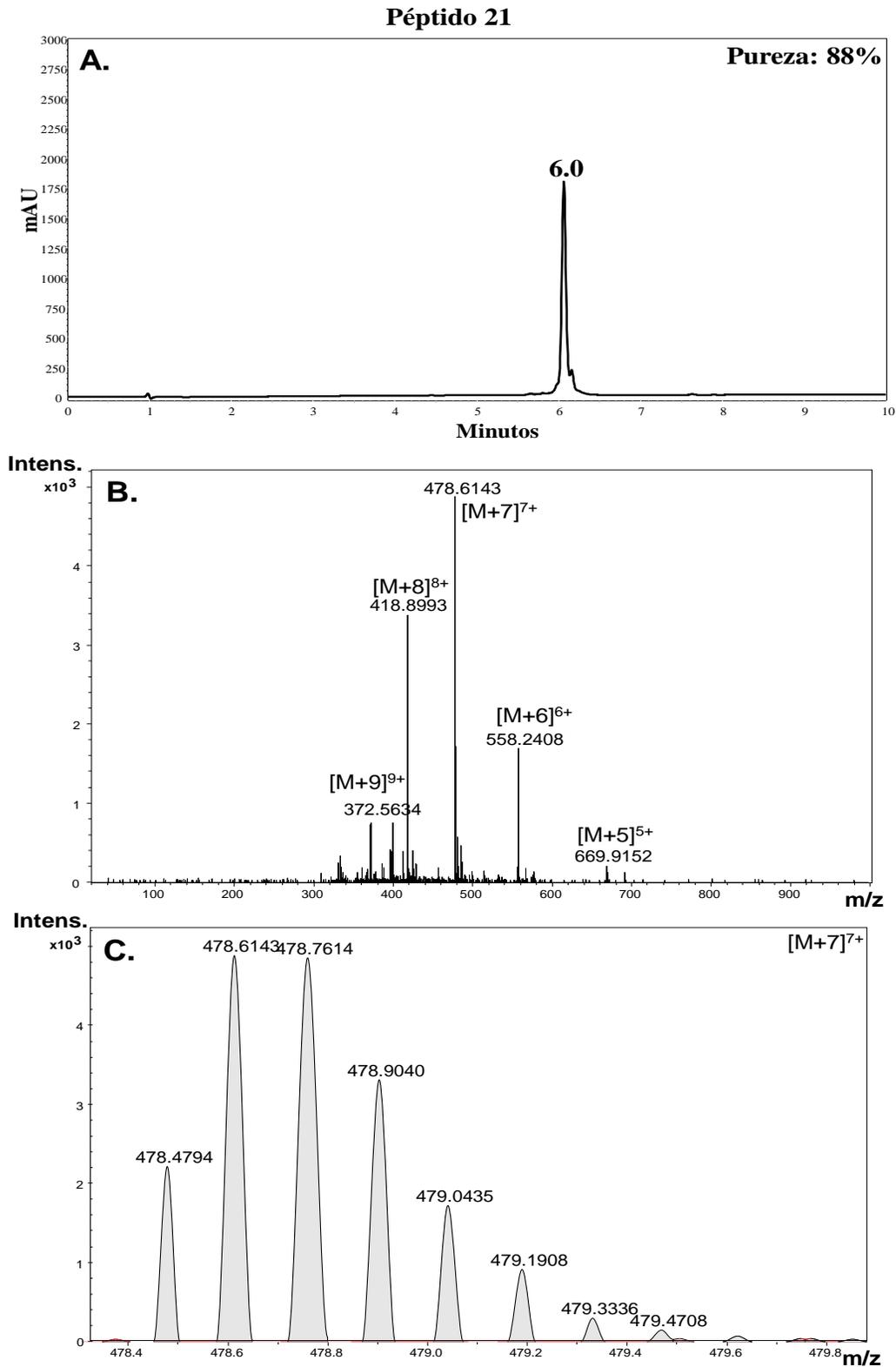


Figura A1.29. Caracterización del péptido 21 ($d^6RRWQWRFKKLG$)₂-K-Ahx (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies $[M+9]^{9+}$, $[M+8]^{8+}$, $[M+7]^{7+}$, $[M+6]^{6+}$ y $[M+5]^{5+}$; (C) Espectro ampliado para la especie $[M+7]^{7+}$.

Péptido 22

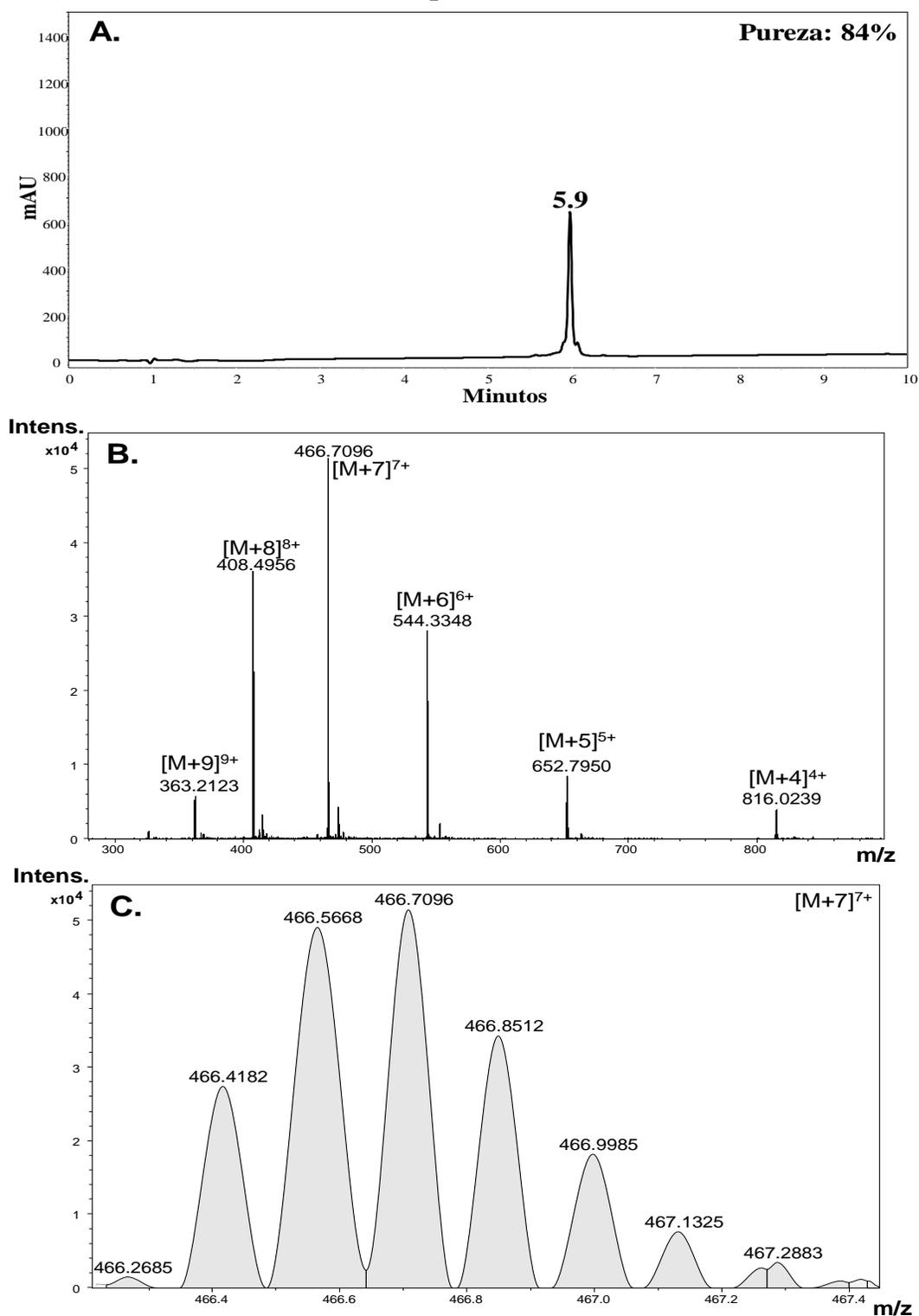


Figura A1.30. Caracterización del péptido 22 (dR -Orn-WQWRFK KLG)₂-K-Ahx (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies [M+9]⁹⁺, [M+8]⁸⁺, [M+7]⁷⁺, [M+6]⁶⁺, [M+5]⁵⁺ y [M+4]⁴⁺; (C) Espectro ampliado para la especie [M+7]⁷⁺.

Péptidos 23

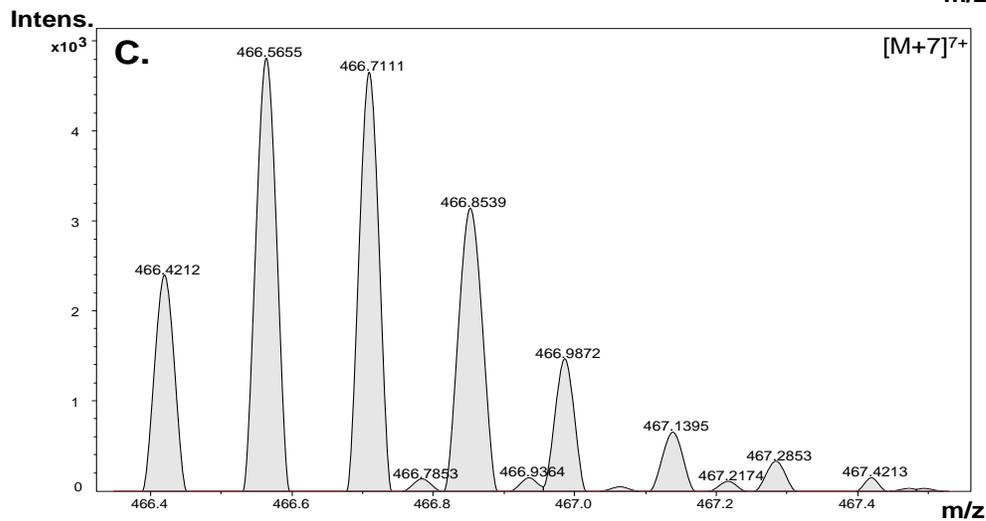
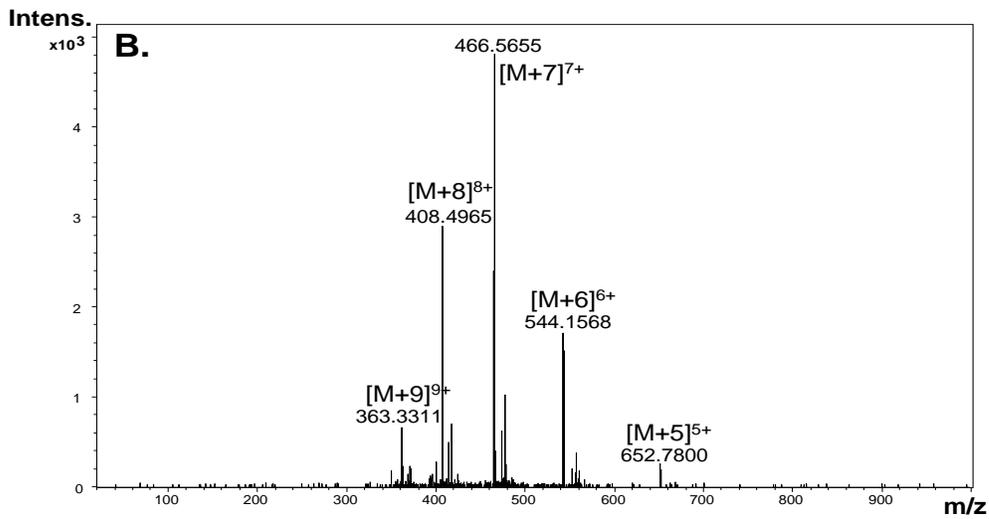
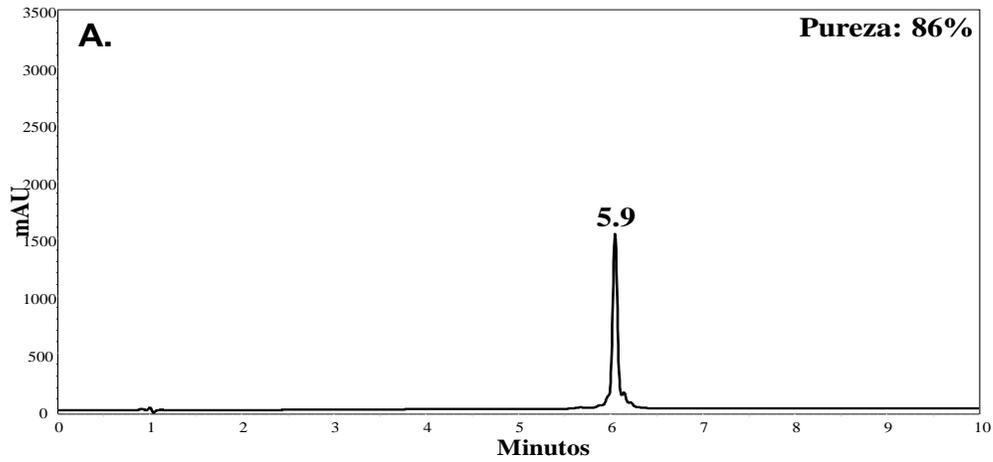


Figura A1.31. Caracterización del péptido 23 (^dRRWQW-Orn-FKKLG)₂-K-Ahx (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies [M+9]⁹⁺, [M+8]⁸⁺, [M+7]⁷⁺, [M+6]⁶⁺, [M+5]⁵⁺ y [M+4]⁴⁺; (C) Espectro ampliado para la especie [M+7]⁷⁺.

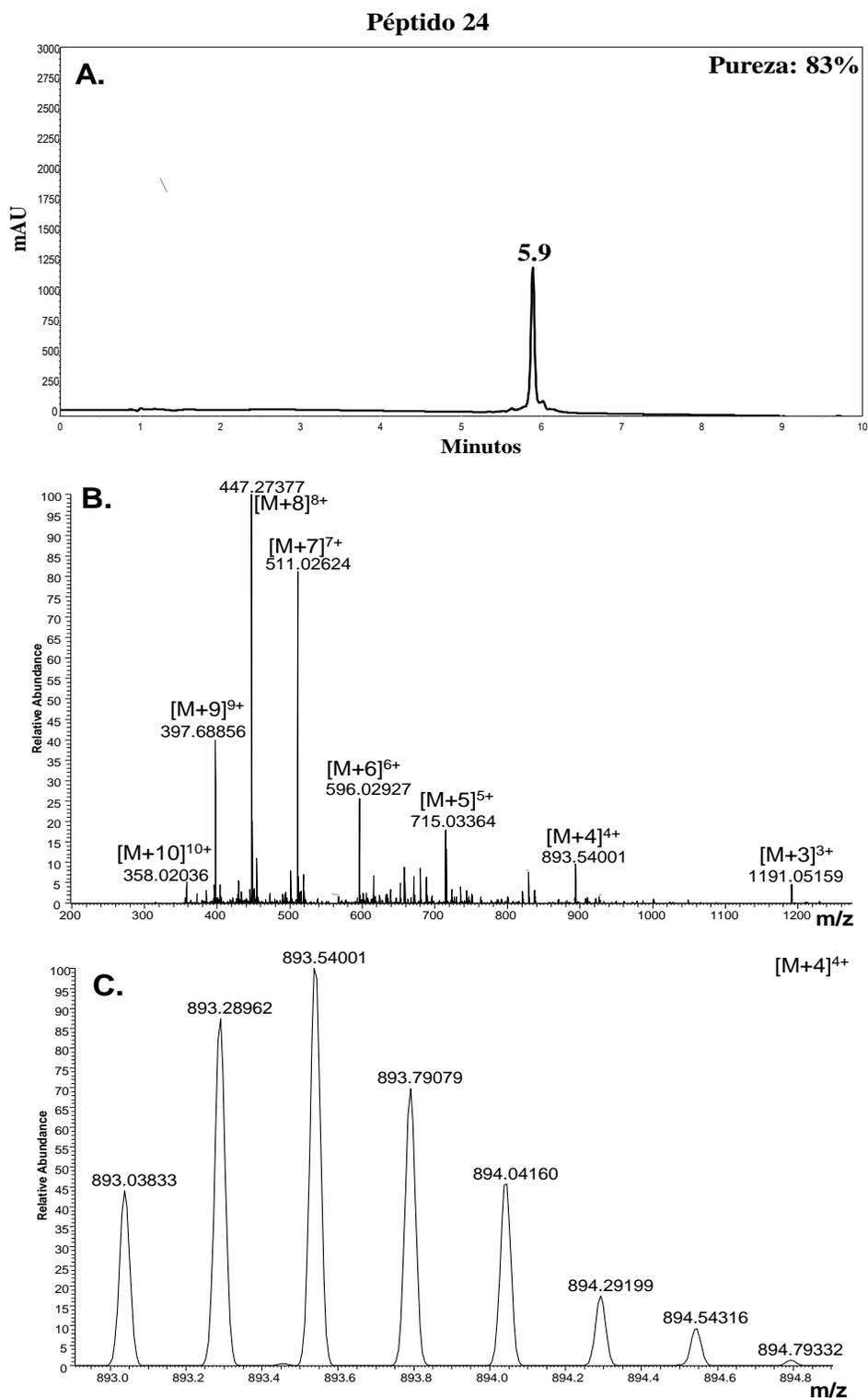


Figura A1.32. Caracterización del péptido 24 (**Ahx-RRWQWRFKKL**)₂-K-Ahx (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies [M+10]¹⁰⁺, [M+9]⁹⁺, [M+8]⁸⁺, [M+7]⁷⁺, [M+6]⁶⁺, [M+5]⁵⁺, [M+4]⁴⁺ y [M+3]³⁺; (C) Espectro ampliado para la especie [M+4]⁴⁺.

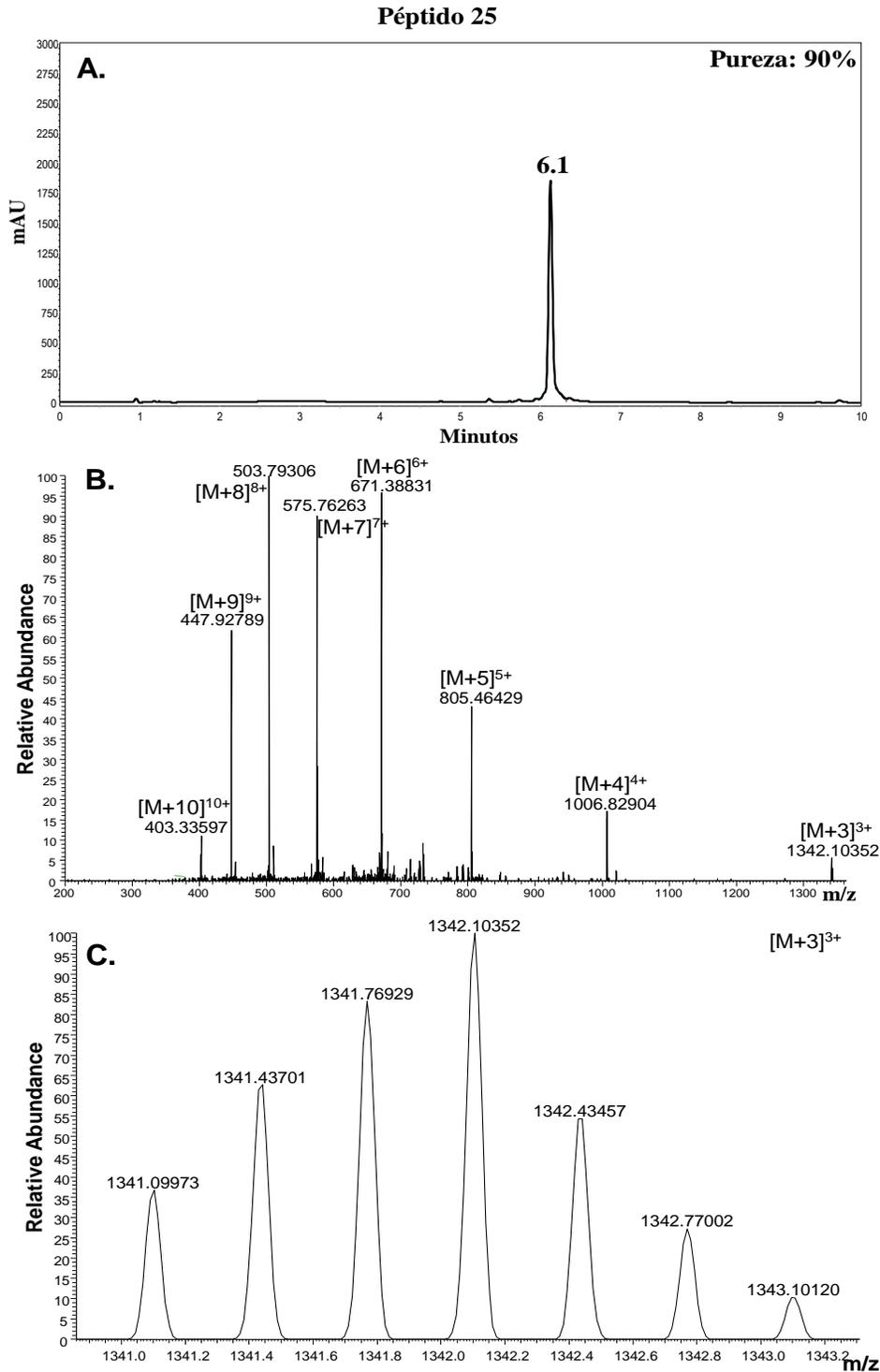


Figura A1.33. Caracterización del péptido 25 (**Biotina-Ahx-RRWQWRFKKLG**)₂-K-Ahx (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies $[M+10]^{10+}$, $[M+9]^{9+}$, $[M+8]^{8+}$, $[M+7]^{7+}$, $[M+6]^{6+}$, $[M+5]^{5+}$, $[M+4]^{4+}$ y $[M+3]^{3+}$; (C) Espectro ampliado para la especie $[M+4]^{4+}$.

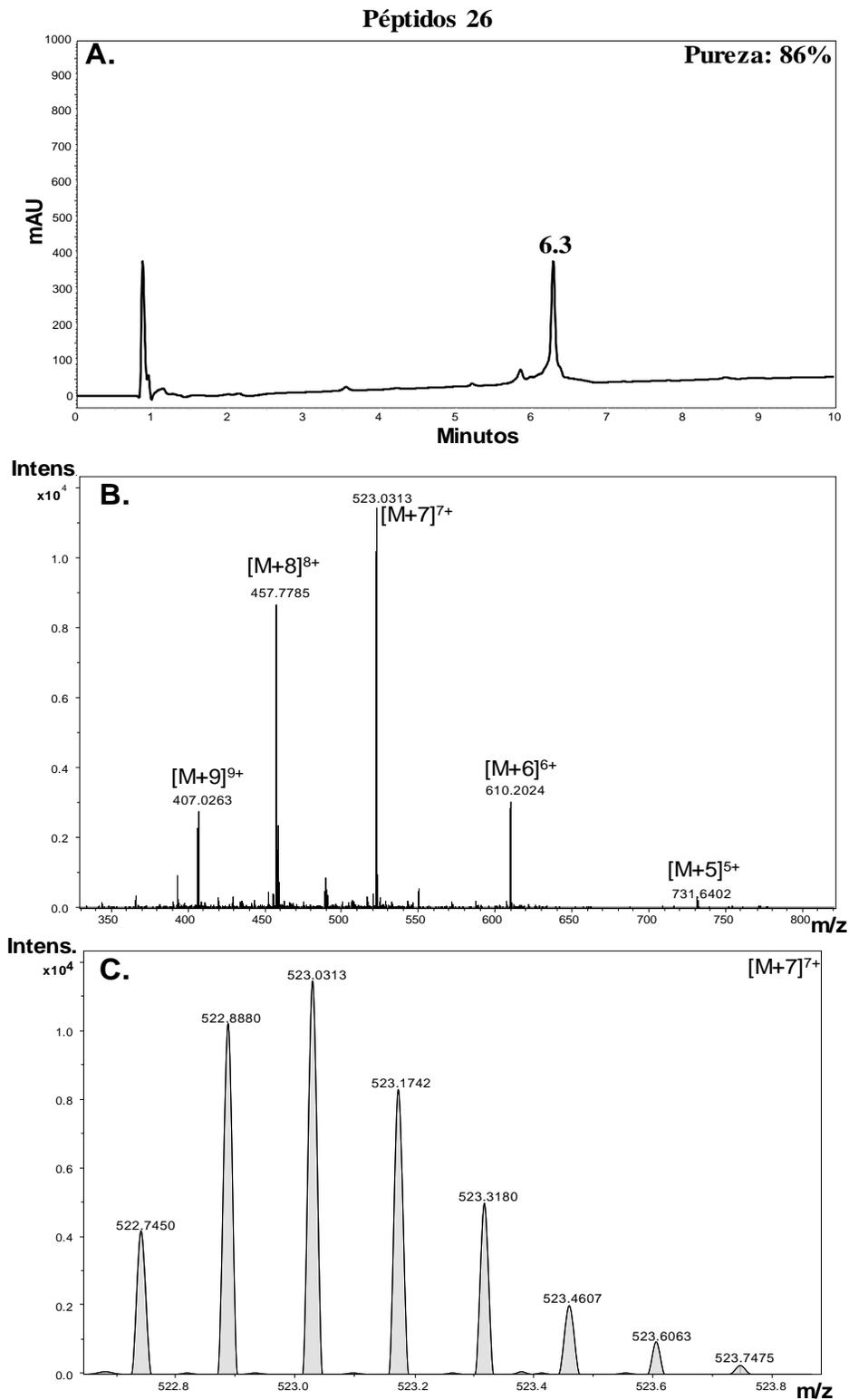


Figura A1.34. Caracterización del péptido 26 (Ac-Ahx-RRWQWRFKKLG)₂-K-Ahx-CONH₂ (A) Cromatograma; (B) Espectro de LC-MS, se observan las especies [M+9]⁹⁺, [M+8]⁸⁺, [M+7]⁷⁺, [M+6]⁶⁺, [M+5]⁵⁺, (C) Espectro ampliado para la especie [M+7]⁷⁺.

10.2 Anexo 2: Productos académicos

10.2.1 Artículos:

- **Cárdenas-Martínez KJ**, Barragán-Cárdenas AC, Rosa-Arbeláez M de la, Parra-Giraldo CM, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Meza JE, et al. Evaluating the *In Vitro* Activity and Safety of Modified LfcinB Peptides as Potential Colon Anticancer Agents: Cell Line Studies and Insect-Based Toxicity Assessments. ACS Omega. 2023.
- **Cárdenas-Martínez KJ**, Grueso-Mariaca D, Vargas-Casanova Y, Bonilla-Velásquez L, Estupiñán SM, Parra-Giraldo CM, et al. Effects of Substituting Arginine by Lysine in Bovine Lactoferricin Derived Peptides: Pursuing Production Lower Costs, Lower Hemolysis, and Sustained Antimicrobial Activity. Int J Pept Res Ther. 2021.
- Barragán-Cárdenas AC, Insuasty-Cepeda DS, **Cárdenas-Martínez KJ**, López-Meza J, Ochoa-Zarzosa A, Umaña-Pérez A, et al. LfcinB-Derived Peptides: Specific and punctual change of an-amino acid in monomeric and dimeric sequences increase selective cytotoxicity in colon cancer cell lines. Arab J Chem. 2022.
- Insuasty-Cepeda DS, Barragán-Cárdenas AC, Ardila-Chantre N, **Cárdenas-Martínez KJ**, Rincón-Quiñones I, Vargas-Casanova Y, et al. Non-natural amino acids into LfcinB-derived peptides: effect in their (i) proteolytic degradation and (ii) cytotoxic activity against cancer cells. R Soc open Sci. 2023.

10.2.2 Congresos

- **Cárdenas- Martínez KJ**, Barragán-Cárdenas AC, Parra-Giraldo CM, Fierro-Medina R, Rivera- Monroy ZJ, García- Castañeda JE. Modifications on palindromic peptide LfcinB (21-25)_{Pal} RWQWRWQWR to improve its colon cancer cytotoxic effect. ACS Fall 2023- Harnessing the power of data, 13-17 Agosto- 2023.
- **Karen J. Cárdenas- Martínez**, Andrea C. Barragán-Cárdenas, Claudia M. Parra-Giraldo, Alejandra Ochoa-Zarzosa, Joel E. Lopez-Meza, Zuly J. Rivera- Monroy,

Javier E. García- Castañeda. Arginine Modifications of Bovine Lactoferricin Peptides with Cytotoxic Effect Against Colon Cancer Cell Lines, Peptide Therapeutics Virtual Symposium, Salk Institute for Biological Sciences La Jolla, California, 21-22 Octubre-2022.

- Blanco-Medina I, Guerra-Acero-Turizo LM, **Cárdenas-Martínez KJ**, González-López NM, García-Castañeda JE, Rivera-Monroy ZJ. Evaluation of the stability and degradation profile of modified peptides derived from LfcinB, Peptide Therapeutics Virtual Symposium, Salk Institute for Biological Sciences La Jolla, California, 21-22 Octubre de 2022.
- Barragán-Cárdenas A, Insuasty-Cepeda DS, **Cárdenas-Martínez KJ**, Rivera-Monroy ZJ, García-Castañeda JE. Péptidos derivados de Lactoferricina con actividad selectiva anticancerígena de amplio espectro. 4to WorkShop Péptidos terapéuticos para bioaplicaciones, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Campus Curauma, Valparaíso. 19/11/2021. 2do Lugar en presentación de video-poster. <https://www.youtube.com/watch?v=N1PCNINwnCw>

10.2.3 Pasantías

- Pontificia Universidad Javeriana. Departamento de Microbiología, Unidad de Proteómica y Miosis Humanas, Prof. Claudia Parra-Giraldo, MSc, PhD. Enero-Agosto 2023. Bogotá- Colombia.
- Purdue University. Departamento de Química Medicinal y Farmacología Molecular. Davisson Lab. Prof. Vincent Jo. Davisson, PhD. Junio-Diciembre 2022. West Lafayette, Indiana. Estados Unidos.

11 Referencias

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 646–674 (2011).
2. Siegel Mph, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*, 17–48 (2023).
3. World Health Organization. WHO | Cancer Key statistics. <https://www.who.int/cancer/resources/keyfacts/en/> (2020).
4. Infografías cáncer en cifras INC - Instituto Nacional de Cancerología. <https://www.cancer.gov.co/portafolio-1/salud-publica/grupos/grupo-vigilancia-epidemiologica-del-cancer/infografias-cancer-cifras-inc> (2023).
5. Bonnor, R. M. & Ludwig, K. A. Laparoscopic colectomy for colon cancer: Comparable to conventional oncologic surgery? *Clin Colon Rectal Surg*, 174–181 (2005).
6. Ministerio de Salud y Protección Social. Guía de Práctica Clínica para la detección temprana, diagnóstico, tratamiento integral, seguimiento y rehabilitación del cáncer de colon y recto. gpc.mimsalud.gov.co (2017).
7. Vogel, J. D., *et al.* The American society of colon and rectal surgeons clinical practice guidelines for the treatment of colon cancer. *Dis Colon Rectum*, 999–1017 (2017).
8. Paschke, S. Value of adjuvant chemotherapy for colon and rectal cancer from a surgeon's point of view. *Practical oncology* 1–9 (2017).
9. Ramphal, W. *et al.* Oncologic outcome and recurrence rate following anastomotic leakage after curative resection for colorectal cancer. *Surg Oncol*, 730–736 (2018).
10. Ruiz-tovar, J. *et al.* De La Cirugía Colónica. *Cir Cir*, 283–291 (2010).
11. Artinyan, A. *et al.* Infectious postoperative complications decrease long-term survival in patients undergoing curative surgery for colorectal cancer: A study of 12,075 patients. *Ann Surg*, 497–505 (2015).
12. Alves Costa De Jesus, C., *et al.* Quality of life of colorectal cancer patients with intestinal stomas Quality of Life of Colorectal Cancer Patients with Intestinal Stomas. *J Carcinog Mutagen* (2014).
13. Hilchie, A. L. *et al.* Pleurocidin-family cationic antimicrobial peptides are cytolytic for breast carcinoma cells and prevent growth of tumor xenografts. *Breast Cancer Research*, 1–16 (2011).
14. Felício, M. R., *et al.* Peptides with dual antimicrobial and anticancer activities. *Front Chem*, 1–9 (2017).
15. Marqus, S., Pirogova, E, Piva, T. J. Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *J Biomed Sci*, (2017).

16. Roudi, R., Syn, N. L, Roudbary, M. Antimicrobial peptides as biologic and immunotherapeutic agents against cancer: A comprehensive overview. *Frontiers in Immunology* (2017).
17. Hao, Y. *et al.* A review of the design and modification of lactoferricins and their derivatives. *BioMetals*, 331–341 (2018).
18. Mader, J. S., Salsman, J., Conrad, D. M, Hoskin, D. W. Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther*, 612–624 (2005).
19. Gibbons, J., Kanwar, R, Kanwar Jagat. Lactoferrin and Cancer in Different Cancer Models. *Front Biosci* 1080–1088 (2011).
20. Insuasty-Cepeda, D. S. *et al.* Peptides Derived from (RRWQWRMKKLG)₂-K-Ahx Induce Selective Cellular Death in Breast Cancer Cell Lines through Apoptotic Pathway. *Int J Mol Sci*, 4550 (2020).
21. Vargas Casanova, Y. *et al.* Antibacterial Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Cytotoxic Effect against MDA-MB-468 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines. *Molecules*, 1–11 (2017).
22. Barragán-Cárdenas, A. *et al.* Selective cytotoxic effect against the MDA-MB-468 breast cancer cell line of the antibacterial palindromic peptide derived from bovine lactoferricin. *RSC Adv*, 17593–17601 (2020).
23. Richardson, A., *et al.* Intracellular delivery of bovine lactoferricin's antimicrobial core (RRWQWR) kills T-leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 736–741 (2009).
24. Guerra, J. R. *et al.* The tetrameric peptide LfcinB (20-25)₄ derived from bovine lactoferricin induces apoptosis in the MCF-7 breast cancer cell line. *RSC Adv*, 20497–20504 (2019).
25. Solarte, V. A. *et al.* A tetrameric peptide derived from bovine lactoferricin as a potential therapeutic tool for oral squamous cell carcinoma: A preclinical model. *PLoS One*, (2017).
26. World Health Organization GLOBOCAN. Cancer Today 2020. <https://gco.iarc.fr/today/> (2020).
27. Galán, E. F., *et al.* *Manual Para La Detección Temprana Del Cáncer de Colon y Recto.* (2015).
28. Labianca, R. *et al.* Colon cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* vol. 74 106–133 (2010).
29. Testa, U., Pelosi, E., Castelli, G. Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells. *Medical Sciences*, 31 (2018).
30. Fearon, E. R., Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* vol. 61 759–767 (1990).
31. Kim, S. H. *et al.* Tropism between hepatic and pulmonary metastases in colorectal cancers. *Oncol Rep*, 459–464 (2012).

32. Ghidini, M., Petrelli, F, Tomasello, G. Right Versus Left Colon Cancer: Resectable and Metastatic Disease. *Current Treatment Options in Oncology* (2018).
33. Rawla, P., Sunkara, T., Barsouk, A. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Przegląd Gastroenterologiczny* vol. 14 89–103 (2019).
34. Stidham, R. W., Higgins, P. D. R. Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Clin Colon Rectal Surg*, 168–178 (2018).
35. Galiano de Sánchez, M. T. Cáncer colorrectal (CCR). *Revista Colombia de Gastroenterología*, (2005).
36. Hamel, J. F. *et al.* Comparison of treatment to improve gastrointestinal functions after colorectal surgery within enhanced recovery programmes: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports 2021 11:1*, 1–12 (2021).
37. Banaszkiwicz, Z. *et al.* Intestinal stoma in patients with colorectal cancer from the perspective of 20-year period of clinical observation. *Prz Gastroenterol*, 23 (2015).
38. Silva, N. M., *et al.* Psychological aspects of patients with intestinal stoma: integrative review 1. *Rev Lat Am Enfermagem*, 2950 (2017).
39. McKenzie, F. *et al.* Psychological impact of colostomy pouch change and disposal. *Br J Nurs*, 308–316 (2006).
40. Brown, S. R. *et al.* The Impact of Postoperative Complications on Long-term Quality of Life After Curative Colorectal Cancer Surgery. *Ann Surg*, 916–923 (2014).
41. Alty, I. G. *et al.* Refusal of surgery for colon cancer: Sociodemographic disparities and survival implications among US patients with resectable disease. *The American Journal of Surgery*, 39–45 (2021).
42. Benson, A. B. *et al.* NCCN Guidelines Version 2.2021 Colon Cancer NCCN Framework TM : Basic Resources Continue NCCN Guidelines Panel Disclosures. (2021).
43. Aparicio, T. Oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *Colon and Rectum*, 33–35 (2011).
44. Yamazaki, K. *et al.* Randomized phase III study of bevacizumab plus FOLFIRI and bevacizumab plus mFOLFOX6 as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (WJOG4407G). *Annals of Oncology*, 1539–1546 (2016).
45. Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 330–338 (2003).
46. Walko, C. M. & Lindley, C. Capecitabine: A review. *Clin Ther*, 23–44 (2005).
47. Alcindor, T. & Beauger, N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current Oncology*, 18 (2011).
48. Kciuk, M., Marciniak, B., Kontek, R. Irinotecan—Still an Important Player in Cancer Chemotherapy: A Comprehensive Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 4919 (2020).

49. De Rosa, M. *et al.* The biological complexity of colorectal cancer: Insights into biomarkers for early detection and personalized care. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 861–886 (2016).
50. Kazazi-Hyseni, F., Beijnen, J. H. & Schellens, J. H. M. Bevacizumab. *Oncologist*, 819 (2010).
51. Kronfol, M. M. & McClay, J. L. Epigenetic biomarkers in personalized medicine. *Prognostic Epigenetics* 375–395 (2019).
52. Nguyen, C. M. & Jacob, S. E. Pembrolizumab. *J Dermatol Nurses Assoc*, 95–97 (2017).
53. Carrera, P. M., Kantarjian, H. M. & Blinder, V. S. The financial burden and distress of patients with cancer: Understanding and stepping-up action on the financial toxicity of cancer treatment. *CA Cancer J Clin*, 153–165 (2018).
54. Siddiqui, M. & Rajkumar, S. V. The High Cost of Cancer Drugs and What We Can Do About It. *JMCP*, 935–943 (2012).
55. Kunnumakkara, A. B. *et al.* Cancer drug development: The missing links. *Experimental Biology and Medicine*, 663–689 (2019).
56. Coebergh van den Braak, R. R. J. *et al.* Interconnectivity between molecular subtypes and tumor stage in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 1–7 (2020).
57. Ronen, J., Hayat, S. & Akalin, A. Methods Evaluation of colorectal cancer subtypes and cell lines using deep learning (2019).
58. Menter, D. G. *et al.* Back to the Colorectal Cancer Consensus Molecular Subtype Future. *Curr Gastroenterol Rep*, 5 (2019).
59. Guinney, J. *et al.* The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*, 1350–1356 (2015).
60. Okita, A. *et al.* Consensus molecular subtypes classification of colorectal cancer as a predictive factor for chemotherapeutic efficacy against metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*, 18698 (2018).
61. Baker, S. *et al.* Cancer Hallmarks Analytics Tool (CHAT): A text mining approach to organize and evaluate scientific literature on cancer. *Bioinformatics*, 3973–3981 (2017).
62. Paul, D. The systemic hallmarks of cancer. *J Cancer Metastasis Treat*, (2020).
63. Alves, A. C., Ribeiro, D., Nunes, C. & Reis, S. Biophysics in cancer: The relevance of drug-membrane interaction studies. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 2231–2244 (2016).
64. Sherbet, G. V. Membrane Fluidity and Cancer Metastasis. *Pathobiology*, 198–205 (1989).
65. Chiangjong, W., Chutipongtanate, S. & Hongeng, S. Anticancer peptide: Physicochemical property, functional aspect and trend in clinical application (Review). *International Journal of Oncology* vol, 678–696 (2020).
66. Bhatia, R. *et al.* Cancer-associated mucins: role in immune modulation and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 223–236 (2019).

67. Ren, J. *et al.* Correlation between the Presence of Microvilli and the Growth or Metastatic Potential of Tumor Cells. *Japanese Journal of Cancer Research*, 920–926 (1990).
68. Butler, L. M. *et al.* Lipids and cancer: Emerging roles in pathogenesis, diagnosis and therapeutic intervention. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 245–293 (2020).
69. Yang, M. & Brackenbury, W. J. Membrane potential and cancer progression. *Frontiers in Physiology* (2013).
70. Baba, A. I. & Câtoi, C. Tumor cell morphology. (2007).
71. Fischer, E. G. Nuclear Morphology and the Biology of Cancer Cells. *Acta Cytol*, 511–519 (2020).
72. Thiran, J. P., Macq, B., Mairesse, J. Morphological classification of cancerous cells. *Proceedings - International Conference on Image Processing*, 706–710 (1994).
73. Hilchie, A. L., Hoskin, D. W, Power Coombs, M. R. Anticancer activities of natural and synthetic peptides. in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 131–147 (2019).
74. Xie, M., Liu, D., Yang, Y. Anti-cancer peptides: Classification, mechanism of action, reconstruction and modification: Anticancer peptides. *Open Biology* (2020).
75. Qin, Y. *et al.* From Antimicrobial to Anticancer Peptides: The Transformation of Peptides. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 70–84 (2019).
76. Camilio, K. A., Rekdal, Ø., Sveinbjörnsson, B. LTX-315 (Oncopore™): A short synthetic anticancer peptide and novel immunotherapeutic agent. *Oncoimmunology*, (2014).
77. Stangelberger, A., Schally, A. V., Djavan, B. New Treatment Approaches for Prostate Cancer Based on Peptide Analogues. *European Urology*, 890–900 (2008).
78. Garton, M. *et al.* Method to generate highly stable D-amino acid analogs of bioactive helical peptides using a mirror image of the entire PDB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1505–1510 (2018).
79. Gentilucci, L., De Marco, R., Cerisoli, L. Chemical Modifications Designed to Improve Peptide Stability: Incorporation of Non-Natural Amino Acids, Pseudo-Peptide Bonds, and Cyclization. *Curr Pharm Des*, 3185–3203 (2010).
80. Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J., Khrestchatisky, M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today* vol. 15 40–56 (2010).
81. Otvos, L. & Wade, J. D. Current challenges in peptide-based drug discovery. *Front Chem*, (2014).
82. D’Arcy, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*, 582–592 (2019).
83. Sancho-Martínez, S. M *et al.* Necrotic Concentrations of Cisplatin Activate the Apoptotic Machinery but Inhibit Effector Caspases and Interfere with the Execution of Apoptosis. *Toxicological Sciences*, 73–85 (2011).
84. Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., Lowe, S. W. Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell*, 153–164 (2002).

85. Hoskin, D. W. & Ramamoorthy, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 357–375 (2008).
86. Papo, N. & Shai, Y. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 784–790 (2005).
87. Zhou, X. R. *et al.* From a pro-apoptotic peptide to a lytic peptide: One single residue mutation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1914–1925 (2016).
88. Arias, M. *et al.* Selective anticancer activity of synthetic peptides derived from the host defence peptide tritrpticin. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, (2020).
89. Kashyap, D., Garg, V. K., Goel, N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 73–120 (2021).
90. Min, K. A., Maharjan, P., Ham, S., Shin, M. C. Pro-apoptotic peptides-based cancer therapies: challenges and strategies to enhance therapeutic efficacy. *Arch Pharm Res*, 594–616 (2018).
91. Faraji, N., Arab, S. S., Doustmohammadi, A., Daly, N. L., Khosroushahi, A. Y. ApInAPDB: a database of apoptosis-inducing anticancer peptides. *Scientific Reports 2022*, 1–7 (2022).
92. Wang, H. *et al.* Antimicrobial Peptides Mediate Apoptosis by Changing Mitochondrial Membrane Permeability. *Int J Mol Sci*, (2022).
93. Zong, W. X. & Thompson, C. B. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev*, 1–15 (2006).
94. Kim, J. J. Y. *et al.* Necrosis-inducing peptide has the beneficial effect on killing tumor cells through neuropilin (NRP-1) targeting. *Oncotarget*, 32449 (2016).
95. Lu, Y. *et al.* PFR peptide, one of the antimicrobial peptides identified from the derivatives of lactoferrin, induces necrosis in leukemia cells. *Scientific Reports 2016*, 1–12 (2016).
96. Do, T. N. *et al.* Preferential induction of necrosis in human breast cancer cells by a p53 peptide derived from the MDM2 binding site. *Oncogene 2003*, 1431–1444 (2003).
97. Qiu, Y. *et al.* Cell-penetrating peptides induce apoptosis and necrosis through specific mechanism and cause impairment of Na⁺–K⁺-ATPase and mitochondria. *Amino Acids*, 75–88 (2017).
98. Decraene, B. *et al.* Immunogenic cell death and its therapeutic or prognostic potential in high-grade glioma. *Genes & Immunity*, 1–11 (2022).
99. Zhou, J. *et al.* Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers. *J Cell Mol Med*, 4854 (2019).
100. Aria, H., Rezaei, M. Immunogenic cell death inducer peptides: A new approach for cancer therapy, current status and future perspectives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 114503 (2023).
101. Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. , White, E. Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 961–967 (2007).

102. Tiliya Pun, N., Jang, W. J. & Jeong, C. H. Role of autophagy in regulation of cancer cell death/apoptosis during anti-cancer therapy: focus on autophagy flux blockade. *Arch Pharm Res*, 475–488 (2020).
103. Thorburn, A., Thamm, D. H. & Gustafson, D. L. Autophagy and Cancer Therapy. *Mol Pharmacol*, 830 (2014).
104. Ren, S. X. *et al.* FK-16 Derived from the Anticancer Peptide LL-37 Induces Caspase-Independent Apoptosis and Autophagic Cell Death in Colon Cancer Cells. *PLoS One* (2013).
105. Shoji-Kawata, S. *et al.* Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature*, 201–206 (2013).
106. Pan, W. R. *et al.* Bovine lactoferricin B induces apoptosis of human gastric cancer cell line AGS by inhibition of autophagy at a late stage. *J Dairy Sci*, 7511–7520 (2013).
107. Tomita, M. *et al.* Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie*, 52–57 (2009).
108. Cutone, A. *et al.* Lactoferrin's anti-cancer properties: Safety, selectivity, and wide range of action. *Biomolecules* vol. 10, (2020).
109. Tsuda, H., Sekine, K., Fujita, K. I., Iigo, M. Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms - A review of experimental and clinical studies. in *Biochemistry and Cell Biology*, 131–136 (2002).
110. Iigo, M. *et al.* Inhibition of intestinal polyp growth by oral ingestion of bovine lactoferrin and immune cells in the large intestine. *BioMetals*, 1017–1029 (2014).
111. Cutone, A. *et al.* Lactoferrin in the Prevention and Treatment of Intestinal Inflammatory Pathologies Associated with Colorectal Cancer Development. *Cancers (Basel)*, 3806 (2020).
112. Tanaka, H. *et al.* Effects of oral bovine lactoferrin on a mouse model of inflammation associated colon cancer. *Biochemistry and Cell Biology*, 1–7 (2020).
113. Giansanti, F., Panella, G., Leboffe, L., Antonini, G. Lactoferrin from Milk: Nutraceutical and Pharmacological Properties. *Pharmaceuticals*, 61 (2016).
114. Arias, M. *et al.* Anticancer activities of bovine and human lactoferricin-derived peptides1. in *Biochemistry and Cell Biology*, 91–98 (2017).
115. Sadiq, I. Z., Babagana, K., Danlami, D., Abdullahi, L. I., Khan, A. R. Molecular Therapeutic Cancer Peptides: A Closer Look at Bovine Lactoferricin. *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, 1–9 (2018).
116. Zhou, N., Tieleman, D. P., Vogel, H. J. Molecular dynamics simulations of bovine lactoferricin: turning a helix into a sheet. *Biomaterials*, 217–223 (2004).
117. Huertas, N., *et al.* Antimicrobial Activity of Truncated and Polyvalent Peptides Derived from the FKCRQWQWRMCKGLA Sequence against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Molecules*, 987 (2017).

118. Tolokh, I. S., *et al.*. Binding free energy and counterion release for adsorption of the antimicrobial peptide lactoferricin B on a POPG membrane. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, (2009).
119. Rahman, R. *et al.* Inhibition of breast cancer xenografts in a mouse model and the induction of apoptosis in multiple breast cancer cell lines by lactoferricin B peptide. *J Cell Mol Med*, 7181–7189 (2021).
120. Furlong, S. J., Mader, J. S., Hoskin, D. W. Lactoferricin-induced apoptosis in estrogen-nonresponsive MDA-MB-435 breast cancer cells is enhanced by C6 ceramide or tamoxifen. *Oncol Rep*, 1385–1390 (2006).
121. Muj, C., Mukhopadhyay, S., Jana, P., Kondapi, A. K. Synergistic action of lactoferrin in enhancing the safety and effectiveness of docetaxel treatment against prostate cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 375–387 (2023).
122. Guedes, J. P., Pereira, C. S., Rodrigues, L. R., Côrte-Real, M. Bovine milk lactoferrin selectively kills highly metastatic prostate cancer PC-3 and osteosarcoma MG-63 cells in vitro. *Front Oncol*, 355424 (2018).
123. Tone Eliassen, L. *et al.* Evidence for a direct antitumor mechanism of action of bovine lactoferricin. *Anticancer Res*, 2703–2710 (2002).
124. Mistry, N. *et al.* The anti-papillomavirus activity of human and bovine lactoferricin. *Antiviral Res*, 258–265 (2007).
125. Jiang, R. & Lönnerdal, B. Bovine lactoferrin and lactoferricin exert antitumor activities on human colorectal cancer cells (HT-29) by activating various signaling pathways1. in *Biochemistry and Cell Biology*, 99–109 (2017).
126. Freiburghaus, C., Janicke, B., Lindmark-Månsson, H., Oredsson, S. M. & Paulsson, M. A. Lactoferricin treatment decreases the rate of cell proliferation of a human colon cancer cell line. *J Dairy Sci*, 2477–2484 (2009).
127. Freiburghaus, C., Lindmark-Månsson, H., Paulsson, M. & Oredsson, S. Reduction of ultraviolet light-induced DNA damage in human colon cancer cells treated with a lactoferrin-derived peptide. *J Dairy Sci*, 5552–5560 (2012).
128. Spicer, J. *et al.* Safety, anti-tumor activity and T-cell responses in a dose-ranging phase 1 trial of the oncolytic peptide LTX-315 in patients with solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 3435 (2021).
129. Tomita, M., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Hayasawa, H. Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: Production and applications. in *Biochemistry and Cell Biology*, 109–112 (2002).
130. Agouridas, V. *et al.* Native Chemical Ligation and Extended Methods: Mechanisms, Catalysis, Scope, and Limitations. *Chemical Reviews* (2019).
131. Jensen, K. J. Solid-phase peptide synthesis: An introduction. *Methods in Molecular Biology*, 1–21 (2013).

132. Kato, H., Hayashi, M., Fukumori, Y., Kaneko, H. MHC restriction in contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide. *Food and Chemical Toxicology*, 1713–1718 (2002).
133. Graham, J. C. *et al.* An Evaluation of the Occupational Health Hazards of Peptide Couplers. *Chem Res Toxicol*, 1011–1022 (2022).
134. Navarrete, E. L. Síntesis de péptidos. *Universidad nacional autonoma de méxico, Instituto de Biotecnología*, 1–53 (2007).
135. Manne, S. R. *et al.* Understanding OxymaPure as a Peptide Coupling Additive: A Guide to New Oxyma Derivatives. *ACS Omega*, 6007–6023 (2022).
136. Román Bothia, J. T. Implementación y optimización del proceso sintético de i) complejos aminoácido - estaño IV y ii) péptidos conjugados con Ferroceno, como contribución al desarrollo de fármacos basados en moléculas Organometálicas. (Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2020).
137. Vrettos, E. I. *et al.* Unveiling and tackling guanidinium peptide coupling reagent side reactions towards the development of peptide-drug conjugates. *RSC Adv*, 50519–50526 (2017).
138. Luna, O. F. *et al.* Deprotection Reagents in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: Moving Away from Piperidine? *Molecules*, (2016).
139. Fields, G. B. Methods for Removing the Fmoc Group. *Peptide Synthesis Protocols* 17–27 (1994).
140. Suzuki, R. & Konno, H. Stain Protocol for the Detection of N-Terminal Amino Groups during Solid-Phase Peptide Synthesis. *ACS Appl Mater Interfaces* (2020).
141. Yemm, E. W., Cocking, E. C., Ricketts, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*, 209–214 (1955).
142. Pedersen, S. L., Jensen, K. J. Peptide release, side-chain deprotection, work-up, and isolation. *Methods Mol Biol*, 43–63 (2013).
143. Craik, D. J. & Kan, M. W. How can we improve peptide drug discovery? Learning from the past, 1399–1402 (2021).
144. Muttenthaler, M., King, G. F., Adams, D. J. & Alewood, P. F. Trends in peptide drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 309–325 (2021).
145. Henninot, A., Collins, J. C. & Nuss, J. M. The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? *Journal of Medicinal Chemistry* vol. 61, 1382–1414 (2018).
146. Timur, S. S. & Gürsoy, R. N. The role of peptide-based therapeutics in oncotherapy. *J Drug Target*, 1048–1062 (2021).
147. McErlean, E. M. *et al.* Rational design and characterisation of a linear cell penetrating peptide for non-viral gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 1288–1299 (2021).
148. Pappa, E. V. *et al.* Structure–activity studies of IGnRH-III through rational amino acid substitution and NMR conformational studies. *Peptide Science*, 525–534 (2012).

149. Kumar, A. *et al.* Single Amino Acid Substitutions at Specific Positions of the Heptad Repeat Sequence of Piscidin-1 Yielded Novel Analogs That Show Low Cytotoxicity and In Vitro and In Vivo Antiendotoxin Activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 3687 (2016).
150. Irazazabal, L. N. *et al.* Selective amino acid substitution reduces cytotoxicity of the antimicrobial peptide mastoparan. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2699–2708 (2016).
151. Schmidt, S. *et al.* Identification of Short Hydrophobic Cell-Penetrating Peptides for Cytosolic Peptide Delivery by Rational Design. *Bioconjug Chem*, 382–389 (2017).
152. Räder, A. F. B. *et al.* Orally Active Peptides: Is There a Magic Bullet? *Angewandte Chemie International Edition*, 14414–14438 (2018).
153. Hicks, R. P. Antibacterial and anticancer activity of a series of novel peptides incorporating cyclic tetra-substituted C(α) amino acids. *Bioorg Med Chem*, 4056–4065 (2016).
154. Scorciapino, M. A., Serra, I., Manzo, G. & Rinaldi, A. C. Antimicrobial dendrimeric peptides: Structure, activity and new therapeutic applications. *Int J Mol Sci*, (2017).
155. Liu, S. P., Zhou, L., Lakshminarayanan, R. & Beuerman, R. W. Multivalent antimicrobial peptides as therapeutics: Design principles and structural diversities. in *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 199–213 (2010).
156. Lorenzon, E. N., Piccoli, J. P., Santos-Filho, N. A. & Cilli, E. M. Dimerization of Antimicrobial Peptides: A Promising Strategy to Enhance Antimicrobial Peptide Activity. *Protein Pept Lett*, 98–107 (2019).
157. Zhong, J. & Chau, Y. Synthesis, characterization, and thermodynamic study of a polyvalent lytic peptide-polymer conjugate as novel anticancer agent. *Bioconjug Chem*, 2055–2064 (2010).
158. Gunasekera, S., Muhammad, T., Strömstedt, A. A., Rosengren, K. J. & Göransson, U. Backbone Cyclization and Dimerization of LL-37-Derived Peptides Enhance Antimicrobial Activity and Proteolytic Stability. *Front Microbiol*, 1–15 (2020).
159. Tam, J. P. & Zavala, F. Multiple antigen peptide. A novel approach to increase detection sensitivity of synthetic peptides in solid-phase immunoassays. *J Immunol Methods*, 53–61 (1989).
160. Bondaryk, M., Staniszevska, M., Zielińska, P. & Urbańczyk-Lipkowska, Z. Natural antimicrobial peptides as inspiration for design of a new generation antifungal compounds. *Journal of Fungi* (2017).
161. Galati, R., Verdina, A., Falasca, G. & Chersi, A. Increased resistance of peptides to serum proteases by modification of their amino groups. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 558–561 (2003).
162. Arispe, N., Carlos Diaz, J. & Flora, M. Efficiency of Histidine-Associating Compounds for Blocking the Alzheimer's Ab Channel Activity and Cytotoxicity. *Biophys J*, (2008).
163. Feng, Z. & Xu, B. Inspiration from the mirror: D-amino acid containing peptides in biomedical approaches. *Biomolecular Concepts*, 179–187 (2016).

164. Oliva, R. *et al.* Exploring the role of unnatural amino acids in antimicrobial peptides. *Sci Rep*, 8888 (2018).
165. Cardoso, M. H., Cândido, E. S., Oshiro, K. G. N., Rezende, S. B. & Franco, O. L. Peptides containing D-amino acids and retro-inverso peptides: General applications and special focus on antimicrobial peptides. in *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*, 131–155 (2018).
166. Aghamiri, S. *et al.* Antimicrobial peptides as potential therapeutics for breast cancer. *Pharmacol Res*, 105777 (2021).
167. Gan, B. H., Gaynord, J., Rowe, S. M., Deingruber, T., Spring, D. R. The multifaceted nature of antimicrobial peptides: current synthetic chemistry approaches and future directions. *Chem Soc Rev*, 7820–7880 (2021).
168. Kowalczyk, R., Harris, P. W. R., Williams, G. M., Yang, S. H. & Brimble, M. A. Peptide lipidation - A synthetic strategy to afford peptide based therapeutics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 185–227 (2017).
169. Albada, B. Tuning Activity of Antimicrobial Peptides by Lipidation. *Health Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids*, 317–334 (2018).
170. Morstein, J. *et al.* Medium-Chain Lipid Conjugation Facilitates Cell-Permeability and Bioactivity. *J Am Chem Soc*, 18532–18544 (2022).
171. Wang, D. *et al.* Anticancer Properties of Lipidated Peptide Drug Supramolecular Self-Assemblies with Enhanced Stability. *ACS Appl Bio Mater*, 5995–6003 (2019).
172. Menacho-Melgar, R., Decker, J. S., Hennigan, J. N. & Lynch, M. D. A review of lipidation in the development of advanced protein and peptide therapeutics. *Journal of Controlled Release*, 1–12 (2019).
173. Wang, Y. *et al.* The molecular basis for the prolonged blood circulation of lipidated incretin peptides: Peptide oligomerization or binding to serum albumin? *J Control Release*, 25–33 (2016).
174. Zhang, X. *et al.* A Lipidated Peptide with Mitochondrial Membrane Localization in Human A549 Lung Cells: From Enhanced Cell-Penetrating Properties to Biological Activity Mechanism. *ACS Appl Bio Mater*, 8277–8290 (2021).
175. Bech, E. M., Pedersen, S. L. & Jensen, K. J. Chemical Strategies for Half-Life Extension of Biopharmaceuticals: Lipidation and Its Alternatives. *ACS Med Chem Lett*, 577–580 (2018).
176. Milton Harris, J. & Chess, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery*, 214–221 (2003).
177. Porfiryeva, N. N., Moustafine, R. I. & Khutoryanskiy, V. V. PEGylated Systems in Pharmaceuticals. *Polymer Science - Series C*, 62–74 (2020).
178. Maiti, S. & Paira, P. Biotin conjugated organic molecules and proteins for cancer therapy: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 206–223 (2018).

179. Zempleni, J., Hassan, Y. I. & Wijeratne, S. S. K. Biotin and biotinidase deficiency. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 715–724 (2008).
180. Yang, W., Cheng, Y., Xu, T., Wang, X. & Wen, L. ping. Targeting cancer cells with biotin-dendrimer conjugates. *Eur J Med Chem*, 862–868 (2009).
181. Lee, H. S. *et al.* Mechanism of anticancer activity of buforin IIb, a histone H2A-derived peptide. *Cancer Lett*, 47–55 (2008).
182. Ren, W. X. *et al.* Recent development of biotin conjugation in biological imaging, sensing, and target delivery. *Chemical Communications*, 10403–10418 (2015).
183. Eliassen, L. T., Haug, B. E., Berge, G. & Rekdal, Ø. Enhanced antitumour activity of 15-residue bovine lactoferricin derivatives containing bulky aromatic amino acids and lipophilic N-terminal modifications. *J Pept Sci*, 510–517 (2003).
184. Svendsen, J. S. M., Grant, T. M., Rennison, D., Brimble, M. A. & Svenson, J. Very Short and Stable Lactoferricin-Derived Antimicrobial Peptides: Design Principles and Potential Uses. *Acc Chem Res*, 749–759 (2019).
185. Vogel, H. J. *et al.* Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides, 49–63 (2011).
186. Arias, M., Piga, K. B., Hyndman, M. E. & Vogel, H. J. Improving the activity of trp-rich antimicrobial peptides by Arg/Lys substitutions and changing the length of cationic residues. *Biomolecules* (2018).
187. Madorran, E., Stožer, A., Bevc, S. & Maver, U. In vitro toxicity model: Upgrades to bridge the gap between preclinical and clinical research. *Bosn J Basic Med Sci*, 157 (2020).
188. Van Norman, G. A. Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: Part 2: Potential Alternatives to the Use of Animals in Preclinical Trials. *JACC Basic Transl Sci*, 387 (2020).
189. HT-29 - HTB-38 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/htb-38>.
190. Kleiveland, C. *et al.* The Impact of Food Bioactives on Health *In Vitro* and *Ex Vivo* Models. Chapter 11; HT29 Cell line.
191. Caco-2 [Caco2] - HTB-37 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/htb-37>.
192. Kleiveland, C. *et al.* The Impact of Food Bioactives on Health *In Vitro* and *Ex Vivo* Models. Chapter 10: Caco-2 Cell line.
193. HCT 116 - CCL-247 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/ccl-247>.
194. HEK-293- CRL-1573 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/crl-1573>.
195. Thomas, P. & Smart, T. G. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 187–200 (2005).
196. DU 145 - HTB-81 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/htb-81>.
197. Stone, K. R., Mickey, D. D., Wunderli, H., Mickey, G. H. & Paulson, D. F. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer*, 274–281 (1978).

198. HeLa - CCL-2 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/ccl-2>.
199. Horwitz, K. B., Costlow, M. E. & McGuire, W. L. MCF-7: A human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids*, 785–795 (1975).
200. MCF7 - HTB-22 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/htb-22>.
201. Vargas-Casanova, Y. *et al.* Synergistic bactericide and antibiotic effects of dimeric, tetrameric, or palindromic peptides containing the RWQWR motif against Gram-positive and Gram-negative strains. *RSC Adv*, 7239–7245 (2019).
202. Barragán-Cárdenas, A. *et al.* The Nonapeptide RWQWRWQWR: A Promising Molecule for Breast Cancer Therapy. *ChemistrySelect*, 9691–9700 (2020).
203. Rodríguez, J. Evaluación de la actividad anticancerígena In Vitro de péptidos sintéticos derivados de Lactoferricina Bovina en líneas celulares de cáncer de mama. (Universidad Nacional de Colombia, 2019).
204. Ngoma, T. World Health Organization cancer priorities in developing countries. *Cancer Initiatives in Developing Countries* (2005).
205. Magalhaes, L. G., Ferreira, L. L. G. & Andricopulo, A. D. Recent Advances and Perspectives in Cancer Drug Design. *An Acad Bras Cienc*, 1233–1250 (2018).
206. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 394–424 (2018).
207. Orangio, G. R. The Economics of Colon Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 327–347 (2018).
208. Riedl, S., Zweytick, D., Lohner, K. Membrane-active host defense peptides--challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chem Phys Lipids*, 766–781 (2011).
209. Muller, P. Y. & Milton, M. N. The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 751–761 (2012).
210. Insuasty Cepeda, D. S. *et al.* Synthetic Peptide Purification via Solid-Phase Extraction with Gradient Elution: A Simple, Economical, Fast, and Efficient Methodology. *Molecules*, (2019).
211. Busquet, F. *et al.* OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 496–511 (2014).
212. Huertas Méndez, N. D. J. *et al.* Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Antimicrobial Activity against *E. coli* ATCC 11775, *S. maltophilia* ATCC 13636 and *S. enteritidis* ATCC 13076. *Molecules*, 1–10 (2017).
213. Cárdenas-Martínez, K. J. *et al.* Effects of Substituting Arginine by Lysine in Bovine Lactoferricin Derived Peptides: Pursuing Production Lower Costs, Lower Hemolysis, and Sustained Antimicrobial Activity. *Int J Pept Res Ther* 1–12 (2021).

214. De Both, N. J., Vermey, M., Dinjens, W. N., Bosman, F. T. A comparative evaluation of various invasion assays testing colon carcinoma cell lines. *Br J Cancer*, 934–941 (1999).
215. Gheytanchi, E. *et al.* Morphological and molecular characteristics of spheroid formation in HT-29 and Caco-2 colorectal cancer cell lines. *Cancer Cell Int*, 1–16 (2021).
216. Rousset, M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie*, 1035–1040 (1986).
217. Ahmed, D. *et al.* Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, (2013).
218. Hilchie, A. L., Vale, R., Zemlak, T. S., Hoskin, D. W. Generation of a hematologic malignancy-selective membranolytic peptide from the antimicrobial core (RRWQWR) of bovine lactoferricin. *Exp Mol Pathol*, 192–198 (2013).
219. Kawai, K. *et al.* Comprehensive karyotyping of the HT-29 colon adenocarcinoma cell line. *Genes Chromosomes Cancer*, 1–8 (2002).
220. Beter, M. *et al.* Multivalent Presentation of Cationic Peptides on Supramolecular Nanofibers for Antimicrobial Activity. *Mol Pharm*, 3660–3668 (2017).
221. Zhang, F. *et al.* Short, mirror-symmetric antimicrobial peptides centered on “RRR” have broad-spectrum antibacterial activity with low drug resistance and toxicity. *Acta Biomater*, 145–167 (2022).
222. Jia, B. Y. *et al.* High Cell Selectivity and Bactericidal Mechanism of Symmetric Peptides Centered on d-Pro–Gly Pairs. *Int J Mol Sci*, (2020).
223. Yang, S. T., Shin, S. Y. & Kim, J. II. Interaction mode of a symmetric Trp-rich undeca peptide PST11-RK with lipid bilayers. *FEBS Lett*, 157–163 (2007).
224. Zhong, C. *et al.* Antimicrobial peptides with symmetric structures against multidrug-resistant bacteria while alleviating antimicrobial resistance. *Biochem Pharmacol* (2021).
225. Vargas-Casanova, Y. *et al.* Palindromic Peptide LfcinB (21-25)Pal Exhibited Antifungal Activity against Multidrug-Resistant Candida. *Chemistry Select*, 7236–7242 (2020).
226. Barragán-Cárdenas, A. C. *et al.* Changes in Length and Positive Charge of Palindromic Sequence RWQWRWQWR Enhance Cytotoxic Activity against Breast Cancer Cell Lines. *ACS Omega*, 2712–2722 (2022).
227. Vargas-Casanova, Y. *et al.* Combining the Peptide RWQWRWQWR and an Ethanolic Extract of *Bidens pilosa* Enhances the Activity against Sensitive and Resistant *Candida albicans* and *C. auris* Strains. *J Fungi*, (2023).
228. Svenson, J. *et al.* Metabolic fate of lactoferricin-based antimicrobial peptides: effect of truncation and incorporation of amino acid analogs on the in vitro metabolic stability. *J Pharmacol Exp Ther*, 1032–1039 (2010).
229. Isidro-Llobet, A., Álvarez, M., Albericio, F. Amino acid-protecting groups. *Chem Rev*, 2455–2504 (2009).

230. Alhassan, M., Kumar, A., Lopez, J., Albericio, F., de la Torre, B. G. Revisiting NO₂ as Protecting Group of Arginine in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Int J Mol Sci*, 1–12 (2020).
231. Ragnarsson, U., Grehn, L. Dual protection of amino functions involving Boc. *RSC Adv*, 18691–18697 (2013).
232. Applied Biosystems- ThermoFisher. Cleavage, Deprotection, and Isolation of Peptides after Fmoc Synthesis Potential Problems.
233. GenScript. Peptide solubility Guidelines. https://www.genscript.com/peptide_solubility_and_stability.html.
234. Gutman, I. *et al.* Predicting the Success of Fmoc-Based Peptide Synthesis. *ACS Omega*, 23771–23781 (2022).
235. GenScript. Recommended Peptide Purity Guidelines. https://www.genscript.com/recommended_peptide_purity.html.
236. Mueller, L. K., Baumruck, A. C., Zhdanova, H., Tietze, A. A. Challenges and Perspectives in Chemical Synthesis of Highly Hydrophobic Peptides. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (2020).
237. Peptide Hydrophobicity/Hydrophilicity Analysis Tool. https://www.peptide2.com/N_peptide_hydrophobicity_hydrophilicity.php.
238. Zapadka, K. L., Becher, F. J., Gomes dos Santos, A. L. & Jackson, S. E. Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics. *Interface Focus* (2017).
239. Ertl, P. & Schuffenhauer, A. Estimation of synthetic accessibility score of drug-like molecules based on molecular complexity and fragment contributions. *J Cheminform* (2009).
240. Peter M. Hwang, Ning Zhou, Xi Shan, Cheryl H. Arrowsmith, Hans J. Vogel. Three-Dimensional Solution Structure of Lactoferricin B, an Antimicrobial Peptide Derived from Bovine Lactoferrin†. *Biochemistry*, 4288–4298 (1998).
241. Arbeláez, M. D. L. R., Aleixo, D. T., Barragán Cárdenas, A. C., Pittella, F., Tavares, G. D. The role of synthetic peptides derived from bovine lactoferricin against breast cancer cell lines: A mini-review. *Oncologie*, 629–633 (2023).
242. Li, L., Vorobyov, I., Allen, T. W. The different interactions of lysine and arginine side chains with lipid membranes. *Journal of Physical Chemistry B*, 11906–11920 (2013).
243. Hristova, K. & Wimley, W. C. A Look at Arginine in Membranes. *J Membr Biol*, 49 (2011).
244. Khemaissa, S., Walrant, A., Sagan, S. Tryptophan, more than just an interfacial amino acid in the membrane activity of cationic cell-penetrating and antimicrobial peptides. *Q Rev Biophys*, (2022).
245. Åmand, H. L., Fant, K., Nordén, B., Esbjörner, E. K. Stimulated endocytosis in penetratin uptake: Effect of arginine and lysine. *Biochem Biophys Res Commun*, 621–625 (2008).
246. Yang, S.-T. *et al.* Selective cytotoxicity following Arg-to-Lys substitution in tritrpticin adopting a unique amphipathic turn structure. *FEBS Lett*, 229–233 (2003).

247. Szabó, I. *et al.* Redesigning of Cell-Penetrating Peptides to Improve Their Efficacy as a Drug Delivery System. *Pharmaceutics* 2022, 907 (2022).
248. Svenson, J. *et al.* Altered activity and physicochemical properties of short cationic antimicrobial peptides by incorporation of arginine analogues. *Mol Pharm*, 996–1005 (2009).
249. Sahsuvar, S., Kocagoz, T., Gok, O., Can, O. In vitro efficacy of different PEGylation designs on cathelicidin-like peptide with high antibacterial and antifungal activity. *Scientific Reports*, 1–13 (2023).
250. Greco, I. *et al.* Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. *Sci Rep*, (2020).
251. Rodgers, G. M., Gilreath, J. A. The Role of Intravenous Iron in the Treatment of Anemia Associated with Cancer and Chemotherapy. *Acta Haematol*, 13–20 (2019).
252. Timmons, P. B., Hewage, C. M. HAPPENN is a novel tool for hemolytic activity prediction for therapeutic peptides which employs neural networks. *Scientific Reports*, 1–18 (2020).
253. Win, T. S. *et al.* HemoPred: a web server for predicting the hemolytic activity of peptides. *Future Med Chem*, 275–291 (2017).
254. Askari, P., Namaei, M. H., Ghazvini, K., Hosseini, M. In vitro and in vivo toxicity and antibacterial efficacy of melittin against clinical extensively drug-resistant bacteria. *BMC Pharmacol Toxicol*, 1–12 (2021).
255. Takahashi S. *et al.* The Structure-Function Relationship of Mastoparan: Loss of the Hemolytic Activity of Mastoparan by Substituting Lysine with Ornithine Residues in the Molecule. *The Journal of Tokyo Academy of Health Sciences*, 86–96 (2002).
256. Kang, A., Lee, J. H., Lin, E., Westerhoff, M. Metastatic colon carcinoma to the prostate gland. *J Comput Assist Tomogr*, 463–465 (2013).
257. Insuasty-Cepeda, D. S. *et al.* Non-natural amino acids into LfcinB-derived peptides: effect in their (i) proteolytic degradation and (ii) cytotoxic activity against cancer cells. *R Soc Open Sci* (2023).
258. Del Genio, V. *et al.* Peptides to Overcome the Limitations of Current Anticancer and Antimicrobial Nanotherapies. *Pharmaceutics* (2022).
259. Hollville, E., Martin, S. J. Measuring Apoptosis by Microscopy and Flow Cytometry. *Curr Protoc Immunol* (2016).
260. Green, D. R., Llambi, F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2015).
261. Jan, R., Chaudhry, G. e. S. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv Pharm Bull*, 205 (2019).
262. Vaseva, A. V., Moll, U. M. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*, 414–420 (2009).
263. Piatek, M., Sheehan, G., Kavanagh, K. *Galleria mellonella*: The Versatile Host for Drug Discovery, In Vivo Toxicity Testing and Characterising Host-Pathogen Interactions. *Antibiotics*, 1545 (2021).

264. Ignasiak, K., Maxwell, A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC Res Notes*, 428 (2017).
265. Erhirhie, E. O., Ihekwereme, C. P., Iloigwe, E. E. Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptance. *Interdiscip Toxicol*, 5–12 (2018).
266. McCann, M. *et al.* In vitro and in vivo studies into the biological activities of 1,10-phenanthroline, 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its copper(ii) and silver(i) complexes. *Toxicol Res*, 47–54 (2012).
267. Perše, M. Cisplatin mouse models: Treatment, toxicity and translatability. *Biomedicines* (2021).
268. Al Shoyaib, A., Archie, S. R., Karamyan, V. T. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? *Pharm Res*, 12 (2019).
269. Redfern, W. S. *et al.* The functional observational battery and modified Irwin test as global neurobehavioral assessments in the rat: Pharmacological validation data and a comparison of methods. *J Pharmacol Toxicol Methods* (2019).
270. ICH S7A Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals - Scientific guideline | European Medicines Agency.
271. Zhao, X. *et al.* Optimized lactoferrin as a highly promising treatment for intracerebral hemorrhage: Pre-clinical experience. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* (2021).
272. Kumari, S., Ahsan, S. M., Kumar, J. M., Kondapi, A. K., Rao, N. M. Overcoming blood brain barrier with a dual purpose Temozolomide loaded Lactoferrin nanoparticles for combating glioma (SERP-17-12433). *Scientific Reports*, 1–13 (2017).
273. Arcella, A. *et al.* In vitro and in vivo effect of human lactoferrin on glioblastoma growth. *J Neurosurg*, 1026–1035 (2015).
274. Begley, D. J. Strategies for delivery of peptide drugs to the central nervous system: exploiting molecular structure. *Journal of Controlled Release*, 293–306 (1994).
275. Qi, N. *et al.* Combined integrin $\alpha v \beta 3$ and lactoferrin receptor targeted docetaxel liposomes enhance the brain targeting effect and anti-glioma effect. *J Nanobiotechnology*, 1–17 (2021).
276. Caballero, M. V., Candiracci, M. Zebrafish as screening model for detecting toxicity and drugs efficacy. *Journal of Unexplored Medical Data* (2018).
277. Chahardehi, A. M., Arsad, H., Lim, V. Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. *Plants*, 1–35 (2020).
278. Brotzmann, K., Wolterbeek, A., Kroese, D., Braunbeck, T. Neurotoxic effects in zebrafish embryos by valproic acid and nine of its analogues: the fish-mouse connection? *Arch Toxicol*, 641–657 (2021).