



**Péptidos híbridos de Melitina: Evaluación del efecto citotóxico en células de
cáncer de cuello uterino humano HeLa**

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de Grado

Bogotá D.C, 08-05-2026



**Péptidos híbridos de Melitina: Evaluación del efecto citotóxico en células de
cáncer de cuello uterino humano HeLa**

Estudiante:

Elian David Puentes Muñoz

Orientador externo: Javier Eduardo Garcia Castañeda

Ph. D Ciencias Químicas.

Grupo de investigación de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas

UNAL

Universidad Nacional de Colombia

Orientador interno: Sandra Mónica Estupiñán Torres

MSc. Microbiología



**Péptidos híbridos de Melitina: Evaluación del efecto citotóxico en células de
cáncer de cuello uterino humano HeLa**

APROBADA _____

JURADOS _____

ORIENTADORA _____

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de Grado

Bogotá D.C

8 de mayo del 2026

Agradecimientos

A mi asesor, el profesor Javier Garcia Castañeda, quién me ha guiado con su amplia experiencia y paciencia en este arduo proceso de aprendizaje y desarrollo de este trabajo. A la profesora Zuly Rivera por sus consejos, siempre en búsqueda de mejorar y aportar a precisar en detalles útiles durante el proceso investigativo. A los dos, gracias por haberme acogido y brindado la oportunidad de trabajar en tan importante grupo de investigación.

Al grupo de investigación de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas SAMP por su apoyo y empatía, quienes siempre estuvieron dispuestos a colaborar y guiarme en la culminación de este proyecto.

A la profesora Sandra Mónica Estupiñán por su paciencia y acompañamiento de principio a fin en este trabajo.

A mi familia que son mi apoyo incondicional e inspiración, quienes me animan a seguir aprendiendo cada día.

Contenido

Lista de tablas	6
-----------------------	---

Lista de figuras	6
Resumen	8
Introducción	9
1. Planteamiento del Problema	10
1.2 Justificación	13
1.3Objetivos	15
2. Marco teórico.....	16
2.1Cáncer de cuello uterino	16
2.2Tratamiento.....	16
2.3Péptidos funcionales	17
2.4Péptidos anticancerígenos	18
2.5Buforina IIb (BFIIb).....	20
2.6Lactoferricina Bovina (LFCinB)	23
2.7Melitina (MEL).....	25
3.Diseño metodológico	28
3.1Hipótesis	28
4. Técnicas y procedimientos	29
4.1Cultivo celular	29
4.2Ensayo citotóxico in vitro.....	30
4.3Actividad hemolítica	30
4.4Viabilidad celular vs tiempo	31
4.5Microscopía.....	31
4.6Ensayo de combinación	31
4.7Citometría de flujo - Ensayo de apoptosis/necrosis	31
4.8Análisis estadístico.....	32
5.Resultados y discusión	32
5.3Determinación de la selectividad	45
5.4Ensayo de necrosis/apoptosis.....	48
6.CONCLUSIONES	51
7. Referencias bibliográficas	53

Lista de tablas

Tabla 1. Secuencias de los péptidos híbridos utilizados en este estudio. Las secuencias pertenecientes a MEL se encuentran en color azul, las de BFIIb en rojo y las de LFcinB en verde. Todos los péptidos poseen el extremo C-terminal con función amida.	33
Tabla 2. Secuencias de péptidos estudio con su respectiva viabilidad celular en línea celular de cáncer de cuello uterino humano HeLa tratadas a 200 µg/mL, por 2 horas. Con asterisco, se señalan los péptidos de interés por su actividad citotóxica.	34
Tabla 3: Efecto citotóxico de los péptidos P4 y P8 (µg/mL/µM) en la línea celular de CCU HeLa a diferentes tiempos de tratamiento.	40
Tabla 4. Péptidos precursores que componen la quimera P4: RLLR-ALISWIKRK Péptidos precursores que componen la quimera P4: RLLR-ALISWIKRK.....	43
Tabla 5. Péptidos precursores que componen la quimera P8: RLLRC-ALISWIKRK-RRWQWR.....	44
Tabla 6. Efecto hemolítico del péptido P4 y P8 a concentración de 200 µg/mL.....	47

Lista de figuras

Ilustración 1. Ilustración gráfica del posible mecanismo de acción de la buforina IIb (BFIIb). Generado con Gemini IA.	21
Ilustración 2. Estructura de la Buforina II (BFII), péptido anfipático de 21 residuos, cuyo motivo mínimo de actividad antibacteriana se resalta en verde (RLLR).....	22
Ilustración 3. Estructura de la Lactoferricina bovina (LFcinB). En naranja, se resaltan aminoácidos (RWQWR) correspondientes al motivo mínimo de actividad antibacteriana y en rojo se muestra el puente disulfuro que permite la formación del bucle	24
Ilustración 4. Ilustración gráfica del mecanismo de acción de la Lactoferricina Bovina (LFcinB). Generado con Gemini IA.	25
Ilustración 5. Estructura de la Melitina (MEL), péptido anfipático de 26 residuos que se caracteriza por una zona predominantemente hidrofóbica en el extremo termina (residuos 1-20 en color negro) y una zona hidrofílica en el extremo C-terminal (residuos 21-26)... ..	26
Ilustración 6: Ilustración gráfica del mecanismo de acción de la Melitina (MEL). Generado con Gemini IA.....	27
Ilustración 7. Actividad citotóxica de péptidos híbridos en células derivadas de cáncer de cuello uterino humano HeLa. Las células fueron tratadas con el péptido a concentración de 200 µg/mL, por 2 horas. Control negativo, células sin tratar. Control positivo, células con tritón 1x. Resultados extremadamente significativos $p < 0.0001$	34
Ilustración 8. Curvas de viabilidad celular de células HeLa tratadas con los péptidos P4 (azul) y P8 (rojo) en el rango de concentraciones entre 3,125 -200 µg/mL, por 2 horas a 37°C.	36

Ilustración 9. Efecto citotóxico del péptido P4: RLLR-ALISWIKRK en células CCU HeLa tratadas a 2 (círculos azules), 24 (cuadrados verdes), 48 (triángulos rojos) y 72 (triángulos negros) horas a 37°C.	37
Ilustración 10. Efecto citotóxico del péptido P8: RLLRC-ALISWIKRK-RRWQWR en células CCU HeLa tratadas a 2 (círculos azules), 24 (cuadrados verdes), 48 (triángulos rojos) y 72 (triángulos negros) horas a 37°C.	37
Ilustración 11. Efecto citotóxico del péptido P4: RLLR-ALISWIKRK en células CCU HeLa tratadas a 2 (barras azules), 24 (barras verdes), 48 (barras rojas) y 72 (barras negras) horas a 37°C a concentración de 200 µg/mL. Resultados extremadamente significativos $p < 0.0001$	39
Ilustración 12. Efecto citotóxico del péptido P8: RLLRC-ALISWIKRK-RRWQWR en células CCU HeLa tratadas a 2 (barras azules), 24 (barras verdes), 48 (barras rojas) y 72 (barras negras) horas a 37°C a concentración de 200 µg/mL. Resultados extremadamente significativos $p < 0.0001$	39
Ilustración 13. La figura muestra los cambios morfológicos aparentes en células de cáncer de cuello uterino HeLa a 2 y 24 horas de tratamiento. Se evidencian pérdidas de las prolongaciones, células redondeadas y aglomeraciones. Control negativo: Células CCU sin tratamiento. Control positivo: Tritón 1x.	43
Ilustración 14. Comparación entre mezcla física de péptidos precursores de la quimera P4 (círculo azul) y el péptido quimera P4 (cuadrado verde) a 2 horas de tratamiento en células de cáncer de cuello uterino humano HeLa.....	43
Ilustración 15. Comparación entre mezcla física de péptidos precursores de la quimera P8 (círculo azul) y el péptido quimera P8 (cuadrado verde) a 2 horas de tratamiento en células de cáncer de cuello uterino humano HeLa.....	44
Ilustración 16. Comportamiento del péptido P4: RLLR-ALISWIKRK a 2 (círculo azul), 24 (cuadrado verde), 48 (triángulo rojo) y 72 (triángulo negro) horas de tratamiento en células de fibroblastos L929.	45
Ilustración 17. Comportamiento del péptido P8: RLLRC-ALISWIKRK-RRWQWR a 2(círculo azul), 24(cuadrado verde), 48(triángulo rojo) y 72 (triángulo negro) horas de tratamiento en células fibroblastos L929.	46
Ilustración 18. Actividad hemolítica del péptido P4 (cuadrado azul) y P8(círculo rojo) a 2 horas de tratamiento en ensayo de hemólisis con glóbulos rojos a 37°C.....	47
Ilustración 19.Efecto citotóxico de 3 quimioterapéuticos diferentes. Cisplatino (círculo azul), Metotrexato (cuadrados verdes), Paclitaxel (círculo negro) en célula de cáncer de cuello uterino humano HeLa a 24 horas de tratamiento a 37°C.	49
Ilustración 20. Ensayo de citometría de flujo para determinación de apoptosis/necrosis en células CCU HeLa tratadas con el péptido P8 a 200 µg/mL a 15h de tratamiento. A. Histograma de células tratadas con cisplatino a 100 µg/mL. B. Histograma de células sin tratamiento. C. Células tratadas con tritón 1x. D. Células tratadas con el péptido P8. Q1: Eventos vivos, Q2: Eventos de apoptosis temprana, Q3: Eventos de apoptosis tardía, Q4: Eventos de necrosis	50

Resumen

El cáncer de cuello uterino (CCU) representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad femenina a nivel global y en Colombia. Los tratamientos convencionales, aunque han aumentado la expectativa de vida, suelen desencadenar resistencia tumoral y efectos deletéreos severos que impactan física y psicológicamente a las pacientes, provocando en muchos casos la deserción terapéutica. En este contexto, los péptidos anticancerígenos surgen como una alternativa terapéutica prometedora debido a su alta selectividad, potencia y capacidad para ejercer diversos mecanismos de acción. En esta investigación se evaluó efecto citotóxico de nuevas quimeras peptídicas elaboradas a partir de la conjugación de la secuencia 15-23 de la Melitina (ALISWIKRK) con motivos mínimos de Lactoferricina Bovina (LfcinB) y Buforina IIb (BFIIb) sobre la línea celular de cáncer de cuello uterino humano HeLa, evaluando la viabilidad celular y estableciendo la Concentración Inhibitoria Media (IC50) en diferentes ventanas de tiempo para establecer la cinética de acción de los péptidos P4 y P8 que presentaron el mejor desempeño. Asimismo, se evaluó la biocompatibilidad y selectividad de los péptidos promisorios frente a líneas celulares no cancerígenas, y se analizó de forma preliminar si la muerte celular inducida por dichos péptidos, está asociada a eventos apoptóticos mediante citometría de flujo. Este trabajo permitió identificar un péptido citotóxico y selectivo contra la línea de CCU HeLa, proyectándose como una molécula base para el futuro desarrollo de medicamentos oncológicos.

Palabras clave: Melitina (MEL), péptidos antimicrobianos (PAM), péptidos anticancerígenos (PACs), cáncer de cuello uterino, efecto citotóxico, viabilidad celular, motivo mínimo, selectividad, Lactoferricina bovina (LfcinB), BuforinaIIb (BFIIb), membrana celular, hemólisis.

Introducción

El cáncer de cuello uterino es considerado uno de los cuatro tipos de cáncer más frecuentes en mujeres adultas, su escalamiento en los últimos años, hace que esta enfermedad se considere como una de las afecciones que generan mayor preocupación a nivel global. Para el año 2022 se reportaron aproximadamente 600.000 casos nuevos y alrededor de 350.000 muertes [4,59]. En Colombia, este cáncer ocupa el tercer lugar de incidencia y el quinto en mortalidad; esto, se ve ligado a múltiples determinantes como desigualdades en el acceso a servicios de vacunación, detección y tratamiento [1]. En la actualidad, existen tratamientos para esta enfermedad que han aumentado la expectativa de vida en personas que padecen la enfermedad. Sin embargo, estos tratamientos tienden a generar resistencia, no son específicos y generan fuertes efectos deletéreos, generando deserción en el tratamiento a causa del fuerte impacto físico y psicológico que sufren los pacientes que padecen la patología [5]. Considerando lo anterior, es importante desarrollar nuevos fármacos más eficientes y selectivos capaces de contener y enfrentar la enfermedad.

Los péptidos surgen como una alternativa prometedora para la generación de nuevos tratamientos. Esto, porque ejercen su actividad mediante diversos mecanismos de acción, presentan mayor selectividad y especificidad, potencia y amplio espectro de acción [36]. Además, su facilidad de síntesis, aparece como una estrategia útil que permite potenciar y modificar las diferentes moléculas peptídicas existentes, buscando ampliar su margen terapéutico, efecto citotóxico y selectividad en búsqueda de nuevos prospectos para el tratamiento de la enfermedad. Así mismo, la construcción de quimeras peptídicas, que consiste en combinar dos péptidos bioactivos en una única molécula, favorece aún más su actividad biológica e incluso disminuye la toxicidad [35]. Bajo esta estrategia, se han desarrollado múltiples péptidos antimicrobianos (PAMs) que han demostrado fuerte actividad sobre un amplio espectro de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como hongos e inclusive virus [31]. De igual manera, los péptidos terapéuticos se han enmarcado en otros campos de tratamiento por sus propiedades natriuréticas y diuréticas, antiinflamatorias e inmunomoduladores, así como en el tratamiento de otros tipos de cáncer [34].

Esta investigación se centra en la evaluación del efecto citotóxico de péptidos derivados de la Melitina (MEL) mediante la formación de quimeras con diferente mecanismo de acción en la línea de cáncer de cuello uterino humano HeLa.

MEL, es una sustancia compleja secretada por la glándula del veneno de abeja que constituye el 50% del peso seco del veneno de la abeja melífera (*Apis mellifera*); del cual, se han reportado numerosos usos potenciales contra el cáncer, así como en otras enfermedades humanas tales como la esclerosis múltiple, artritis reumatoide e incluso la enfermedad de Parkinson [46,47]. La Melitina se conforma por 26 aminoácidos en su secuencia completa, la cual, ha demostrado efecto citotóxico por diferentes mecanismos de acción en células de cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de ovario [47]. En estudios previos, se reportó que la secuencia ¹⁵ALISWIKRK²³ de la MEL demostró amplio espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas [22]. Es por esto que, dicha secuencia se tuvo en cuenta en el diseño de las quimeras con el objetivo de generar nuevas moléculas en coacción con motivos mínimos de Lactoferricina Bovina (LfcinB) y Buforinallb (BFlIb), péptidos que ya han demostrado actividad citotóxica en diferentes líneas celulares de cáncer, ambos con un diferente mecanismo de acción asociado. Además, esta investigación busca evaluar la selectividad de los péptidos más promisorios mediante ensayos en líneas celulares no cancerígenas, cualidad importante que marca una brecha en los tratamientos tradicionales contra el cáncer de cuello uterino (CCU) y otros tipos de cáncer en general, ensayo in vitro importante muestra un panorama de la biocompatibilidad de los péptidos con mejor actividad demostrada. Al mismo tiempo, se busca determinar de forma parcial si la muerte celular mediada por los péptidos con mejor desempeño está ligada a eventos apoptóticos mediante ensayos de citometría de flujo.

En resumen, este estudio busca identificar nuevos péptidos quiméricos con actividad selectiva que puedan tener aplicaciones terapéuticas potenciales en el tratamiento de cáncer de cuello uterino, contribuyendo así al desarrollo de moléculas activas basadas en péptidos con alta actividad citotóxica para el futuro desarrollo de medicamentos oncológicos.

1. Planteamiento del Problema

En la actualidad, el cáncer se concibe como un problema de salud a nivel mundial; este, no es una sola afección sino un término que agrupa a más de 100 enfermedades diferentes. Se caracteriza fundamentalmente por la pérdida de los mecanismos de homeostasis y control

del ciclo celular. Es por esto que hay una división y crecimiento descontrolado de células anormales, derivadas de alteraciones genéticas (mutaciones en oncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del ADN). A diferencia de las células no cancerosas que envejecen y mueren mediante la apoptosis, las células neoplásicas evaden esta muerte programada y adquieren la capacidad patológica de invadir tejidos, órganos sanos adyacentes y, eventualmente, diseminarse a otras partes del cuerpo a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático, un proceso biológico conocido como metástasis [62,63].

El cáncer de cuello uterino (CCU) ocupa el tercer lugar como la neoplasia maligna más común entre mujeres adultas en todo el mundo, considerándose un problema de salud pública mundial. Este, sólo sobrepasado por el cáncer colorrectal y el cáncer de mama respectivamente; presentando así 569.000 casos nuevos cada año [1,59]. De manera que la prevalencia de esta enfermedad va en aumento gradualmente en el mundo, donde existe una tendencia significativa en países de ingresos bajos y medios; Colombia ocupa el tercer lugar en incidencia y el quinto en mortalidad [2]. Esto se ve fundamentado por factores como el acceso reducido a pruebas de detección, el acceso al tratamiento y la supervivencia al mismo, junto a la dificultad para el acceso a las vacunas contra el virus del papiloma humano (VPH) [1]. Es relevante mencionar que, la vacuna como método de prevención de la enfermedad tiene baja aceptabilidad en la comunidad no científica. Al presente año, parte de la población aún expresan abiertamente su escepticismo y reconocimiento frente a los beneficios de la vacunación como una medida de prevención; el acceso limitado a la misma, la resistencia cultural junto a la creciente ola de personas antivacunas, empeoran aún más el panorama [60].

La infección por virus del papiloma humano está asociada a la mayoría de los casos de cáncer de cuello uterino, donde los genotipos VPH-16 y VPH-18 se identifican como los subtipos de alto riesgo, ya que han sido asociados a más del 50 % y 10 % de los casos, respectivamente. [1]

En el 2018, en Colombia, el cáncer de cuello uterino fue la tercera causa de muerte, registrando una de las tasas de mortalidad más altas del país, 14,21 casos por cada 100.000 mujeres [3]. El patrón de riesgo de mortalidad mostró regiones con alto riesgo; en particular, zonas cercanas a los ríos navegables, regiones de frontera, el golfo de Urabá y la serranía del Baudó. Esto se relaciona con que son regiones apartadas de los grandes centros poblados, lo que incide en la calidad de los servicios de tamización y tratamiento [4]. Las terapias

contra el cáncer de cuello uterino se determinan en función de varios factores, entre ellos: el estadio del cáncer, metástasis, tamaño del tumor, la edad y la condición general del paciente [1]. Según la Red Nacional Integral del Cáncer, los tratamientos incluyen remoción quirúrgica, radiación y quimioterapia solas o en combinación. Haciendo especial énfasis en que la remoción quirúrgica se aplica a lesiones precancerosas pequeñas o cáncer de cuello uterino contenido en el útero [59]. La radiación y la quimioterapia se aplican en el caso de lesiones grandes, cáncer de cuello uterino metastásico y cáncer avanzado y/o recurrente. Siendo la quimioterapia el tratamiento definitivo para cáncer de cuello uterino, con alta tasa de respuesta, incluso en pacientes con enfermedad metastásica recurrente o que previamente han recibido radioterapia [1].

A pesar de que la radioterapia y mayoritariamente la quimioterapia son tratamientos que demuestran un resultado notable, soportado con altas tasas de respuesta [3]. Aún con los importantes avances científicos, siguen siendo terapias iatrogénicas que implican un alto costo psicológico y biológico en los pacientes [5]. El propósito de todo tratamiento oncológico es reducir el volumen tumoral e idealmente erradicar la masa o lesiones metastásicas; la cirugía a través de la resección, la radioterapia a través de la radiación y la quimioterapia a través de la administración de agentes antineoplásicos [1]. Pese a esto, los tratamientos presentan efectos colaterales que pueden interrumpir la permanencia del paciente, algunos de los efectos son vómitos, diarreas, mucositis, inmunosupresión, anemia, alopecia, astenia, adinamia y algunos otros más [5]. Donde la intensidad de los síntomas depende de múltiples factores como: la región irradiada, la dosis de radiación o de medicamento, el tipo de medicamento utilizado, las diferencias individuales y la competencia inmunológica, entre otros [6].

De acuerdo con lo anteriormente dicho, los péptidos anticancerígenos (PACs) se presentan como alternativa emergente que puede aumentar las opciones de tratamiento, potencialmente reduciendo los efectos secundarios asociados a la administración sistémica. Estos, son secuencias cortas de aminoácidos que son selectivos y tóxicos para las células cancerosas; se derivan de los péptidos antimicrobianos (PAMs), los cuales constituyen un mecanismo primario de defensa contra infecciones causadas por bacterias y otros agentes externos, conformando la inmunidad innata y producidos por distintos tipos de organismos de forma natural [15,50].

1.2 Justificación

A nivel mundial, el cáncer de cuello uterino es el cuarto cáncer más común en mujeres, con alrededor de 660.000 casos nuevos en 2022. Reportando 350.000 muertes a causa de esta enfermedad en países de ingresos bajos y medianos [6]. En Colombia, el cáncer de cuello uterino es la primera causa de muerte por cáncer entre mujeres de 30 a 59 años. A diferencia de otros cánceres, este se encuentra asociado con la **infección** con la infección del virus del papiloma humano (VPH) [7]. Los tipos 16 y 18 de VPH son los causantes del 70% de los cánceres de cuello uterino y de las lesiones precancerosas del cuello del útero, siendo el VPH 16, el de mayor riesgo a desarrollar cáncer *in situ* o cáncer invasivo [1]. Las regiones más apartadas y con bajos recursos presentan alta morbilidad y mortalidad asociada al cáncer de cuello uterino, ya que presentan mayor desigualdad en el acceso a los servicios de vacunación, detección temprana y tratamiento; de manera que, están expuestas a mayores factores de riesgo, determinantes sociales y económicos [6].

El cáncer constituye un serio problema de salud y se estima que se incrementará en los próximos años [3]. El uso de la citología para la detección de lesiones precancerosas no ha tenido mayor impacto en las tasas de incidencia y mortalidad, que aún se mantienen altas en la región [8]. La OMS proyecta que en Colombia la morbilidad del cáncer de cuello uterino aumentará de 4.300 a 6.300 casos y de 2.400 a 3.700 muertes en el 2040 [9].

Los tratamientos disponibles para el cáncer de cuello uterino incluyen cirugía, quimioterapia y/o radioterapia. Con frecuencia, los quimioterapéuticos (solos o en combinación) se utilizan para el tratamiento de lesiones cervicales avanzadas y recurrentes [8]. El cisplatino, el 5-fluorouracilo (5-FU), el carboplatino, el paclitaxel, la gemcitabina, la irinotecan, la mitomicina y el bevacizumab se utilizan con frecuencia en los tratamientos [10]. Sin embargo, su uso clínico presenta limitaciones debido a la resistencia tumoral, la baja tasa de supervivencia y los efectos secundarios [11].

Considerando que a menudo, estos tratamientos carecen de selectividad, los efectos secundarios deletéreos en células y tejidos sanos causan toxicidad hacia órganos vitales y respuestas inflamatorias graves debido a la necrosis [13]. Por ende, se hace necesario buscar nuevos medicamentos que sean efectivos y selectivos. Los péptidos anticancerígenos constituyen una alternativa terapéutica, ya que contienen secuencias cortas de aminoácidos que son selectivos y tóxicos para las células cancerosas [12]. Es por esto que, los PACs se

proyectan como alternativas de tratamiento promisorias debido a su alta penetración, selectividad y fácil modificación [12].

Los péptidos anticancerígenos (PACs), son derivados de péptidos antimicrobianos (PAMs) y producidos por distintos tipos de células de forma natural. Constituyen un mecanismo primario de defensa contra infecciones causadas por bacterias y otros agentes externos [15]. En ese sentido, los PAMs, que son péptidos codificados por diferentes genes de la inmunidad innata de múltiples organismos, son prometedores candidatos o funcionan como plantillas de optimización para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos [14]. Los PAMs pueden intervenir en diferentes procesos; la mayoría de ellos inhiben la fase de adhesión de las bacterias a una superficie; interfieren con la síntesis de la pared celular, son activos en células metabólicamente inactivas, es decir que no requieren de transportadores para entrar a la célula y atacar su diana. Además, poseen un mecanismo multimodal de muerte bacteriana, actúan en sinergia con antibióticos convencionales y no convencionales. Inclusive, tienen actividad inmunomoduladora [14].

Aunque los PAMs son conocidos principalmente por sus propiedades antimicrobianas, algunos PAMs y sus derivados se han reportado como potentes agentes antitumorales con baja toxicidad en células no cancerosas. Estos péptidos anticancerígenos (PACs) se unen a la membrana plasmática y causan muerte celular por necrosis o apoptosis [13]. Sin embargo, se especula que algunos actúan de forma independiente a la lisis de la membrana celular, donde posteriormente al ingreso al citoplasma por medio de la formación de poros transitorios, interactúan con proteínas, alterando su síntesis, su actividad enzimática e interferencia en la replicación del DNA y RNA [16].

Es preciso mencionar que, los PACs ofrecen ciertas ventajas sobre tratamientos convencionales para el cáncer, no solo por su mejor selectividad sino que su mecanismo de acción físico evade la resistencia que pueda llegar a presentar la célula cancerígena; fármacos como el cisplatino requieren de transportadores para ingresar a la célula y actuar en el organelo diana, allí las células cancerígenas mutan fácilmente para evitar su entrada, mientras que los péptidos rompen físicamente la membrana, lo que implica que sea menos probable que genere resistencia; ya que está implicada directamente la composición lipídica de su membrana. Así mismo, su tamaño intermedio les permite penetrar profundamente en tumores sólidos donde otros biológicos no logran llegar; además de su biocompatibilidad, donde a diferencia de químicos tóxicos empleados en el tratamiento convencional, la

degradación del péptido genera aminoácidos que el organismo es capaz de reciclar o excretar sin generar daño hepático o renal a largo plazo [51,61]

Así mismo, la formación de péptidos quiméricos o híbridos que son constructos no naturales que se componen de por lo menos dos secuencias de péptidos bioactivos diferentes, representan una ventaja de los PACs; ya que estas combinaciones mejoran la actividad biológica y/o la selectividad, disminuyendo así, efectos secundarios [55].

Considerando lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto citotóxico de péptidos sintéticos derivados de MEL en células cancerosas derivadas de CCU y se determinó el tipo de muerte celular inducida, con el fin de evaluar su potencial como candidatos promisorios a estudios preclínicos, en el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas contra el cáncer de cuello uterino.

1.3 Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad anticancerosa de péptidos híbridos derivados de metilina conjugados químicamente con secuencias RWQWR y/o RLLR en células humanas procedentes de cáncer de cuello uterino HeLa

Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad anticancerosa de péptidos híbridos derivados de metilina conjugados químicamente con secuencias RWQWR y/o RLLR en células humanas procedentes de cáncer de cuello uterino HeLa
2. Determinar la selectividad del péptido híbrido derivado de metilina conjugado químicamente con secuencias RWQWR y/o RLLR más promisorio en líneas celulares no cancerosas
3. Establecer de forma parcial si la muerte celular mediada por el péptido promisorio está ligada a eventos apoptóticos mediante ensayos de citometría de flujo

2. Marco teórico

2.1 Cáncer de cuello uterino

El cáncer de cuello uterino se asocia con la infección por el virus del papiloma humano (VPH), el cual, se desarrolla de forma silenciosa e infectan genitales, boca, ano y garganta. [23]. De estos, se destacan dos tipos de VPH en particular, 16 y 18, ya que son los causantes del 70% de los cánceres de cuello uterino y de las lesiones precancerosas del cuello del útero, siendo el de mayor riesgo cáncer invasor el VPH 16 [1]. Existen dos tipos de cáncer de cuello uterino, el primero corresponde al carcinoma epidermoide, el cual yace en las células escamosas que recubren la parte externa del cuello uterino o ectocérvix y es el tipo de cáncer con mayor frecuencia en la población, representando entre el 80% y el 90% de todos los casos de cáncer de cuello uterino [63].

Por otro lado, el adenocarcinoma se origina en las células glandulares, encargadas de producir la mucosidad cervical y recubren el canal interno del cuello uterino que recubren el canal del cérvix o endocérvix; este se presenta con menor frecuencia en la población, aproximadamente entre un 10% y un 20% [24,25].

La prevención de este tipo de cáncer está relacionada con prever la infección por VPH. Sin embargo, si se ha presentado la infección, la detección temprana y tratamiento de las lesiones precancerosas evitan la progresión al cáncer [24]. La vacunación contra la infección por el VPH, mantener hábitos saludables, como una dieta alimenticia balanceada, no fumar y evitar relaciones sexuales tempranas, entre otros, pueden reducir el riesgo de contraer este tipo de cáncer. La detección temprana se logra aplicando pruebas específicas como la citología, técnicas de biología molecular, combinadas con pruebas de detección del VPH y la inspección visual [26].

2.2 Tratamiento

Los tratamientos enmarcados en la actualidad contra el cáncer de cuello uterino son: cirugía, quimioterapia y radioterapia de manera individual o en combinación. La elección del tratamiento está condicionada por factores como la edad, estadio de la enfermedad, tamaño del tumor y los riesgos adyacentes a cada terapia [21]. El propósito del tratamiento es asegurar la destrucción del tejido afectado por el cáncer y evitar su crecimiento y/o propagación a otros órganos. [30]

Con frecuencia, las lesiones no invasivas son tratadas con terapia láser, crioterapia o escisión electroquirúrgica con asa, donde se extirpa la zona. Los cánceres de cuello uterino tempranos son tratados quirúrgicamente mediante traquelectomía radical, que consiste en la extirpación de la mayor parte del cuello uterino o la histerectomía radical, la extirpación del cuello uterino y del útero [21]. Simultáneamente, el cáncer avanzado localmente se trata con radioterapia dirigida al tumor o mediante implantes radiactivos, técnica en la cual se coloca material radiactivo directamente dentro o muy cerca del tumor en pequeños dispositivos de titanio que actúan como vehículos. También, se usan quimioterapéuticos solos o en combinación para el tratamiento de lesiones avanzadas y recurrentes. Entre los más usados clínicamente se encuentran el cisplatino, el 5-fluorouracilo (5-FU), el carboplatino, el paclitaxel, la gemcitabina, la irinotecan, la mitomicina y el bevacizumab [29].

El cisplatino es el quimioterapéutico más utilizado en el tratamiento del cáncer de cuello uterino, induciendo estrés oxidativo y apoptosis en las células cancerígenas al interactuar directamente con el DNA, uniéndose por una fuerte afinidad a las bases de guanina, generando enlaces cruzados intercatenarios para finalmente detener procesos importantes como la replicación y transcripción [61]. No obstante, su uso clínico se encuentra limitado por el desarrollo de resistencia al fármaco, la baja tasa de supervivencia y los efectos secundarios [11,33].

Considerando que a menudo, estos tratamientos carecen de selectividad contra las células cancerosas, los efectos secundarios deletéreos en células y tejidos sanos causan toxicidad hacia órganos vitales y respuestas inflamatorias. Además, se produce neutropenia, trombocitopenia, neurotoxicidad, toxicidad hematológica que conduce a la anemia y depresión de la médula ósea [13,33].

Debido a la naturaleza bastante agresiva y no específica de los quimioterapéuticos convencionales, resulta necesario desarrollar nuevos fármacos que superen sus limitaciones para el tratamiento de la enfermedad [21].

2.3 Péptidos funcionales

Los péptidos son moléculas formadas por la unión de dos o más aminoácidos y se diferencian de las proteínas por su longitud, las cuales contienen hasta 50 residuos [21].

Estas moléculas han sido ampliamente documentadas, ya que poseen diversa actividad biológica, especificidad y baja toxicidad [31]. Se denomina péptidos funcionales a aquellas

secuencias peptídicas específicas que tienen funciones únicas tales como el direccionamiento a células específicas, internalización celular y efectos terapéuticos [21].

A la fecha, se han identificado diversas moléculas peptídicas que han logrado su registro comercial para uso terapéutico como lo son: leuprolide, octeotride, goserelin, buserelin, enalapril, lisinopril, entre otros [34]. Por todo esto, los péptidos sintéticos cobran gran relevancia terapéutica y farmacéutica en el desarrollo de nuevos principios activos para el tratamiento de esta y otras patologías.

2.4 Péptidos anticancerígenos

Los péptidos anticancerígenos o también conocidos como PACs, son moléculas que contienen secuencias de aminoácidos selectivos y tóxicos en células cancerosas y antiproliferativos, por tanto, se consideran útiles para el tratamiento del cáncer [35].

Los PACs constituyen una opción terapéutica gracias a su alta penetración y fácil modificación, lo que permitiría enfocar la terapia anticancerígena, ya que debería ser útil para diversos tipos de cáncer sin afectar en mayor medida a células no cancerosas [36] como sucede con los quimioterápicos. Estos péptidos, se caracterizan por su naturaleza catiónica y anfipática, que les confiere la capacidad de unirse a las células cancerosas y destruirlas, ya sea mediante un mecanismo de acción directo o indirecto [36]. Las células cancerígenas presentan particularidades que permiten diferir de células sanas, permitiendo al péptido tener una mayor selectividad [21].

Las células cancerosas contienen un alto nivel de colesterol, cuya función, entre muchas otras, es la protección de la actividad lítica, modificando la fluidez de su membrana celular. Además, las células no cancerosas cuentan con neutralidad eléctrica, una fuerte característica en la que difiere con las células cancerosas. Estas, presentan una fuerte carga negativa en su superficie mediada por fosfatidilserina, mucinas glicosiladas, gangliósidos sialilados y heparina sulfato [35]. Lo que permite la desestabilización de la membrana, la citotoxicidad y la lisis de dichas células al interactuar con los PACs [36,48].

La principal fuerza impulsora de las interacciones entre los péptidos y la membrana celular de células no cancerosas son las interacciones hidrofóbicas, mientras que, entre los péptidos y la membrana celular cancerosa, son las interacciones electrostáticas. Por lo anterior, los PACs catiónicos son una alternativa debido a su reconocimiento selectivo de células neoplásicas con alto contenido de moléculas aniónicas, lo que induce procesos de apoptosis

y necrosis [21,36]. No obstante, el mayor desafío para este tipo de moléculas radica en la alta degradación proteolítica, baja biodisponibilidad y corta vida media [35,48].

Los PAMs forman parte de la respuesta innata de múltiples organismos, entre ellos bacterias, hongos, plantas y principalmente mamíferos [15,17]. Contienen entre 5 y 60 aminoácidos, poseen regiones hidrofílicas e hidrofóbicas (anfipáticos), característica que les permite interactuar con facilidad con la membrana celular [16]. Por lo general, estas moléculas actúan rápidamente para inactivar agentes infecciosos especialmente en la superficie de la mucosa y las barreras epiteliales de diferentes mamíferos [16].

Considerando esto, los PAMs han sido categorizados en cuatro subgrupos según su estructura primaria:

Grupo 1: Formado principalmente por péptidos aniónicos a condiciones de pH fisiológico, son PAMs de secuencias cortas con un peso molecular que oscila entre los 700 – 800 Da. Se encuentran con regularidad en fluidos bronquioalveolares y células epiteliales del tracto respiratorio. Este tipo de PAMs presentan actividad contra cepas Gram negativas y Gram positivas [15].

Grupo 2: Constituido por péptidos catiónicos con un tamaño máximo de 40 aminoácidos, no presentan residuos de Cisteína. No tienen estructura definida, sin embargo, se han reportado casos como la Buforina II (BFII) donde la conformación de α -hélice se correlaciona con la actividad antibacteriana [15].

Grupo 3 Conformado por péptidos catiónicos ricos en aminoácidos como Prolina, Arginina, Triptófano y Fenilalanina. Estos péptidos carecen de residuos de Cisteína y son particularmente lineales, aunque algunos pueden tomar conformaciones de giros extendidos, similar a la α -hélice [15].

Grupo 4 Abarca péptidos tanto catiónicos como aniónicos los cuales presentan residuos de Cisteína que forman puentes disulfuro intramoleculares y estructuras β -plegadas estables. Contienen cerca de 30 aminoácidos y de estos 6-10 son Cisteínas [15].

La estructura primaria de los PAMs, en la mayoría de los casos, está constituida principalmente por aminoácidos catiónicos que le confieren una mayor capacidad de interacción con las cargas negativas de la membrana externa de las bacterias que es mucho

más fuerte que en células cancerosas, esto debido a múltiples grupos fosfato en lipopolisacáridos y ácidos teicoicos [35]. Esta interacción electrostática conlleva la desestabilización de su capa estructural externa, lo que causa lisis celular [18,50].

El proceso molecular de penetración de la membrana y la disrupción de la membrana por los péptidos antimicrobianos, depende de múltiples variables, tales como la secuencia de aminoácidos y los lípidos en la membrana [16]. Casi todos los PAM tienden a clasificarse en dos vías mecanicistas dependiendo su interacción con la membrana celular. La primera categoría se centra en los péptidos de disrupción de la membrana celular que pueden distinguir entre células bacterianas y células eucariotas, ya sean cancerígenas o no [40]. Sus propiedades de penetración en la membrana celular incluyen los siguientes modelos: alfombra, duelas de un barril, agregado micelar y poros toroidales. Por lo tanto, con el aumento de los péptidos antimicrobianos (PAM) en el volumen fuera de las células bacterianas, diferentes reacciones eventualmente conducen a la inducción de la apoptosis, sea por inflamación o desequilibrio electrolítico [40].

La segunda categoría (a la que pertenece la Buforina IIb) se centra en interacciones no disruptivas de la pared celular y objetivos intracelulares donde se altera la síntesis de proteínas, la actividad enzimática y la unión e interferencia en la replicación del ADN y el ARN. [15]

2.5 Buforina IIb (BFIIb)

La Buforina II es un péptido de 21 residuos BFII (¹⁶TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK³⁶) que se genera por el tratamiento de Buforina I también llamada BFI con la endoproteinasa Lys-C [15]. La Buforina I, es un péptido antimicrobiano constituido por 39 aminoácidos aislado por primera vez del tejido estomacal del sapo asiático *Bufo gargarizans* y se genera a partir de la proteólisis de la histona H2A, dirigida por la cathepsina D liberándose su región N-terminal, la cual es reconocida específicamente e induce una respuesta a lesiones epidérmicas [19]. La Buforina IIb es un péptido antimicrobiano análogo sintético a la Buforina II en el que se ha modificado el extremo C-terminal colocando tres veces la secuencia de aminoácidos RLLR. Este péptido es considerado un PAM de amplio espectro, ya que ha presentado actividad contra cepas Gram positivas, Gram negativas, bacterias multirresistentes, hongos y células cancerígenas. [14,15]. Se especula que BFIIb induce permeabilidad de la membrana celular, produciendo poros toroidales transitorios sin generar lisis del microorganismo [16]. En este mecanismo juega un papel muy importante la ¹¹Pro,

ya que se ha demostrado que este aminoácido está directamente involucrado en el paso del péptido a través de la membrana de las bacterias, independientemente de que exista o no un receptor específico, sin alterar la membrana procariota de la misma. [15]

Es allí, donde posterior a su internalización, se especula que la Buforina IIb interactúa con los ácidos nucleicos DNA y RNA, inhibiendo funciones celulares básicas e induciendo la muerte celular [16]. Pese a esto, su acción aún no se ha explorado ni comprendido por completo, los modelos que han revelado interferencia tanto extracelular como intracelular, son generalmente reconocidos y hay evidencia de que las buforinas pueden matar microorganismos al ingresar a sus células y unirse a los ácidos nucleicos. Por lo que la Buforina IIb, presenta un mecanismo de acción independiente del rompimiento de la membrana bacteriana [22] (figura 1).

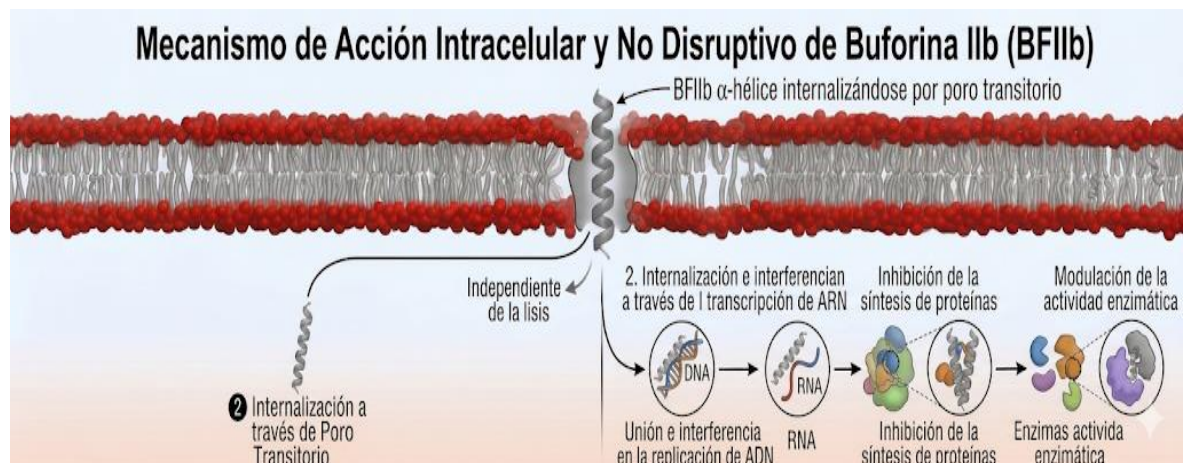


Ilustración 1. Ilustración gráfica del posible mecanismo de acción de la buforina IIb (BFIIb). Generado con Gemini IA.

Como previamente se ha descrito, la Buforina IIb presenta efecto citotóxico, donde se ha descrito que la amida de la BFIIb imita la estructura y composición de la membrana celular bacteriana Gram-negativa de *Escherichia coli*, adhiriéndose y generando condensados péptido-ADN que inducen alteraciones estructurales dentro de la célula bacteriana sin alteración de la membrana plasmática. Así mismo, se ha demostrado su actividad en modelos de ratas, donde se probó tanto individualmente como en asociación con medicamentos antimicrobianos y tuvo un alto potencial para tratar la sepsis por *Acinetobacter baumannii*. [40]. En consecuencia, se ha estipulado que el motivo mínimo de actividad antibacteriana de Buforina IIb reportado corresponde a la secuencia BFIIb (32-35): RLLR y se ha demostrado la importancia de la incorporación de múltiples copias de esta secuencia en

regiones del PAM, facilitando su interacción con membranas plasmáticas bacterianas, sugiriendo la secuencia como un péptido de internalización celular [15].

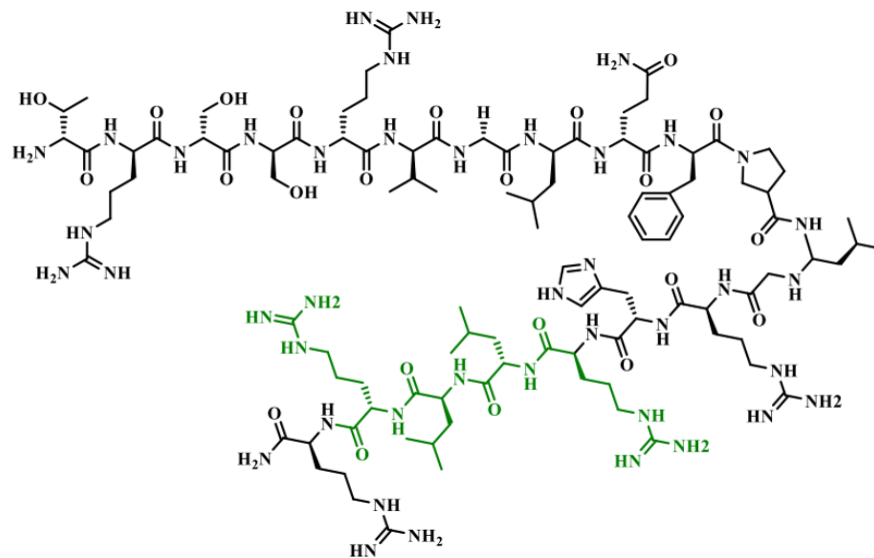


Ilustración 2. Estructura de la Buforina II (BFII), péptido anfipático de 21 residuos, cuyo motivo mínimo de actividad antibacteriana se resalta en verde (RLLR)

Por otra parte, pero no menos importante, otro antecedente exhibió su actividad contra el cáncer de próstata humano de la línea celular DU 145, donde en combinación con el medicamento 2-DG, tuvo un efecto sinérgico en cultivo celular y en los tumores de xenoinjerto de ratón. La combinación causó una mayor inhibición de la proliferación celular mediado por la detención del ciclo celular G1 y mayor apoptosis que cualquiera de los tratamientos por separado. El tratamiento combinado redujo drásticamente la producción de L-lactato y los niveles intracelulares de ATP, lo que indica una inhibición grave de la glucólisis y la producción de ATP [41]. De igual manera, demostró que la BFIIb exhibe actividades antitumorales al dirigirse específicamente a las células cancerosas a través de la interacción con gangliósidos de la superficie celular. Se han reportado los efectos de la Buforina IIb en líneas celulares cancerosas, incluidas líneas celulares de leucemia, tumor del sistema nervioso central, cáncer de pulmón, melanoma y cáncer renal. Los autores también utilizaron un trasplante de la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H460 para formar xenoinjertos tumorales y observaron que el tratamiento con BFIIb fue capaz de suprimir el desarrollo del cáncer *in vivo*. Estos hallazgos indican que la BFIIb es un posible nuevo agente terapéutico para el tratamiento del cáncer [42].

2.6 Lactoferricina Bovina (LfcinB)

Por otra parte, la Lactoferricina Bovina (LfcinB) se genera por la hidrólisis de la Lactoferrina Bovina (LFB), una glicoproteína de 703 aminoácidos que se encuentra en su forma libre de hierro, en fluidos corporales, tales como, secreciones de las mucosas, líquido seminal, leche materna [15]. Esta proteína pertenece a la familia de las transferrinas (proteínas transportadoras de hierro) y tiene un peso molecular de 80 kDa [22], a la cual se le atribuyen actividades antimicrobianas e inmunomoduladoras al ser capaz de activar células asesinas naturales (NK) y los leucocitos polimorfonucleares, entre otros mecanismos de defensa primaria [43]. Además de desempeñar acciones importantes en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular [17]. Tras su tratamiento con pepsina se produce un hidrolizado que es antibacterianamente activo [17]. En este hidrolizado se ha identificado la Lactoferricina Bovina (LfcinB), el cual retiene gran parte de la actividad biológica de la proteína [22]. Este PAM catiónico consta de 25 aminoácidos ($^{17}\text{FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF}^{41}$) y posee un bucle formado por enlaces disulfuro entre las ^{19}Cys y ^{36}Cys que le confiere propiedades estructurales asociadas con su efecto antimicrobiano [15]. Aunque también se ha reportado efecto en hongos y virus, así como potente actividad anticancerígena *in vitro* e *in vivo* [17]. La LfcinB y fragmentos más cortos derivados de este péptido han presentado igual o mayor actividad antibacteriana que la LFB, su motivo mínimo corresponde a seis residuos $^{20}\text{RWQWR}^{25}$ (figura 3). Sin embargo, este motivo presenta una menor actividad en comparación con la LfcinB [15].

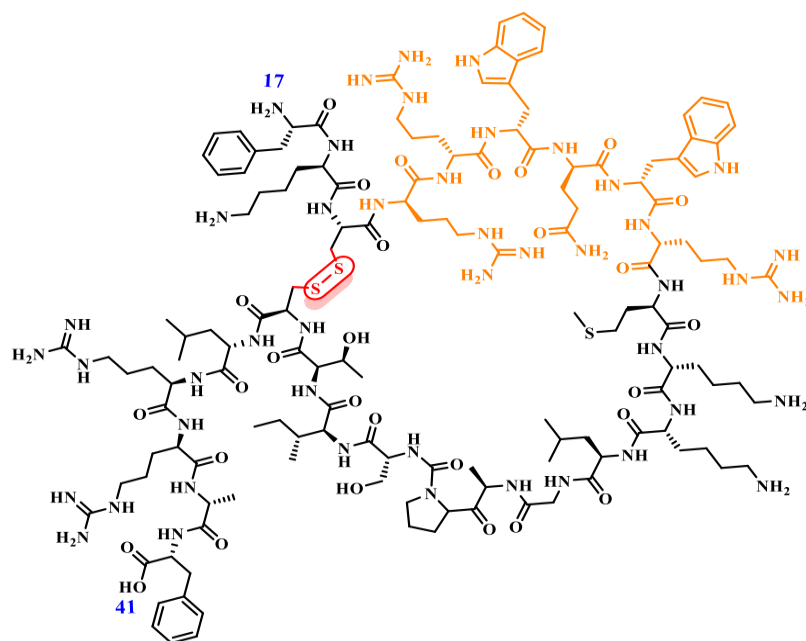


Ilustración 3. Estructura de la Lactoferricina bovina (LFcinB). En naranja, se resaltan aminoácidos (RWQWR) correspondientes al motivo mínimo de actividad antibacteriana y en rojo se muestra el puente disulfuro que permite la formación del bucle

Se cree que LFcinB interactúa con regiones cargadas negativamente en las células cancerosas y posteriormente altera las membranas de dichas células a través de la inserción de residuos de aminoácidos hidrofóbicos en la bicapa lipídica [17]. Su mecanismo de acción involucra a la despolarización de la membrana citoplasmática, los péptidos actúan como un punto de nucleación, con una estructura anfipática formada por una zona hidrofóbica e hidrofílica, generando la disrupción de la membrana bacteriana, lo que permite la translocación de los péptidos a través de esta [22]. Estudios previos han demostrado que el efecto citotóxico de la Lactoferricina Bovina (LFcinB) puede estar mediado por diferentes mecanismos tales como el arresto del ciclo celular evidenciado en células CaCo-2 de cáncer de colon, inducir apoptosis en células de cáncer de mama MDA-MB 231, MCF-7 entre otras y leucemia (HL-60). Además de ser capaz de inducir necrosis en células de neuroblastoma (SK-N-DZ, IMR-32) [43].

Se ha propuesto que el efecto citotóxico *in vitro* del péptido en leucemia de células T involucra la unión del péptido a la membrana causando la formación de un poro transmembranal que permite su entrada hacia la membrana mitocondrial. Allí, genera la activación de Bax/Bak conlleva a la liberación del citocromo C que interactuará con Apaf-1 para iniciar la formación del apoptosoma que reconocerá la procaspasa 9. Luego se produce la activación de caspasas efectoras llevando finalmente a la muerte celular por

apoptosis. Sin embargo, se ha sugerido que la citotoxicidad generada por LFcinB puede ser mediada por la inducción de apoptosis o necrosis dependiendo de la concentración del péptido [43,44].

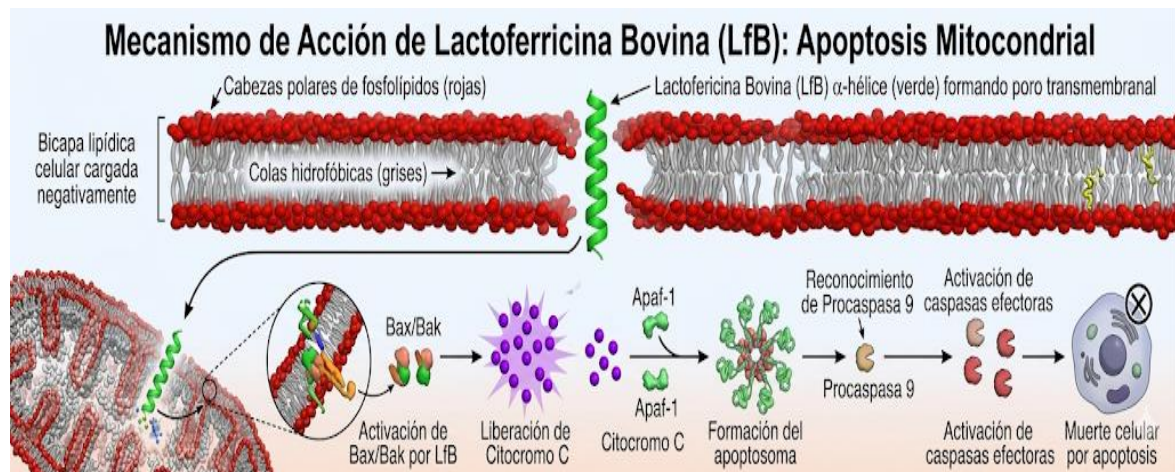


Ilustración 4. Ilustración gráfica del mecanismo de acción de la Lactoferricina Bovina (LFcinB). Generado con Gemini IA.

2.7 Melitina (MEL)

El veneno de abeja, llamado apitoxina, es una sustancia compleja secretada por la glándula del veneno de abeja, ubicada en la cavidad abdominal de las mismas que se inyecta mediante un aguijón, teniendo como función principal la protección de la colonia de ciertos depredadores. Este, suele provocar inflamación localizada e iniciar una reacción inmunológica del cuerpo [46]. Los componentes principales de esta biotoxina son péptidos policatiónicos anfipáticos, como amins y melitinas, enzimas y sustancias de bajo peso molecular, lo que permite que este biocompuesto sea utilizado en inmunoterapia y tratamiento de algunas patologías como la enfermedad de Parkinson, aunque también en casos menos complejos es empleado en apiterapia, procedimiento que consiste en inyectar al paciente un fármaco analgésico y antiinflamatorio [46]. Así mismo, se han reportado numerosos usos potenciales contra el cáncer, incluyendo propiedades antimutagénicas y radioprotectoras. También, se ha empleado en otras enfermedades humanas, como la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide al ser una sofisticada y potente combinación de sustancias químicas, entre las que se destacan la adolapina, la apamina, los péptidos degranuladores de mastocitos y los componentes no peptídicos, incluidos la histamina, la dopamina y la norepinefrina, sin mencionar la Melitina, componente más abundante y que

presenta naturaleza proteica [47]. Lo que hace que se amplíe aún más el espectro de aplicaciones terapéuticas a futuro.

La Melitina, constituye el 50% del peso seco del veneno de la abeja melífera (*Apis mellifera*), y presenta diversas propiedades biológicas y farmacológicas [46]. Su fuerte actividad en las membranas lipídicas junto con sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y anticancerígenas han sido ampliamente estudiadas y comprobadas [37].

Químicamente, MEL es un péptido catiónico y citolítico que altera membranas celulares procariotas y eucariotas [38]. La MEL es lineal y anfipática, se conforma por 26 aminoácidos ($^1\text{GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ}^{26}$). Su región N-terminal es hidrófoba (residuos 1-20), y su región C-terminal es hidrófila a (residuos 21-26) debido a la presencia de aminoácidos cargados positivamente (figura 5) [22].

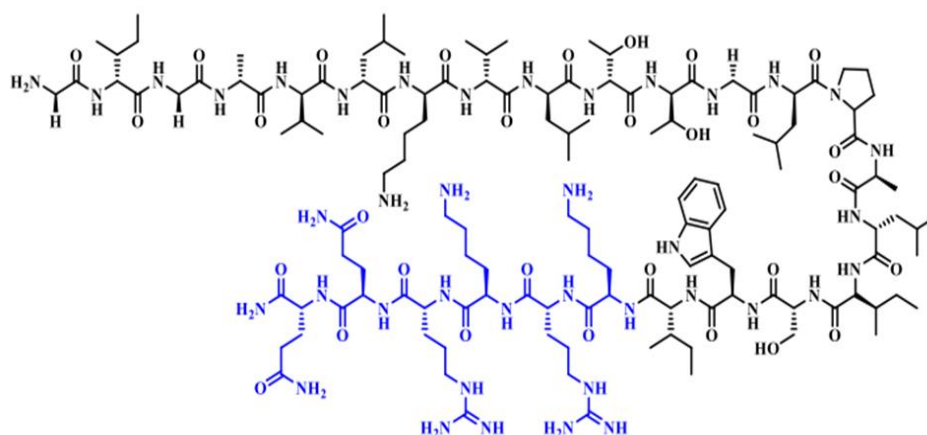


Ilustración 5. Estructura de la Melitina (MEL), péptido anfipático de 26 residuos que se caracteriza por una zona predominantemente hidrofóbica en el extremo termina (residuos 1-20 en color negro) y una zona hidrofílica en el extremo C-terminal (residuos 21-26).

Se ha propuesto que su efecto citotóxico puede estar mediado por diferentes mecanismos de acción, donde se ha reportado arresto del ciclo celular evidenciado en células HepG2 de cáncer de hígado, inhibición del crecimiento e inhibición de la migración e invasión de células tumorales como se demostró en células MDA-MB 231 y MCF-7 de cáncer de mama, así como la inducción de apoptosis en líneas HCT-116 de cáncer colorrectal, HT-29 de cáncer de colon, células OVCAR3 de cáncer de ovario y líneas PC-3 y DU145 pertenecientes a cáncer de próstata [47]. Otro antecedente de MEL, donde se evaluó su efecto en líneas de interés como lo son HeLa y Caski de cáncer de cuello uterino, la melitina inhibió el crecimiento celular mediante el aumento de la expresión de DT (receptor de

muerte), el aumento de la activación de caspasa-3 y Bax; la regulación negativa de Bcl-2 y la regulación negativa de las proteínas de la familia de la proteína inhibidora de la apoptosis [46,47].

Se especula que la Melitina se une a la superficie de la membrana cargada negativamente, alterando la integridad de las bicapas de fosfolípidos mediante la formación de poros acompañada de la fuga de iones atómicos y moléculas; por esto, se ha llegado a conocer este péptido como el mazo lítico, por su efecto fuerte efecto de lisis celular [46]. En este proceso, su α -hélice es una estructura esencial para producir los efectos líticos. En diferentes condiciones fisiológicas, la α -hélice se orienta en forma perpendicular o paralela a la superficie de la membrana. Cuando se ancla de forma paralela a la superficie de la membrana, la molécula de MEL es inactiva, y esta forma de inserción evita que otros péptidos se inserten en la bicapa lipídica (figura 6) [38,39].

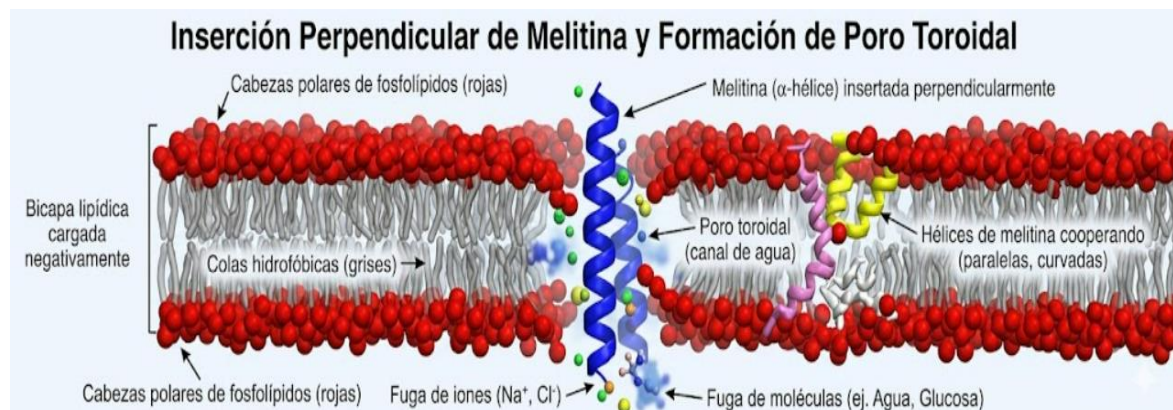


Ilustración 6: Ilustración gráfica del mecanismo de acción de la Melitina (MEL). Generado con Gemini IA.

En todo caso, la orientación perpendicular a la bicapa lipídica, causa la formación de poros y la ruptura de la membrana, lo que lleva a la fuga de hemoglobina u otros contenidos intracelulares. Sin embargo, el mecanismo de acción específico de la Melitina en las membranas celulares sigue siendo controvertido, ya que otro estudio señaló que la estructura de α -hélice es anfifílica y se forma justo después de la inserción de la Melitina en la membrana celular [37,39]. Es importante mencionar también que, a pesar de sus múltiples potenciales efectos farmacológicos, las aplicaciones clínicas de la Melitina son limitadas debido a su fuerte actividad y su citotoxicidad, generando así el 50% de hemólisis en glóbulos rojos humanos a una concentración de 2 μM y 100% a 7 μM [39]. Como propuesta a lo anterior, modificar las secuencias de aminoácidos de la Melitina o unirla con

polipéptidos u otras moléculas guía, le proporciona ciertas propiedades como la focalización de la molécula a células diana [37]. Los péptidos derivados de MEL se han diseñado para mejorar sus propiedades, disminuyendo así el efecto hemolítico y aumentando sus propiedades terapéuticas [38]. Puntualmente, la sustitución de la leucina por alanina reduce drásticamente la actividad hemolítica en los glóbulos rojos humanos. Las modificaciones en la región C-terminal reducen la carga neta de la proteína y aumentan su capacidad de formación de poros hasta 20 veces [37,39]. En síntesis, los péptidos pueden ser una alternativa debido a sus ventajas, como su potencia, amplio espectro y diversos mecanismos de acción, inducen menos efectos secundarios, selectividad, especificidad y facilidad de síntesis [20]. Dichas moléculas pueden obtenerse mediante la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS).

3.Diseño metodológico

El diseño metodológico comprende 3 etapas.

Etapas 1: Comprende la evaluación de la citotoxicidad de los diferentes péptidos derivados de MEL mediante screening; selección de los péptidos más promisorios para evaluar su efecto a 2,24,48 y 72 horas y el ensayo de combinación de los precursores que conformen las quimeras con mejor desempeño para cumplir el objetivo 1.

Etapas 2: Comprende la evaluación de la selectividad de los péptidos elegidos frente a fibroblastos y eritrocitos para el cumplimiento del objetivo 2.

Etapas 3: Comprende la evaluación de diferentes quimioterápicos de uso clínico para determinar el mejor control en el ensayo de necrosis/apoptosis que permite elucidar de forma parcial si el efecto citotóxico del péptido más promisorio está ligado a eventos apoptóticos para el cumplimiento del objetivo 3.

3.1Hipótesis

Péptidos híbridos derivados de Melitina conjugados químicamente con las secuencias RRWQWR y/o RLLR generan quimeras de potencial terapéutico en células humanas de cáncer de cuello uterino.

4. Técnicas y procedimientos

4.1 Cultivo celular

HeLa

Línea celular adherente con morfología epitelial, aislada en 1951 de un adenocarcinoma de cuello uterino de una mujer de 31 años. Las células contienen secuencias de virus del papiloma humano tipo 18 (VPH-18). Estas células presentan una rápida tasa de crecimiento, la cual es menor de 24 horas.

L929 - Fibroblastos

Línea celular adherente proveniente de tejido conjuntivo subcutáneo y adiposo de un ratón macho de la cepa C3H/An, establecida en 1948 como un clon de cepa "Strain L". Presentan morfología fibroblástica formando monocapa en un periodo aproximado de 4 días. Es útil para pruebas de toxicidad en líneas celulares

Las líneas celulares HeLa y L929 fueron cultivadas en medio Dulbecco 's Modified Eagle' s Medium DMEM suplementado con 10% FBS a 37°C con 5% de CO₂.

Descongelamiento

El criovial que contenía las células, fue descongelado sometiendo las células a 50°C y posteriormente se mezcló con 10 mL de medio de cultivo suplementado (DMEM 10% SFB) a 37°C. Una vez hecho esto, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante por inversión y el pellet se resuspendió en 5 mL de medio suplementado, se sembró en caja de 25cm² y se incubó a 37°C y 5% de CO₂. Pasadas las 24 h de incubación, el medio con debris y células no adheridas fue removido para adicionar medio suplementado hasta que se alcanza la confluencia de 70-80%

Subcultivo

Una vez las células alcanzan el 70-80% de confluencia fueron cosechadas: inicialmente se retiró el medio de cultivo sin perturbar la monocapa, posteriormente fueron lavadas con PBS 1X, se les adicionó 1-2 mL de solución Tripsina-EDTA 0.25% durante 3 min a 37°C. Seguido a esto, las células fueron removidas y mezcladas con medio de cultivo suplementado relación 1:5 (v/v), centrifugadas y resuspendidas en medio suplementado para ser contadas en la cámara de Neubauer.

4.2 Ensayo citotóxico in vitro

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo mediante el uso del bromuro de 3-(4,5dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Brevemente, se sembraron las células Hela y L929 (1×10^4 células/pozo) en placas de 96 pocillos. Tras la adhesión

celular, el medio se sustituyó por medio no suplementado para permitir la sincronización durante 12 h a 37 °C y 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo, el medio se eliminó y las células se trataron con el respectivo péptido (concentraciones finales de 6,25, 12,5, 25, 50, 100 y 200 µg/mL) disuelto en medio no suplementado durante 2 h a 37 °C y 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo, se añadieron 10 µL de MTT a cada pocillo y se incubó durante 4 horas a 37 °C y 5% de CO₂, posteriormente se retiró el medio, se añadieron 100 µL de DMSO estéril y se incubó durante 40 min a 37°C para solubilizar los cristales de formazán y leer la absorbancia a 590 nm. Las curvas de viabilidad y el valor de IC₅₀ se determinaron con GraphPad Prism 8.

4.3 Actividad hemolítica

Se centrifugó sangre periférica humana heparinizada a 2500 rpm durante 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante por aspiración y se lavaron los eritrocitos por adición de solución salina normal y centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min. Se hicieron lavados hasta obtener el sobrenadante claro. Se removió el sobrenadante y se diluyó el pellet de glóbulos rojos con solución salina hasta obtener una suspensión al 4% de hematocrito. Posteriormente, se mezclaron 100 µL de suspensión de eritrocitos (concentración final de 2% de eritrocitos) y 100 µL de péptido (concentraciones finales entre 6.2 y 200 µg/mL), se incubó durante 2 horas a 37°C. Una vez hecho esto, se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min. Finalmente se transfirió el sobrenadante a otra placa donde se midió la absorbancia a 450 nm, usando como control negativo eritrocitos en solución salina isotónica y como control positivo, eritrocitos tratados con Tritón X-100 al 1%. El blanco corresponde a solución salina empleada también en la preparación de los péptidos evaluados. El porcentaje de hemólisis se determinó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de hemólisis} = \frac{ABS_{tratamiento} - ABS_{Blanco}}{ABS_{control} - ABS_{Blanco}} \times 100 \%$$

Donde: *ABS tratamiento* = Absorbancia del tratamiento (péptido)
ABS blanco = Absorbancia del blanco
ABS control = Absorbancia del control

4.4 Viabilidad celular vs tiempo

Se realizó el MTT como se describió anteriormente, con la modificación de que las células fueron tratadas con el péptido durante 2, 6, 24, 48 o 72 horas.

4.5 Microscopía

Las células fueron observadas por medio de un microscopio de contraste de fases marca Leica DMI o Motic AE31E. Se tomaron registros fotográficos al finalizar cada tratamiento a la concentración máxima evaluada.

4.6 Ensayo de combinación

Se realizó el ensayo de MTT adicionando como tratamiento la mezcla física de los péptidos precursores en las concentraciones finales de 3.125 a 200 µg/mL cada uno.

4.7 Citometría de flujo - Ensayo de apoptosis/necrosis

Las células HeLa fueron cultivadas en placa de 24 pozos a 70% de confluencia con una densidad celular de 1×10^5 células/pozo por 12 horas hasta su adherencia, luego se retiró el medio y se añadieron 200 µL del medio suplementado 10% SFB más 200 µL del péptido P8 reconstituido en medio sin suplementar a concentración final de 200 µg/mL a 24 horas de incubación. Pasado el tiempo de tratamiento la placa se centrifugó a 2000 rpm por 5 min, luego se lavaron las células con PBS 1X y se cosecharon con 80 µL de Tripsina-EDTA 0.25%, posteriormente a esto, transferidas a tubos cónicos de centrifuga de 2 mL y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 400 µL de solución de buffer de tinción con los fluorocromos (Buffer de unión a Anexina-V 1X, 0,5 µL de FITC Anexina V y 0.5 µL de 7-AAD). Las células con los fluorocromos fueron incubadas en oscuridad por 15 min a 25°C, luego se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min, se resuspendieron en 200 µL de PBS-EDTA 1 mM y se analizaron mediante citometría de flujo. Como control de apoptosis las células se trataron con cisplatino a 100 µg/mL y

necrosis con H₂O hipotónica durante 15 horas; como control negativo células sin tratamiento [43].

4.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó a través de la herramienta Prism8 de GraphPad.

5. Resultados y discusión

Se evaluó la actividad citotóxica en células de CCU de péptidos híbridos que contienen secuencias de LfcinB, BFIIb y/o MEL. Los péptidos fueron sintetizados, purificados y caracterizados por el grupo de investigación de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP). Donde para su diseño, se tuvo en cuenta la combinación de tres secuencias con diferente actividad/mecanismo de acción con el objetivo de generar nuevas moléculas peptídicas con actividad citotóxica selectiva en la línea de cáncer de cuello uterino humano HeLa. El diseño de las moléculas estudiadas tuvo como eje central la MEL, considerando que se ha reportado su actividad en diferentes líneas celulares asociadas a cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y no menos importante CCU [47].

Previamente se reportaron péptidos quiméricos derivados de MEL con actividad antibacteriana, siendo el péptido P1 la molécula que demostró actividad contra *E. coli* ATCC 25922. [22] Además, se incluyeron 3 péptidos (P2, P3 y P4) que no habían sido reportados en la literatura antes, y que presentaron un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas [22]. Se utilizó la secuencia ¹⁵ALISWIKRK²³ de la MEL como eje central para el diseño de las moléculas estudio, a razón de que este fue postulado como el motivo mínimo de actividad, identificado en trabajos anteriores. El motivo RLLR de la buforina IIb (BFIIb), cuya secuencia ha sido incluida en diferentes péptidos híbridos que han demostrado actividad anticancerosa en diferentes tipos de cáncer por su mecanismo de acción; y el motivo mínimo de la LFcInB, RRWQWR, a pesar de presenta una menor actividad que la LfcInB, cuando fue encapsulado en liposomas e internalizado, provocó la muerte de células de leucemia. [28]. Dicho lo anterior, se evaluó también un péptido que contenía los tres motivos siendo estos: MEL, BFIIb, y LfcInB (péptido P8) (ver Tabla 1).

Propiedades fisicoquímicas				
Código	Secuencia	Pureza	Peso molecular (Da)	Carga neta
P1	ALISWIKRK	99.1%	113.4	+4
P2	RRWQWR-ALISWIKRK	85.4%	2082.5	+7
P3	ALISWIKRK-RRWQWR	80.2%	2082.5	+7
P4	RLLR-ALISWIKRK	89.2%	1652.1	+6
P5	ALISWIKRKC	94.6%	1216.5	+4
P6	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	95.2%	2846.5	+6
P7	GIGAVLKXKRKRQQ	94.3%	1480.8	+6
P8	RLLRC-ALISWIKRK-RRWQWR	88.9%	2724.4	+9

Tabla 1. Secuencias de los péptidos híbridos utilizados en este estudio. Las secuencias pertenecientes a MEL se encuentran en color azul, las de BFIIB en rojo y las de LfcinB en verde. Todos los péptidos poseen el extremo C-terminal con función amida.

5.1 Evaluación de la actividad citotóxica

Se realizó un screening de las diferentes moléculas con el fin de evaluar el efecto citotóxico in vitro en la línea celular de CCU, HeLa; tratando las células con los péptidos a concentración de 200 µg/mL (Figura 7). Las células tratadas con los péptidos P3, P5 y P7 presentaron la mayor viabilidad celular, cercana al 90%. Esto, indica que dichos péptidos tienen baja actividad citotóxica. Así mismo, los péptidos P1 y P2 demostraron una baja actividad citotóxica a la concentración evaluada, exhibiendo una viabilidad celular de 77% y 72% respectivamente.

Actividad a 200 µg/mL

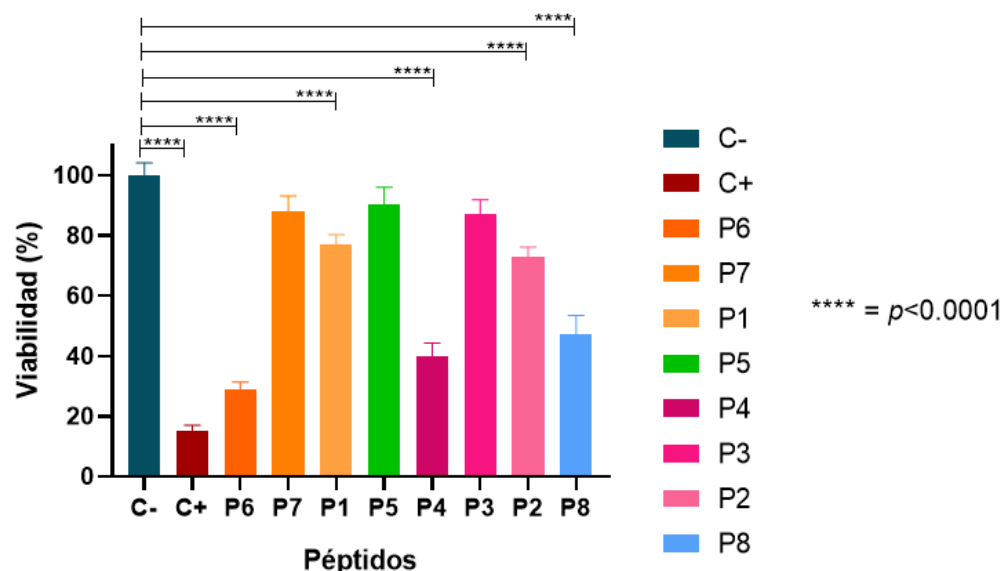


Ilustración 7. Actividad citotóxica de péptidos híbridos en células derivadas de cáncer de cuello uterino humano HeLa. Las células fueron tratadas con el péptido a concentración de 200 µg/mL, por 2 horas. Control negativo, células sin tratar. Control positivo, células con tritón 1x. Resultados extremadamente significativos $p < 0.0001$.

Tabla 2. Secuencias de péptidos estudio con su respectiva viabilidad celular en línea celular de cáncer de cuello uterino humano HeLa tratadas a 200 µg/mL, por 2 horas. Con asterisco, se señalan los péptidos de interés por su actividad citotóxica.

Actividad citotóxica de los péptidos en CCU HeLa		
Código	Secuencia	Viabilidad celular
P1	ALISWIKRK	>50%
P2	RRWQWR-ALISWIKRK	>50%
P3	ALISWIKRK-RRWQWR	>50%
P4	RLLR-ALISWIKRK	<50% *
P5	ALISWIKRKC	>50%
P6	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	<50% *
P7	GIGAVLKXKRKRQQ	>50%
P8	RLLRC-ALISWIKRK-RRWQWR	>50% *

Como se evidencio, los péptidos P1, P2, Y P3 no demostraron una actividad citotóxica importante a pesar de su amplio espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas [22]. Esto, podría explicarse por diferencias conformacionales existentes de las membranas de células eucariotas, en este caso puntual, las células

cancerígenas humanas y la de células procariotas bacterianas [35]. La densidad de carga negativa de células cancerígenas es relativamente menor en comparación a las cargas negativas debido a múltiples grupos fosfato en lipopolisacáridos, ácidos teicoicos en las membranas de células bacterianas. De manera que la afinidad de algunos PAM's por células cancerosas resulta un poco más débil que la afinidad por células bacterianas [35,44]. Frente a los péptidos P4 (viabilidad celular 40%), P6 (viabilidad celular 28%) exhibieron la mayor actividad citotóxica en las células HeLa, ya que las células tratadas presentaron viabilidad celular menor al 50%, sugiriendo que estos tres péptidos son los más activos a la concentración evaluada. Respecto al péptido P8 (viabilidad celular 56%), se incluyó en los péptidos con mejor actividad, ya que sobrepasó de manera no significativa la viabilidad celular (>50%), parámetro que se tuvo en cuenta para la selección de los péptidos estudiados. El péptido P6: GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ, corresponde a la secuencia completa de MEL, el cual ha demostrado actividad en líneas celulares de cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cervical; demostrando un porcentaje de viabilidad 28% en la línea de cáncer de cuello uterino humano HeLa [47].

Los péptidos P4 y P8 cuentan en su conformación con el motivo mínimo de la buforina IIb (BFIIb), lo que podría explicar la actividad resultante de ambas moléculas, ya que, de acuerdo a lo reportado en la literatura, se señala que este motivo es funcional en la internalización de membranas celulares sin generar daño por medio de la formación de poros toroidales para posteriormente, llegar al núcleo por afinidad al DNA y RNA, generando apoptosis dependiente de las mitocondrias [21,41]. Se sugiere que este motivo funciona como péptido guía que direcciona la molécula hacia el interior de la célula.

En consideración de los resultados obtenidos de los péptidos P4 y P8, se evaluó su actividad citotóxica inicialmente a 2 horas a concentraciones de 6,25 a 200µg/mL (figura 8). A pesar de que el péptido P6 presentó una actividad citotóxica significativa, no se tuvo en cuenta para los estudios posteriores, ya que se encuentra reportado en la literatura e inicialmente se usó como un péptido control para corroborar la actividad y el efecto de los péptidos derivados de MEL sobre la línea de CCU, HeLa.

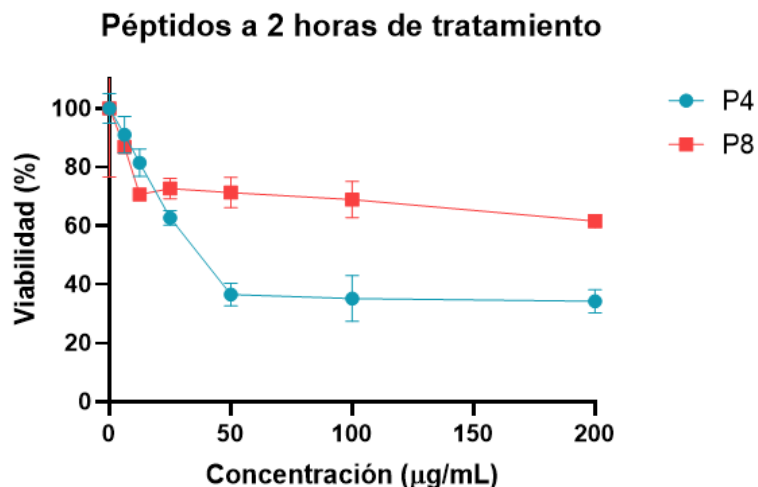


Ilustración 8. Curvas de viabilidad celular de células HeLa tratadas con los péptidos P4 (azul) y P8 (rojo) en el rango de concentraciones entre 3,125 -200 µg/mL, por 2 horas a 37°C.

Los resultados del tratamiento a 2 horas de ambas moléculas, evidencian que ambos péptidos afectan la viabilidad celular en forma dependiente de la concentración del péptido y que el mayor efecto citotóxico se evidenció a la mayor concentración evaluada (200 µg/mL). El péptido P4 (RLLR-ALISWIKRK) presentó un mejor desempeño frente al péptido P8 (RLLRC-ALISWIKRK-RRWQWR). El péptido P4 exhibió similar efecto citotóxico (cercano al 40% de viabilidad celular) en el rango de concentraciones de 50-200 µg/mL. El valor de IC₅₀ para el péptido P4 a 2 horas de tratamiento fue de 49µg/mL / 29.59 µM. El IC₅₀ se define como la medida cuantitativa en farmacología y toxicología que indica la concentración de un fármaco, péptido o sustancia necesaria para inhibir *in vitro* una función biológica o biológica específica en un 50% [64]. Por otro lado, el péptido 8 a la misma concentración y tiempo evaluado, demostró que, aunque al incrementar la concentración del péptido hay una disminución de la viabilidad celular y se observa un mejor efecto citotóxico a la mayor concentración evaluada (200 µg/mL), en este periodo de tiempo (2 horas) este péptido no alcanza la IC₅₀. Es decir, no se logra inhibir *in vitro* la función biológica en el 50% de las células de CCU.

Con el fin de establecer si la actividad citotóxica de los péptidos observada a 2 horas de tratamiento se mantenía durante el tiempo, se evaluó el efecto citotóxico de estos péptidos tratando las células a 24, 48 y 72 horas. Es decir que, se agregó tratamiento en un tiempo 0 (T0) y transcurrida las diferentes horas establecidas, se realizó la lectura mediante el ensayo de citotoxicidad (Figura 9 y Figura 10)

Péptido P4

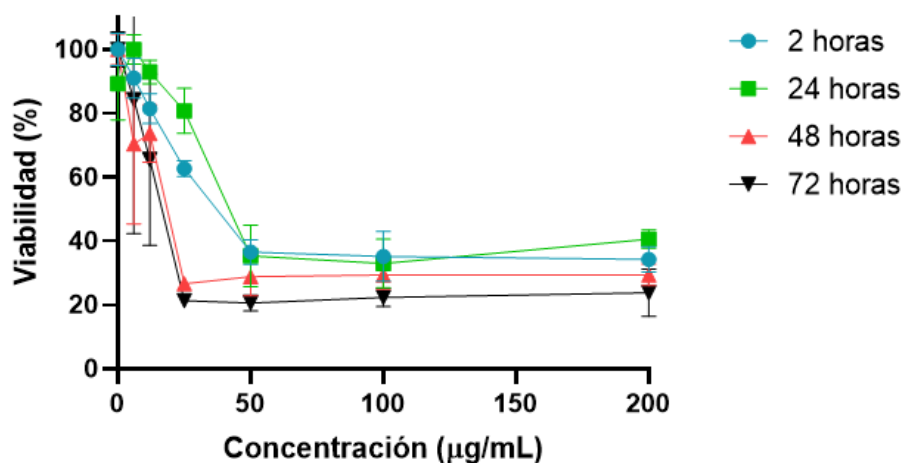


Ilustración 9. Efecto citotóxico del péptido P4: RLLR-ALISWIKRK en células CCU HeLa tratadas a 2 (círculos azules), 24 (cuadrados verdes), 48 (triángulos rojos) y 72 (triángulos negros) horas a 37°C.

Péptido P8

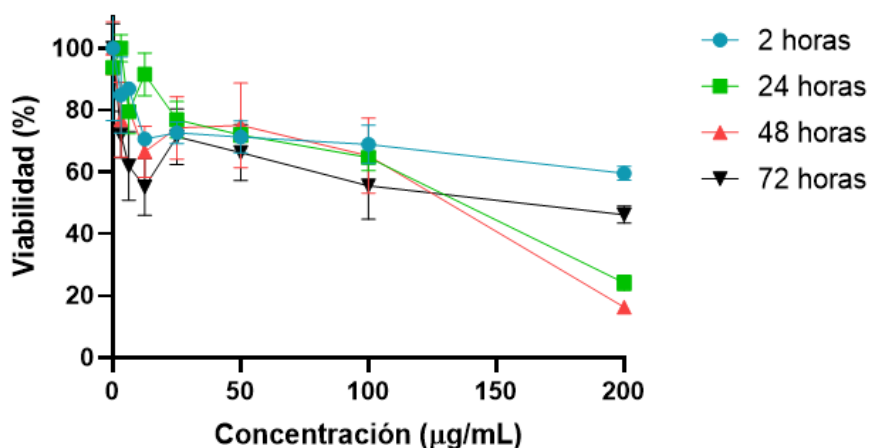


Ilustración 10. Efecto citotóxico del péptido P8: RLLRC-ALISWIKRK-RRWQWR en células CCU HeLa tratadas a 2 (círculos azules), 24 (cuadrados verdes), 48 (triángulos rojos) y 72 (triángulos negros) horas a 37°C.

Los resultados muestran que ambas moléculas definen un comportamiento decreciente de la viabilidad celular en función del aumento de las diferentes concentraciones de los péptidos empleados en el ensayo, siendo la concentración más mínima 6,25 µg/mL y la máxima 200 µg/mL. El péptido P4, demuestra un efecto citotóxico rápido y potente, mostrando ser una molécula de acción rápida que a 2 horas de tratamiento exhibe una caída drástica de la viabilidad celular a partir de los 50 µg/mL y se mantiene hasta los 200 ug/mL,

independiente del tiempo de tratamiento. Se observa que la actividad citotóxica fue similar independiente a los tiempos. Sin embargo, se logra apreciar una leve disminución de la viabilidad celular en comparación a la tendencia del comportamiento a 2, 24 y 48 horas en función del tiempo del tratamiento, siendo mayor a las 72 horas. Lo anterior sugiere que estos péptidos mantienen su actividad citotóxica en tiempos largos de tratamiento, indicando que es una molécula estable en las condiciones de cultivo y que su efecto hace que la célula pierda su capacidad de proliferación.

Esto, puede asociarse con el mecanismo de acción lítico directo de Mel, ya que se especula que posteriormente a la unión a la membrana, altera la integridad de las bicapas de fosfolípidos mediante la formación de poros acompañada de la fuga de iones atómicos y moléculas, aumentando la permeabilidad celular donde finalmente se produce la lisis [47,49].

El péptido P8, presentó similar efecto citotóxico en el rango de concentraciones de 3,125-50 $\mu\text{g/mL}$, independiente del tiempo de tratamiento, mostrando una viabilidad celular ($>50\%$). Sin embargo, se demostró también que el efecto citotóxico del péptido a la máxima concentración en los diferentes tiempos evaluados, deja en evidencia que la actividad citotóxica se incrementa a medida que se aumenta el tiempo, exhibiendo una caída drástica de la viabilidad celular a partir de los 100 $\mu\text{g/mL}$ a 24 y 48 horas de tratamiento, lo cual sugiere que el efecto citotóxico se mantiene en estos periodos de tiempo y su comportamiento es similar. Se observa que el mejor efecto citotóxico del péptido P8 ocurre a las 48 horas de tratamiento, dejando la viabilidad celular sobre el 20%. Pese a esto, a 72 horas de tratamiento, la viabilidad aumenta nuevamente, lo cual sugiere que hay una pérdida del efecto citotóxico en ese último periodo de tiempo evaluado.

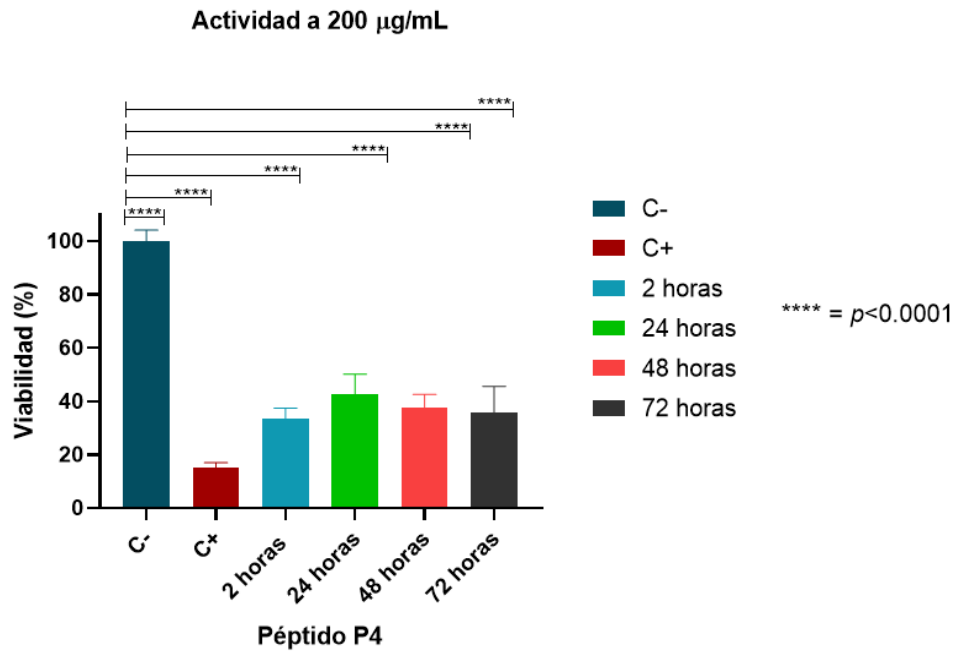


Ilustración 11. Efecto citotóxico del péptido P4: RLLR-ALISWIKRK en células CCU HeLa tratadas a 2 (barras azules), 24 (barras verdes), 48 (barras rojas) y 72 (barras negras) horas a 37°C a concentración de 200 µg/mL. Resultados extremadamente significativos $p < 0.0001$

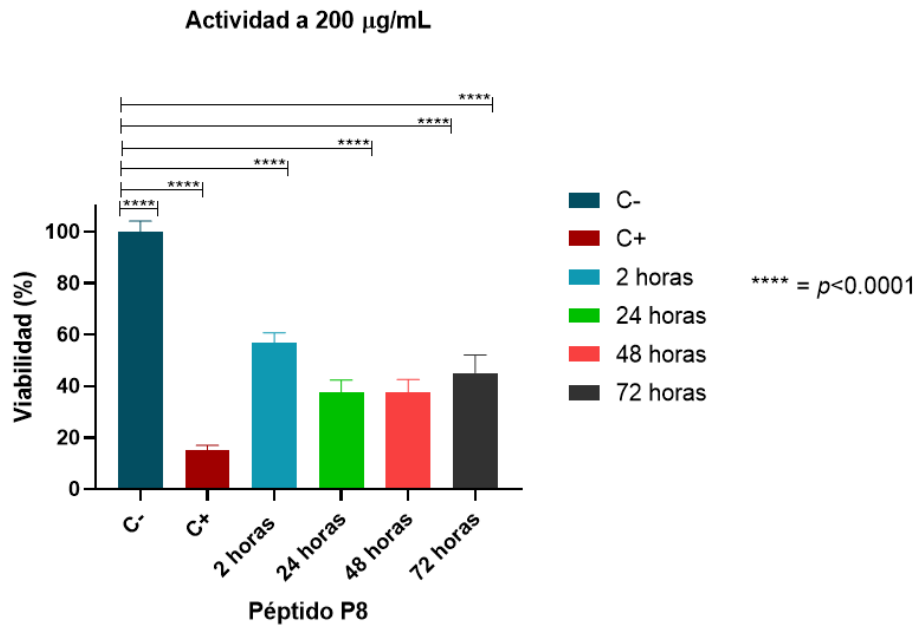


Ilustración 12. Efecto citotóxico del péptido P8: RLLRC-ALISWIKRK-RRWQWR en células CCU HeLa tratadas a 2 (barras azules), 24 (barras verdes), 48 (barras rojas) y 72 (barras negras) horas a 37°C a concentración de 200 µg/mL. Resultados extremadamente significativos $p < 0.0001$

Tabla 3: Efecto citotóxico de los péptidos P4 y P8 ($\mu\text{g/mL}$ / μM) en la línea celular de CCU HeLa a diferentes tiempos de tratamiento.

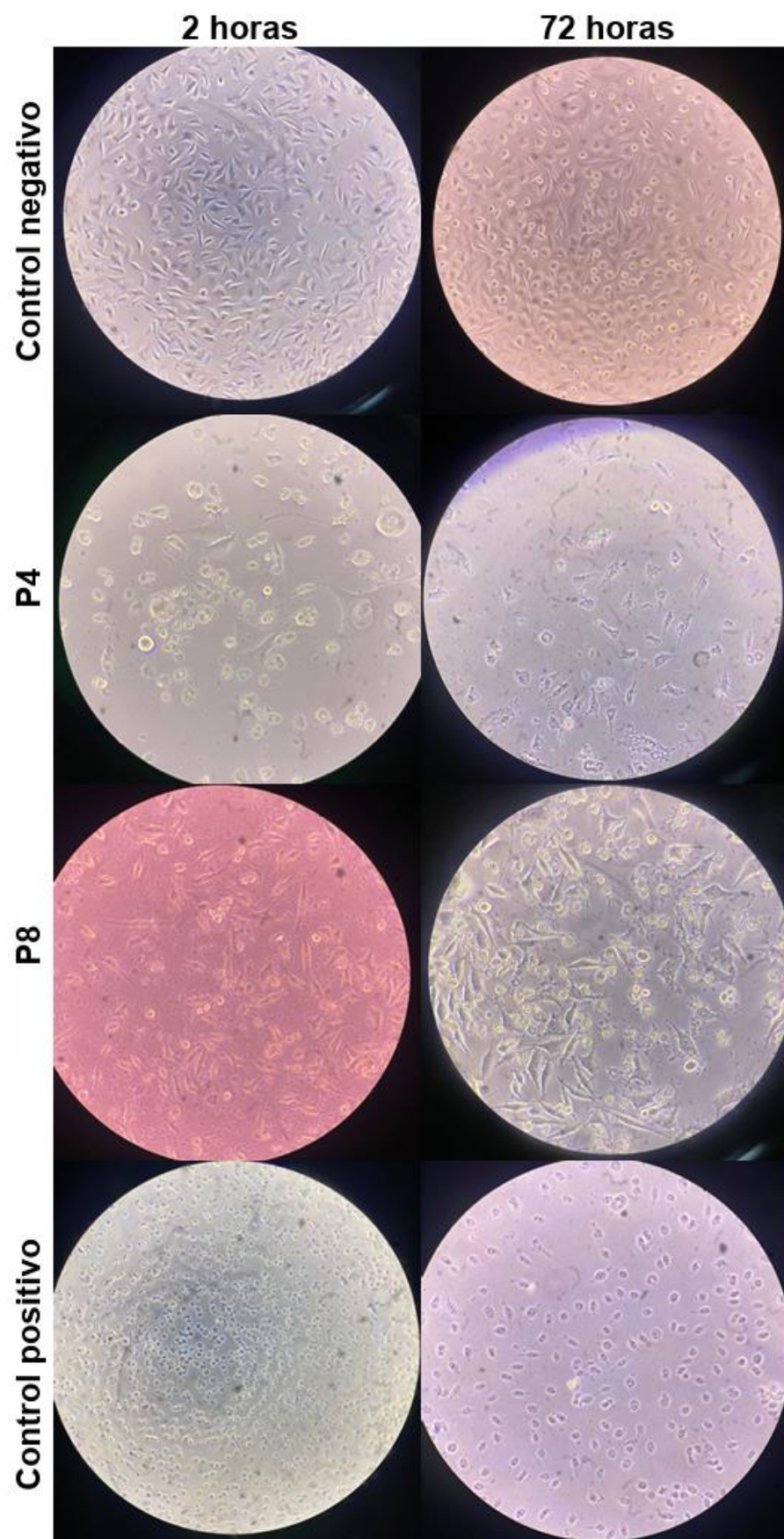
Actividad citotóxica de los péptidos en células HeLa a diferentes tiempos de tratamiento									
Código	Secuencia	Actividad citotóxica a diferentes tiempos de tratamiento (IC_{50})							
		2h		24 h		48 h		72 h	
		$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
P4	RLLR-ALISWIKRK	48.88	29.59	62.64	37.92	19.98	12.09	17.21	10.42
P8	RLLRC-ALISWIKRK-RRWQWR	N. A	N. A	110.2	40.45	98.38	36.11	N. A	N. A

- N.A: No aplica.

Como es evidente, el péptido P4 presenta un IC_{50} a dos horas de tratamiento ($48.88\mu\text{g/mL}/29.59\mu\text{M}$), mientras que el péptido P8 no alcanza un IC_{50} hasta las 24 horas de tratamiento. Esto sugiere que el péptido P4 presenta un efecto lítico de rápida acción, que a 2 horas de tratamiento es capaz de inhibir de forma *in vitro* la función biológica en un 50%. Sin embargo, aunque la viabilidad celular se eleva levemente a 24 horas de tratamiento, se observa que a 48 y 72 horas vuelve a disminuir, indicando que el péptido mantiene su actividad en tiempos largos de tratamiento. El péptido P8 demuestra un comportamiento distinto, se observa que una vez alcanza el IC_{50} a las 24 horas ($110.2\mu\text{g/mL}/40.45\mu\text{M}$) y 48 horas ($98.38\mu\text{g/mL}/36.11\mu\text{M}$), a 72 horas de tratamiento aumenta de forma significativa la viabilidad celular ($>50\%$), lo que sugiere que P8 es de lenta acción frente a P4 y es posible que a 72 horas de tratamiento el péptido pierde su efecto citotóxico, de manera podría sugerir un retratamiento a esta hora evaluada. Se ha reportado que +5 o +6, que es considerada la carga óptima para la atracción electrostática inicial hacia las membranas y posterior inserción en las mismas [50]. Sin embargo, cuando se supera este umbral, como es el caso del péptido P8, puede resultar en atrapamiento y por ende, un retraso o pérdida de la eficacia del péptido [50]. P8 necesita mucho más tiempo para interactuar con la membrana, acumularse y ejercer su efecto citotóxico, sugiriendo un posible mecanismo de internalización [52].

Otro punto importante es que, el péptido P8 presenta un detalle conformacional a diferencia del péptido P4 y es un residuo de cisteína. Se ha reportado que las cisteínas pueden formar puentes disulfuro espontáneos [54], generando dímeros; una molécula mucho más voluminosa y pesada que disminuye la tasa de difusión y altera la anfipaticidad, dificultando que penetre la membrana rápidamente [54]. Es importante resaltar que a las 24 horas de

tratamiento el péptido P4 presenta un IC_{50} de $62.64\mu\text{g/mL}/37.92\mu\text{M}$ y el péptido P8 un IC_{50} $110.2\mu\text{g/m}/40.45\mu\text{M}$, al observar las diferencias micromolares de ambos péptidos, se infiere que los dos péptidos requieren concentraciones casi idénticas para inhibir a la mitad (50%) de forma *in vitro* la viabilidad celular de células CCU HeLa.



Fuente propia

Ilustración 13. La figura muestra los cambios morfológicos aparentes en células de cáncer de cuello uterino HeLa a 2 y 24 horas de tratamiento. Se evidencian pérdidas de las prolongaciones, células redondeadas y aglomeraciones. Control negativo: Células CCU sin tratamiento. Control positivo: Tritón 1x.

5.2 Ensayo de combinación

Con la finalidad de comparar la actividad citotóxica de los precursores que conforman ambas quimeras y propiamente la actividad de las mismas, se evaluó el efecto de la mezcla física de los péptidos precursores en células HeLa mediante el ensayo de MTT. De modo que, se adiciono en combinación los diferentes precursores que componen tanto la quimera del péptido 4 y péptido 8 a las mismas concentraciones 6.25 a 200 µg/mL, dejándola actuar durante 2 horas. La combinación de péptidos precursores fue la siguiente: Para quimera P4: **RLLR + ALISWIKRK**, para la quimera P8: **RLLR + ALISWIKRK + RRWQWR** (Tabla 4 y 5).

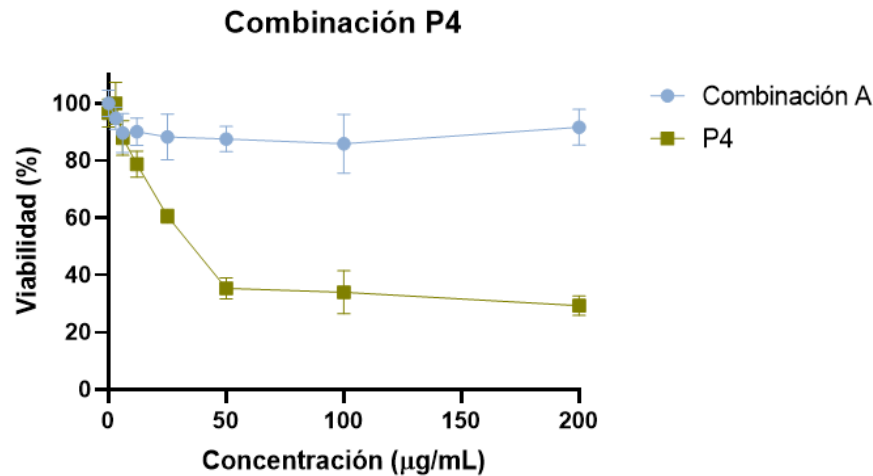


Ilustración 14. Comparación entre mezcla física de péptidos precursores de la quimera P4 (círculo azul) y el péptido quimera P4 (cuadrado verde) a 2 horas de tratamiento en células de cáncer de cuello uterino humano HeLa.

Tabla 4. Péptidos precursores que componen la quimera P4: RLLR-ALISWIKRK Péptidos precursores que componen la quimera P4: RLLR-ALISWIKRK

Quimera P4 RLLR-ALISWIKRK			IC50 $\mu\text{g/mL}$
Combinación A			HeLa
A.	RLLR ALISWIKRK	+	>200

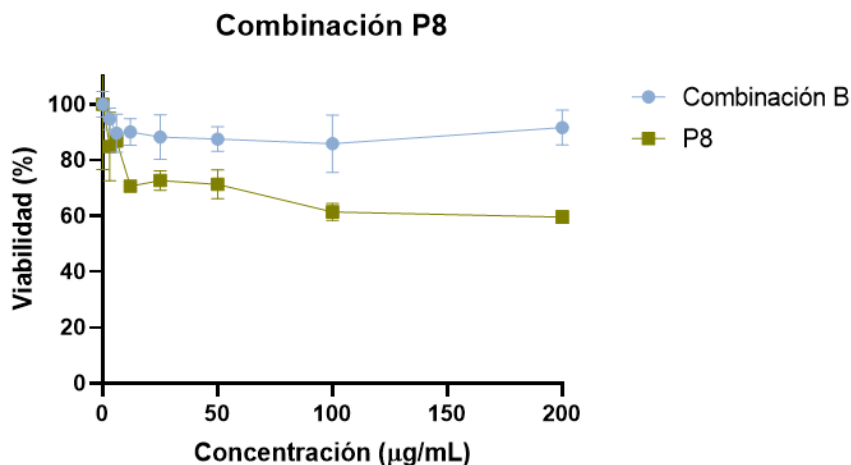


Ilustración 15. Comparación entre mezcla física de péptidos precursores de la quimera P8 (círculo azul) y el péptido quimera P8 (cuadrado verde) a 2 horas de tratamiento en células de cáncer de cuello uterino humano HeLa.

Tabla 5. Péptidos precursores que componen la quimera P8: RLLRC-ALISWIKRK-RRWQWR

Quimera P8			IC50 $\mu\text{g/mL}$
RLLRC-ALISWIKRK-RRWQWR			HeLa
R			
Combinación B			
B.	RLLR ALISWIKRK RRWQWR	+ +	>200

Los resultados muestran que ninguna de las mezclas físicas de los precursores presentó el mismo o mejor efecto citotóxico que las quimeras a las diferentes concentraciones evaluadas. Lo anterior, demostró que la actividad citotóxica depende estrictamente de la continuidad covalente de los fragmentos. Como se observa en las figuras 11 y 12, las mezclas de péptidos precursores aislados resultaron biológicamente inactivas ($\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$). Esto, indica que la simple co-incubación de dominios catiónicos e hidrofóbicos no genera un efecto sinérgico en solución. Por el contrario, la formación del enlace peptídico en la quimera provee la longitud de cadena mínima indispensable para ejercer su actividad,

carga e hidrofobicidad [21], es claro que las quimeras presentan un mejor balance que favorece el efecto anticancerígeno.

Queda en evidencia que la formación de las quimeras peptídicas a partir de péptidos funcionales es una estrategia que permite obtener nuevas y mejoradas moléculas con amplio espectro terapéutico.

5.3 Determinación de la selectividad

Con el fin de determinar el potencial clínico de los péptidos promisorios y así mismo, estipular la ventana terapéutica de estas moléculas, se evaluó su biocompatibilidad utilizando dos modelos *in vitro* complementarios, el primer ensayo realizado en la línea celular de fibroblastos murinos L929, considerada estándar internacional de tejido sano ya que mantiene la simetría de una célula sana, presenta una superficie externa neutra con niveles normales de colesterol. Se asume su comportamiento metabólico y de membrana como el de un tejido conectivo sano [56,57]. Por otra parte, se realizó un ensayo de hemólisis en eritrocitos humanos. Dicha prueba, es comúnmente utilizada en el cribado de péptidos y son consideradas células altamente sensibles. La hemólisis de los glóbulos rojos es principalmente causada por afectación de la membrana y es un evento adverso que ocurre ante la administración de quimioterápicos para el tratamiento del cáncer [55]. Por esto, es importante estudiar dicha interacción durante el desarrollo de nuevos fármacos.

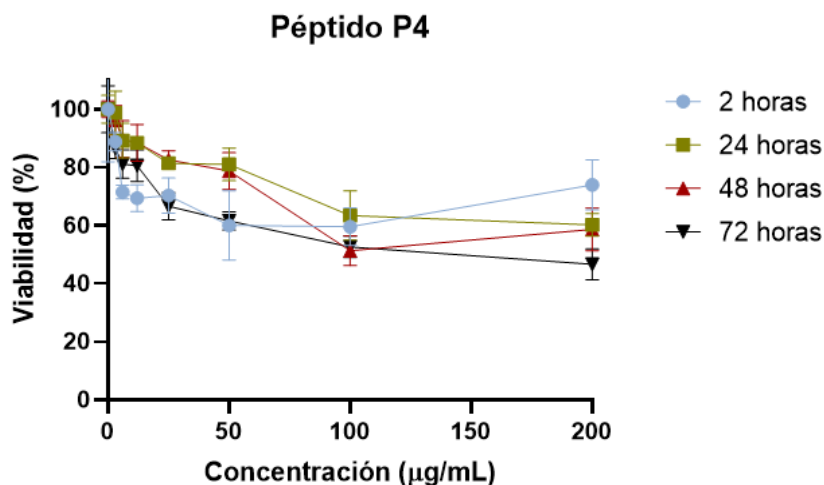


Ilustración 16. Comportamiento del péptido P4: RLLR-ALISWIKRK a 2 (círculo azul), 24 (cuadrado verde), 48 (triángulo rojo) y 72 (triángulo negro) horas de tratamiento en células de fibroblastos L929.

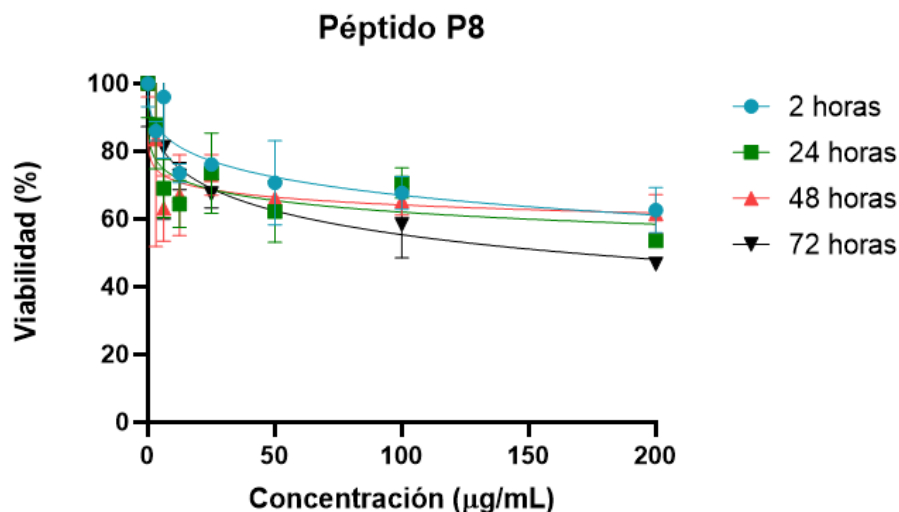


Ilustración 17. Comportamiento del péptido P8: RLLRC-ALISWIKRK-RRWQWR a 2(círculo azul), 24(cuadrado verde), 48(triángulo rojo) y 72 (triángulo negro) horas de tratamiento en células fibroblastos L929.

Se observa que el efecto del péptido P4 muestra una disminución de la viabilidad celular hasta un 50%, desde los 50 µg/mL en adelante, resultado que es consistente con el comportamiento demostrado por este mismo péptido en la línea celular de cáncer de cuello uterino humano HeLa, donde exhibe una fuerte actividad a concentraciones entre 50 y 200 µg/mL. Por otra parte, en lo que respecta al péptido P8, se evidencia que el efecto citotóxico del péptido se mantiene mejor a concentraciones medias, evidenciando la viabilidad celular por encima del 60% desde 50 µg/mL en adelante en casi todos los tiempos evaluados.

Asimismo, se debe señalar también que, el péptido P4 presentó un 64% de hemólisis frente al péptido P8, el cual presentó 2% hemólisis, ambos a concentración de 200µg/mL por 2 horas de tratamiento. Idealmente un péptido selectivo no deberá superar el 10% de hemólisis en el ensayo, ya que representaría un riesgo de administración sistémica [55].

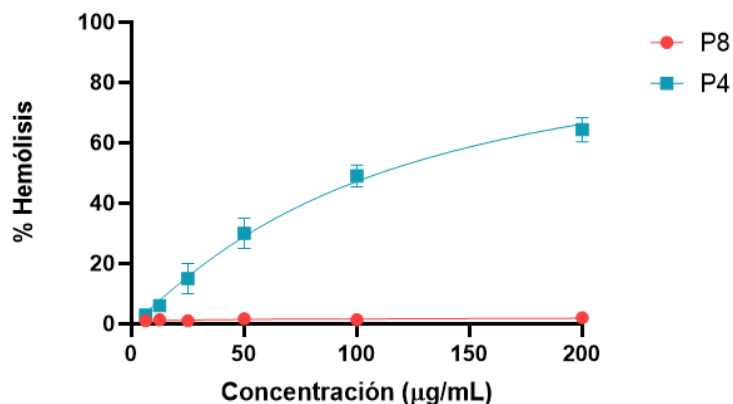


Ilustración 18. Actividad hemolítica del péptido P4 (cuadrado azul) y P8(círculo rojo) a 2 horas de tratamiento en ensayo de hemólisis con glóbulos rojos a 37°C.

Tabla 6. Efecto hemolítico del péptido P4 y P8 a concentración de 200 µg/mL

Péptidos	Péptido P4	Péptido P8
% Hemólisis	64%	2%

En síntesis, los resultados revelaron perfiles de selectividad marcadamente divergentes. El péptido P4 exhibió una pronunciada actividad citotoxicidad inespecífica; tal como se deja en evidencia en la figura 16, la viabilidad celular de los fibroblastos L929 se redujo significativamente (<60%) en casi todos los tiempos evaluados a partir de concentraciones de 50 µg/mL. Este comportamiento citotóxico se correlaciona directamente con su alta actividad hemolítica, la cual alcanzó un 64% a la concentración máxima de 200 µg/mL. En conjunto, estos datos sugieren que la anfipaticidad y el grado de hidrofobicidad del péptido P4 superan el umbral necesario para discriminar entre tipos celulares, permitiéndole lisar de forma inespecífica membranas neutras, ricas en fosfatidilcolina y colesterol como lo es la de los glóbulos rojos [58]. Por el contrario, el péptido P8 demostró un perfil de bioseguridad notablemente superior. A pesar de poseer de tener un efecto más lento en comparación al P4. El péptido P8 indujo una hemólisis insignificante, 2% a 200 µg/mL. Evidenciando una incapacidad aguda para desestabilizar la membrana plasmática neutra de los eritrocitos. De manera congruente, en los fibroblastos L929 (Figura 17), la viabilidad se conservó en mayor medida a concentraciones medias, 50-100 µg/mL frente al péptido P4; manteniendo la viabilidad celular por encima del 60% en casi todos los tiempos evaluados. Esta divergencia entre ambos péptidos puede sugerir que el mecanismo de acción del péptido P8 es

dependiente de interacciones electrostáticas iniciales con lípidos aniónicos, característicos de las membranas de células tumorales o membranas bacterianas [57,58], lo que favorece su selectividad y evita su inserción lítica en membranas celulares sanas aumentando el margen terapéutico del péptido. Dicho esto, teniendo en cuenta los resultados, se decidió realizar el ensayo de apoptosis/necrosis con citometría flujo con el péptido P8, para establecer de manera parcial si el efecto citotóxico del péptido está ligado a eventos de apoptosis.

5.4 Ensayo de necrosis/apoptosis

Con el ensayo de citometría mediante el uso de Anexina-V y 7-AAD para la determinación de apoptosis/necrosis; se evaluó la exposición de fosfatidilserina en la capa externa de la membrana citoplasmática mediante su tinción con anexina-V FICT posterior al tiempo de exposición al péptido. Este fosfolípido es parte fundamental de las membranas celulares, predominante al interior de la bicapa lipídica en células sanas y se externaliza durante las etapas iniciales de apoptosis. El 7-AAD, un compuesto fluorescente que se une al DNA permite distinguir células necróticas debido a que no atraviesa membranas que no estén comprometidas, es decir, que no hayan perdido su integridad.

Con el fin de establecer el mejor control de apoptosis en la línea de celular de CCU HeLa, para el estudio con citometría de flujo, se realizaron ensayos de viabilidad celular con diferentes quimioterápicos de uso frecuente en el tratamiento del cáncer, siendo estos, el cisplatino, metotrexato y paclitaxel; evaluando el efecto de cada fármaco de uso clínico a 24 horas de tratamiento a 37°C (figura 19).

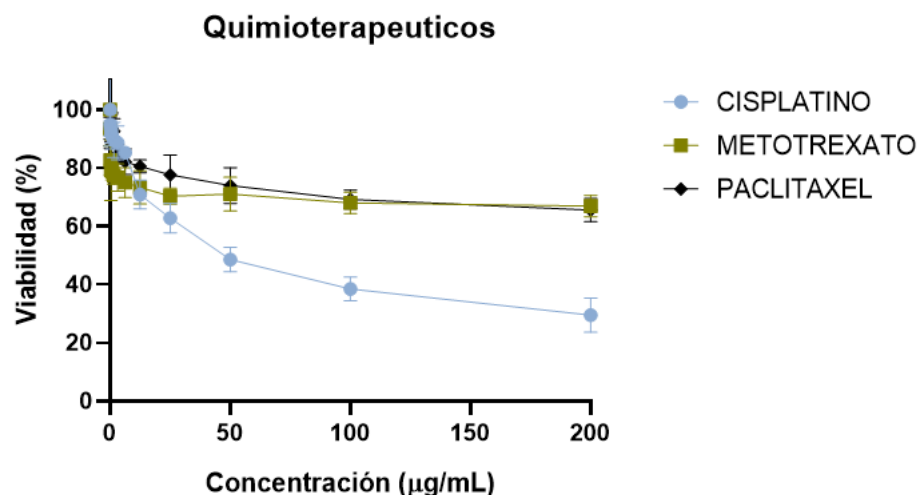


Ilustración 19. Efecto citotóxico de 3 quimioterapéuticos diferentes. Cisplatino (círculo azul), Metotrexato (cuadrados verdes), Paclitaxel (círculo negro) en célula de cáncer de cuello uterino humano HeLa a 24 horas de tratamiento a 37°C.

La literatura reporta que el cisplatino es el fármaco de elección para el tratamiento de CCU, ya que en sinergia con la radioterapia logran mitigar la enfermedad, aunque de forma inespecífica, afectando así otro tipo de células no cancerosas y generando efectos deletéreos en los pacientes. El cisplatino actúa como un radiosensibilizador que al unirse al DNA y formar enlaces cruzados, inhibe la maquinaria de reparación celular. Cuando la radiación rompe el DNA, el cisplatino asegura que la célula tumoral no pueda repararse a sí misma, forzando una apoptosis masiva [33]. Como se observa en la figura 19, el cisplatino genera una caída drástica de la viabilidad celular a partir de los 50 $\mu\text{g/mL}$ (<60%), y que, al aumentar la concentración, la tendencia continúa, dejando la viabilidad a menos del 30% en la máxima concentración evaluada (200 $\mu\text{g/mL}$). Por otro lado, el metotrexato y paclitaxel, aunque evidencia una disminución en la viabilidad celular a concentraciones medias (50 $\mu\text{g/mL}$), no es significativa ni aumentando la concentración de los mismos. Se puede observar que, se mantuvo la viabilidad celular (>60%) incluso en las concentraciones máximas evaluadas (200 $\mu\text{g/mL}$). Esto sugiere que, en efecto, el fármaco más efectivo por desempeño para tratar el CCU es el cisplatino, exhibiéndose como el fármaco de elección para generar apoptosis en el ensayo de necrosis/apoptosis.

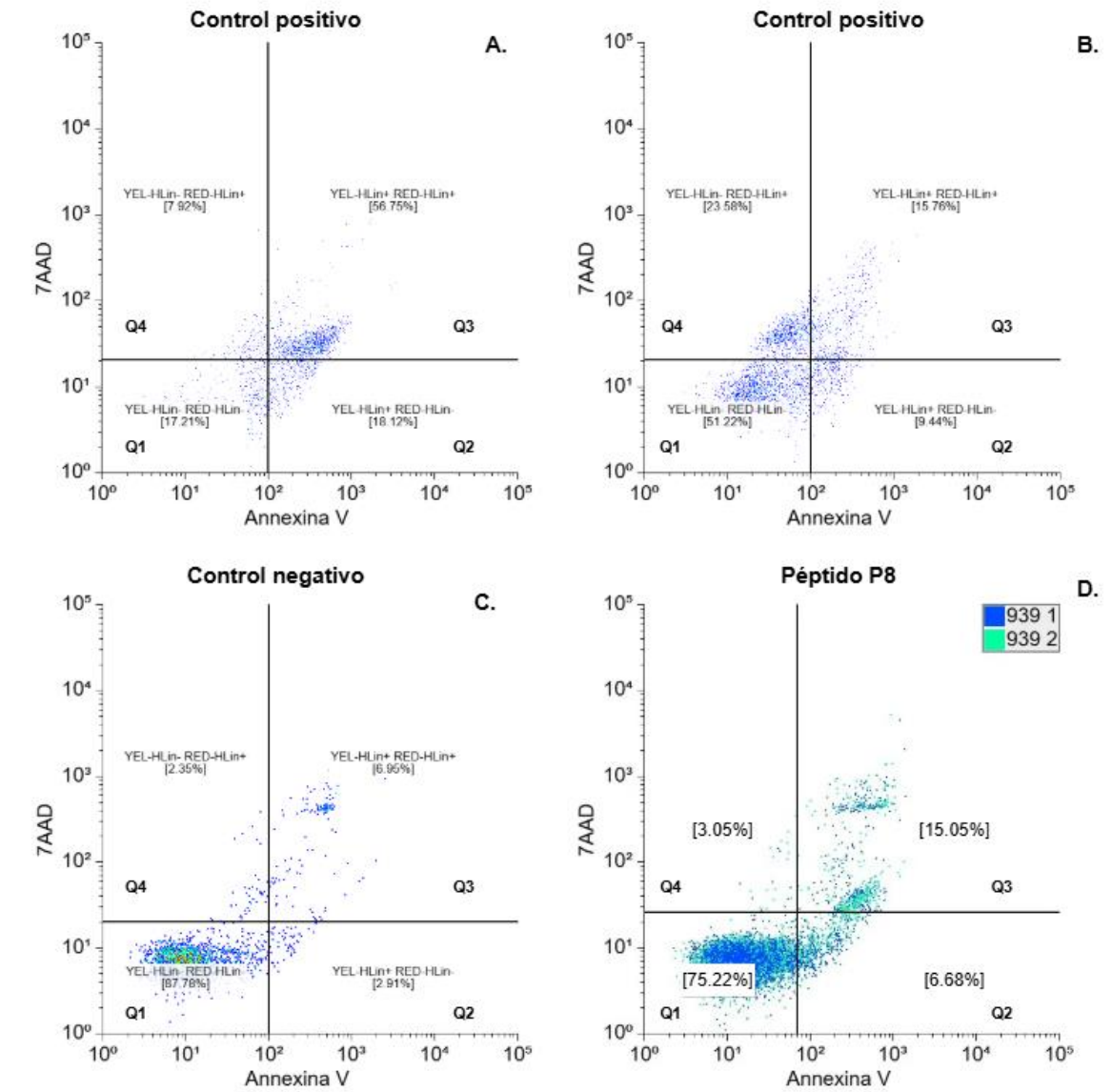


Ilustración 20. Ensayo de citometría de flujo para determinación de apoptosis/necrosis en células CCU HeLa tratadas con el péptido P8 a 200 $\mu\text{g/mL}$ a 15h de tratamiento. A. Histograma de células tratadas con cisplatino a 100 $\mu\text{g/mL}$. B. Histograma de células sin tratamiento. C. Células tratadas con tritón 1x. D. Células tratadas con el péptido P8. Q1: Eventos vivos, Q2: Eventos de apoptosis temprana, Q3: Eventos de apoptosis tardía, Q4: Eventos de necrosis

En la figura 20 se observan los diferentes eventos en distribuidos en cuatro cuadrantes, siendo Q1: eventos generados por células vivas, es decir, células que no recibieron ningún tipo de tratamiento, Q2: eventos apoptóticos tempranos donde solo hay exposición de fosfatidilserina, Q3: correspondiente a eventos de apoptosis tardía donde hay tanto exposición de fosfatidilserina como afectación de la membrana citoplasmática y Q4: donde se observan eventos necróticos que resulta de la pérdida significativa de la integridad de la membrana celular. La imagen A, muestra el dispersograma del tratamiento con cisplatino a

100µg/mL a 15 horas de tratamiento; este control positivo buscó evidenciar la apoptosis, la cual es evidente en el Q3 con un 53.75% y Q2 con 18.12%. Resultados consistentes con el desempeño que demostró el cisplatino frente a los otros dos quimioterápicos (metotrexato y paclitaxel), observándose que a concentraciones medias (>50 µg/mL) logra disminuir la viabilidad celular a menos del 60%, incluso a 15 horas de tratamiento. Así mismo, la imagen B corresponde al control positivo de necrosis; es evidente el desplazamiento de la nube hacia el Q4, el cual evidencia eventos necróticos con un 23.58% por compromiso de la integridad en la membrana celular tras ser tratadas con tritón 1x. La imagen C muestra las células vivas, las cuales no recibieron ningún tipo de tratamiento y es notoria su aglomeración en el cuadrante Q1 con un 75.22%.

En lo que respecta al péptido P8 (imagen D), se exhibió el efecto del péptido a 15 horas de tratamiento en la línea HeLa de cáncer de cuello uterino, donde se observa en el Q1 gran porcentaje de las células vivas tras la exposición al péptido, células que al tiempo de tratamiento aún no exteriorizan fosfatidilserina, pero tampoco presentan compromiso de la membrana plasmática. Sin embargo, se denota una tendencia de desplazamiento de la nube en el dispersograma hacia el Q2: 6.68%; cuadrante que corresponde a eventos de apoptosis temprana y Q3: 15.05%, el cual se relaciona con apoptosis tardía. Es decir que, a 15 horas de tratamiento con el péptido P8, hay una mayor exposición de la fosfatidilserina al exterior de la membrana, pero también un compromiso de la membrana citoplasmática. Estos resultados concuerdan con el comportamiento de efecto lento del péptido P8 ya evidenciado de los ensayos previos de viabilidad celular. Lo anterior nos sugiere que el efecto que ejerce el péptido P8 se asocia en mayor parte a eventos de apoptosis tardía pero también apoptosis temprana por encima de los eventos necróticos. Sin embargo, es importante considerar que este no es el único mecanismo asociado a la citotoxicidad del péptido, pero son los que se evidencian en mayoritariamente en el ensayo con este péptido.

6. Conclusiones

La conformación de quimeras peptídicas que integran la secuencia 15-23 de la Melitina (ALISWIKRK) junto con motivos mínimos de LfcinB y BFIIb demostró ser una estrategia efectiva para inducir citotoxicidad en la línea celular de cáncer de cuello uterino HeLa, así como permitió descartar algunas quimeras útiles contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, pero con poca o irrelevante actividad en células cancerosas. Como resultado, se

logró obtener dos péptidos con actividad importante, siendo estos el péptido P4: RLLR-ALISWIKRK, que exhibió una actividad rápida y fuertemente lítica frente a P8: RLLRC-ALISWIKRK-RRWQWR que demostró una actividad más lenta pero efectiva.

El péptido P8: RLLRC-ALISWIKRK-RRWQWR, no alcanzó la Concentración Inhibitoria Media (IC₅₀) a 2 horas de tratamiento a diferencia del péptido P4. Sin embargo, a 24 horas de tratamiento, P4 tiene un IC₅₀ de 37.92μM y P8 de 40.45μM, esto dice que los dos péptidos requieren concentraciones casi idénticas para inhibir a la mitad (50%) de forma *in vitro* la viabilidad celular de células de CCU HeLa, un punto importante que ajusta la brecha en diferencias de tiempos de acción de ambos péptidos. En ambos péptidos el efecto fue dependiente a la concentración. Sin embargo, el péptido P8 exhibió una disminución en su efecto citotóxico a 72 horas, sugiriendo una disminución en su efecto, aumentando la viabilidad celular. En comparación al péptido P4 que mantuvo la viabilidad celular baja (<50%) en todos los tiempos evaluados.

Pese a esto, el ensayo de selectividad demostró que P8 es un péptido selectivo con un muy bajo porcentaje de lisis de los glóbulos rojos en el ensayo de hemólisis frente a P4 que supera el umbral necesario para discriminar entre tipos celulares, lisando de forma inespecífica membranas neutras como la de los glóbulos. La modificación de algunos aminoácidos de la secuencia de P4 y su posterior ensayo, podría mejorar la actividad citotóxica en próximos estudios, modificando la carga neta e hidrofobicidad del péptido y, por ende, mejorando su selectividad.

Por último, los resultados obtenidos en el ensayo de necrosis/apoptosis permiten sugerir de forma preliminar que el mecanismo de acción asociado al efecto citotóxico del péptido P8 en células de CCU HeLa está mediado principalmente por eventos apoptóticos, aunque este no es el único mecanismo asociado a la citotoxicidad del péptido. Abordar en la expresión relativa de genes pro y anti apoptóticos en futuras investigaciones, ayudaría a elucidar aún más su posible mecanismo de acción.

7. Referencias bibliográficas

1. Johnson. CA, Deepthi. J, Marzan. M, Armaos. M. Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management. 2019. [citado el 22 de marzo 2024]. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0749208119300142#preview-section-cited-by>
2. Soombeer. S, Aakash. D, Sharma. A. Current treatment for Cervical Cancer: An Update. Volume 20, Issue 15, 2020. Page [1768-1779]. [citado el 22 de marzo 2024]. Disponible en: <https://www.eurekaselect.com/article/104741>
3. Ardila, A. Velasquez, C. Ortiz, P. Puerto de Amaya, M. Cervical cancer mortality in the Colombian Amazon. 2022. [citado el 22 de marzo 2024]. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0300-90412022000600486
4. Pardo C, de Vries E, Buitrago L, Gamboa O. Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia. Cuarta edición. Bogotá D. C. Instituto Nacional de Cancerología, 2017, v.1. p. 124. [citado el 22 de marzo 2024]. Disponible en: https://www.cancer.gov.co/recursos_user/files/libros/archivos/ATLAS_de_Mortalidad_por_cancer_en_Colombia.pdf
5. Espinosa, J. Sterling. L. Adherencia a la quimioterapia y radioterapia en pacientes oncológicos; 2012. [citado el 22 de marzo 2024]. Disponible en: <https://revistas.ucm.es/index.php/PSIC/article/view/37890/36658>
6. Cervical Cancer [Internet]. World Health Organization; 2024. [citado el 22 de marzo 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cervical-cancer>
7. Cáncer de cuello uterino [Internet]. Minsalud; 2025. [citado el 22 de marzo 2024]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/ssr/Paginas/Cancer-de-cuello-uterino.aspx>

8. Cervical Cancer Prevention and Control. Marañón. T, Cantillo. K, Barroso. Y, et al. 2017. [citado el 22 de marzo 2024]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/ccm/v21n1/ccm15117.pdf>
9. Número estimado de muertes 2022 a 2040, mujeres, edad |0-85+|. [Internet]. Agencia internacional para la investigación sobre el cáncer; 1965- 2024. [citado el 22 de marzo 2024]. Disponible en: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?types=1&single_unit=100&cancers=23&years=2040&sexes=2&populations=170
10. Burmeister. C, Khan. S, Schafer. G, Adam. T, et al. Terapias contra el cáncer de cuello uterino: desafíos actuales y perspectivas de futuro; 2022. [citado el 22 de marzo 2024]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35460940/>
11. Florea. A, Busselberg. D. Cisplatino como fármaco antitumoral. Mecanismos celulares de actividad, resistencia a fármacos y efectos secundarios. 2011. [citado el 22 de marzo 2024]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24212665/>
12. Wararat. C, Somchai. C, Suradej. H. Péptido anticancerígeno: propiedades fisicoquímicas, aspectos funcionales y tendencias en aplicaciones clínicas. 2020. [citado el 22 de marzo 2024]. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7384845/>
13. Farzana. S, Muhammad. N, Aqeel. A, Jabeen. A, Shah. Z, et, al. Synthesis of breast cancer targeting conjugate of temporin-SHa analog and its effect on pro- and anti-apoptotic protein expression in MCF-7 cells. 2018. [citado el 22 de marzo 2024]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196978118301281?via%3Dihub>
14. Casciaro. B, Loffredo. R, Cappiello. F, Guendalina. F, Torrini. L, Mangoni. M. The Antimicrobial Peptide Temporin G: Anti-Biofilm, Anti-Persister Activities, and Potentiator Effect of Tobramycin Efficacy Against *Staphylococcus aureus*. 2020. [citado el 22 de marzo 2024]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/24/9410>
15. Pineda. H. Péptidos quiméricos derivados de la lactoferricina bovina y buforina: Síntesis, caracterización y evaluación de su actividad antimicrobiana. 2019. [citado el 22 de marzo 2024]. Disponible en:

<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/76691/HectorPineda.2019.pdf?sequence=1>

16. Aguirre-Guataqui. K, Pineda Castañeda. H, Casanova- Vargas. Y, Marques-Torres. M, Rivera- Monroy. Z, Garcia- Castañeda. J, Parra-Giraldo. C. Chimeric Peptides Derived from Bovine Lactoferricin and Buforin II: Antifungal Activity against Reference Strains and Clinical Isolates of *Candida* spp. 2022. [citado el 22 de marzo 2024]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/11/1561>
17. Pan. W, Chen. W, Chen. L, Hsu. C, Lin. C, Chen. W. Bovine lactoferricin B induces apoptosis of human gastric cancer cell line AGS by inhibition of autophagy at a late stage. 2013. [citado el 22 de marzo 2024]. Disponible en: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(13\)00722-4/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(13)00722-4/fulltext)
18. M. A. León-Calvijo, A. L. Leal-Castro, G. A. Almanzar-Reina, J. E. Rosas-Pérez, J. E. García-Castañeda, Z. J. Rivera-Monroy, “Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Derived from Lactoferricin against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1–8, 2015. [citado el 15 de abril 2025]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25815317/>
19. J. H. Cho, B. H. Sung, and S. C. Kim, “Buforins: Histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1788, no. 8, pp. 1564–1569, 2009. [citado el 15 de abril 2025].
20. Wang. C, Yang. C, Chen. Y, Ma. L, Huang. K. Rational Design of Hybrid Peptides: A Novel Drug Design Approach. *Curr Med Sci.* 2019;39:349–55. [citado el 15 de abril 2025]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11596-019-2042-2>
21. Ardila-Chantré. N, Parra- Giraldo. C, Vargas- Casanova. Y, Barranga- Cardenas. A, Rivera- Monroy. Z, Garcia Castañeda, J. Hybrid peptides inspired by the RWQWRWQWR inhibit cervical cancer cells growth in vitro. 2024. [citado el 15 de abril 2025]. Disponible en: <https://www.explorationpub.com/Journals/eds/Article/100864>
22. Ramirez, D. Hybrid peptides derived from Melittin, Lactoferricin and/or Buforine: obtained via SPPS and click chemistry. 2025. [citado el 15 de agosto del 2025]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/items/bf8a1af2-187c-491f-bda8-02d5fad8eed2/full>

23. World Health Organization (WHO). Cervical Cancer. [citado el de abril 2025].
Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer>
24. Castellsagué. X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. Gynecol Oncol. 2008. [citado el 15 de agosto del 2025]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18760711/>
25. Ministerio de Salud y Protección Social. Guía de Práctica Clínica Para el Manejo del Cáncer de Cuello Uterino Invasivo. Guía No. GPC 2014. [citado el 15 de agosto del 2025]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/CA/gpc-cancer-cuellouterino-invasivo-padres.pdf>
26. Small. W, Bacon. M, Chuang. L, Fisher. B, Harkenrider. M, Jhingran. A, Kitchener. H, Mileskin. L, Vinswanathan. A, et al. Cervical Cancer: A Global Health Crisis. 2017. [citado el 14 de septiembre del 2025]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28464289/>
27. Marth. C, Landoni. F, Mahner. S, McCormack. M, Gonzales. A, Colombo. N, Cervical Cancer: ESMO Clinical Practices Guidelines of Diagnosis, Treatment and Follow-Up. 2017. [citado el 14 de septiembre del 2025]. Disponible en: [https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534\(19\)42148-0/fulltext](https://www.annalsofoncology.org/article/S0923-7534(19)42148-0/fulltext)
28. Ardila. N, Parra. C, Vargas. Y, Barragan. A, Fierro. R, Rivera. Z, Rivera. J, Garcia. J. Hybrid peptides inspired by the RWQWRWQWR sequence inhibit cervical cancer cells growth in vitro. 2024. [citado el 14 de septiembre del 2025]. Disponible en: <https://www.explorationpub.com/Journals/eds/Article/100864>
29. Duenas. G, Cetina. L, Coronel. J, Martinez. D. Pharmacotherapy options for Locally Advanced and Advanced Cervical Cancer. 2010. [citado el 14 de septiembre del 2025]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20205484/>
30. Markman. M. Advances in Cervical Cancer Pharmacotherapies. 2014. [citado el 14 de septiembre del 2025]. Disponible en: https://www.tandfonline.com/doi/10.1586/17512433.2014.884924?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed
31. Lau. J, Dunn. M,K. Therapeutic Peptides Historical Perspectives, Current Development Trends and Future Directions. 2018. [citado el 14 de septiembre del 2025]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089617310222?via%3Dihub>

32. Vlieghe. P, Lisowski. V, Martinez. J, Khrestchatisky, M. Synthetic Therapeutic Peptides: Science and Market. 2010. [citado el 14 de septiembre del 2025]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359644609003705?via%3Dihub>
33. Florea. A, Busselberg. D. Cisplatin as an Anti-Tumour Drug: Cellular Mechanisms of Activity Drugs Resistance and Induced Side Effects. 2011. [citado el 14 de septiembre del 2025]. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3756417/>
34. Henninot. A, Collins. J, Nuss. J. The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future. 2018. [citado el 14 de septiembre del 2025]. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.7b00318>
35. Barragan. A. Evaluación del efecto citotóxico de péptidos derivados de la secuencia LfcinB (21-25)pal: RWQWRWQWR frente a líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama. 2019. [citado el 14 de septiembre del 2025]. Disponible en: <https://bffrepositorio.unal.edu.co/server/api/core/bitstreams/c7512204-1fc6-4a48-9220-9a6645c34b07/content>
36. Chiangjong. W, Chutipongtanate. S, Hongeng. S. Anticancer peptide Physicochemical property, functional aspect and trend in clinical application. 2020. [citado el 14 de septiembre del 2025]. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7384845/>
37. Wang. A, Zheng. Y, Zhu. W, Yang. L, Yang. Y, Peng. J. Melittin- Based Nano Delivery Systems for Cancer Therapy. 2022. [citado el 14 de septiembre del 2025]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/1/118>
38. Kwon. N, Sung. S, Sung. H, Park. J. Anticancer Activity of Bee Venom Components against Breast Cancer. 2022. [citado el 14 de septiembre del 2025]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6651/14/7/460>
39. Sun. L, Wang. S, Zhu. H, Dai. L. Organizations of melitin peptides after spontaneous penetration into cell membranes. 2022. [citado el 14 de septiembre del 2025]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349522008220>

40. Tolos. A, Moisa. C, Dochia. M, Copolovici. Anticancer Potential of Antimicrobial Peptides: Focus on Buforins. 2024. [citado el 17 de febrero del 2026]. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10975211/>
41. Wanyan. Y, Xu. X, Liu. K, Zhang. H, Zhen. J. 2-Deoxy-D-glucose Promotes Buforin IIb- Induced Cytotoxicity in Prostate Cancer DU145 Cells and Xenograft Tumors. 2020. [citado el 17 de febrero del 2026]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/23/5778>
42. Li. D, Xu. Y. Buforin IIb induced cell cycle arrest in liver cancer. 2019. [citado el 17 de febrero del 2026]. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19768354.2019.1595139>
43. Barragan. C, Garcia. J. Evaluación del efecto citotóxico de péptidos derivados de la secuencia LFcInB (21-25) RWQWRWQWR frente a líneas derivadas de cáncer de mama. 2019. [citado el 17 de febrero del 2026]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/items/17e5797b-34db-4308-af0b-9fedbbc0f72a/full>
44. Roudi. R, Syn. N, Roudbary. M. Antimicrobial Peptides As Biologic and Immunotherapeutic Agents against Cancer: A Comprehensive Overview. 2017. [citado el 17 de febrero del 2026].
45. Bahar. A, Porbaran. M, Khazaei. M, Tahmasebi. H. Antimicrobial peptides for anticancer and antiviral therapy: last promising update. 2025. [citado el 17 de febrero del 2026].
46. Rady. I, Siddiqui. A, Mukhtar. H. Melitin, a major peptide component of bee venom and its conjugates in cancer therapy. 2017. [citado el 17 de febrero del 2026]. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5682937/#R42>
47. Pandey. P, Khan. F, Ahmad. M, Kumar. R, Upadhyay. T. An Updated Review Summarizing the Anticancer Efficacy of Melittin from Bee Venom in Several Models of Human Cancer. 2023. [citado el 20 de abril del 2026]. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10385528/>
48. Vadevoo. M, Gurung. S, Lee. H, Gunassekaran. G, Yoon. J. Peptides as multifunctional players in cancer therapy. 2023. [citado el 20 de abril del 2026].
49. Kong. G, Tao. W, Diao. Y, Fang. P, Ping. B. Melittin induces human gastric cancer cells apoptosis via activation of mitochondrial pathway. 2016. [citado el 20 de abril del 2026].

50. Mantegui. R, Kristo. K, Szakonyi. G. Recent insight strategies for the design of antimicrobial peptides (AMP's). 2022. [citado el 10 de abril del 2026].
51. Yin. L, Edwards. M, Li. Jessica, Yip. C, Deber. C. Peptide hydrophobicity, periodicity and charge influence on chemotherapeutic and antimicrobial activity. 2012. [citado el 20 de abril del 2026]. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3293554/>
52. Funch. S, Raines. R. Pathway for polyarginine Entry into Mammalian Cells. 2004. [citado el 20 de abril del 2026]. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2819928/>
53. Schmidt. S, Wallbrecher. R, Kuppevelt. T, Brock. R. Methods to Study the Role of the Glycocalyx in the uptake of Cell- Penetrating Peptides.[citado el 20 de abril del 2026]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26202266/>
54. Zhu. C. et al. Adding a C-terminal Cysteine (CTC) Can Enhance the Bactericidal Activity of Three Different Antimicrobial Peptides. 2018. [citado el 20 de abril del 2026]. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6031733/>
55. Cardenas. K, Castañeda. J. Síntesis y cribado de péptidos modificados derivados de lactoferricina bovina como fármacos citotóxicos contra líneas de cáncer de colon. 2024. [citado el 20 de abril del 2026]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/items/34ba4bd7-96ef-4440-b20f-214ee27ab781>
56. Organización Internacional de Normalización (ISO). Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO 10993-5). 2009. [citado el 20 de abril del 2026]. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en>
57. Tornesello, A. L., Borrelli, A., Buonaguro, L., Buonaguro, F. M., & Tornesello, M. L. Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities. 2020. [citado el 20 de abril del 2026]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/12/2850>
58. Riedl, S., Zweytick, D., & Lohner, K. Membrane-active host defense peptides- Challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. 2011. [citado el 20 de abril del 2026]. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3220766/>
59. Incidencia, mortalidad y prevalencia del cáncer en Colombia 2017-2021. 2025. [citado el 20 de abril del 2026]. Disponible en:

https://www.cancer.gov.co/?idcategoria=686&filtro_buscar=&filtro_fecha=0&filtro_antetitulo=Libros%20-%20Incidencia,%20mortalidad%20y%20prevalencia%20de%20c%C3%A1ncer%20en%20Colombia%20&filtro_autor=&btn_filtro=Filtrar%C2%A0

60. Cangesoli. G, Sacchini. F, Mancin. S, Amendola. A. Papillomavirus Vaccination Programs and Knowledge Gaps as Barriers to Implementation: A Systematic Review. 2025. [citado el 20 de abril del 2026]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-393X/13/5/460>
61. Dasari. S, Tchounwou. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. 2014. [citado el 20 de abril del 2026]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
62. Instituto Nacional del Cáncer. (2021). [citado el 20 de abril del 2026]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
63. American Cancer Society. (2020). [citado el 20 de abril del 2026]. Disponible en: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21590/>
64. Aykul, S., & Martinez-Hackert, E. Determination of half-maximal inhibitory concentration using titration curves. [citado el 22 de abril del 2026]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003269716301609?via%3Dihub>