



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología

“Diseño y síntesis de péptidos derivados de la defensina PaDef de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*), y evaluación de la citotoxicidad en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama”

TESIS

Para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias Biológicas
Área temática: Biotecnología Pecuaria

PRESENTA

QFB. Araceli Morales Hernández

Director: **Dr. Joel Edmundo López Meza**

Co-directora: **Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa**

Sinodales

Dr. Rodolfo López Gómez
Dr. Rafael Salgado Garciglia
Dra. María Soledad Vázquez Garcidueñas

Morelia, Michoacán, Mayo del 2022



El presente proyecto se realizó en las instalaciones del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. Joel Edmundo López Meza y la co-dirección de la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa. Para su realización se contó con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (14.5) y del CONACyT (FP-08-316003) y la beca número 758633.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACyT por otorgarme la beca número 758633 que me permitió seguir con mis estudios de maestría. También agradezco al CONACyT y a la Coordinación Científica de la UMSNH por el apoyo brindado a los proyectos que permitieron la realización de este trabajo.

Agradezco a mis asesores Joel y Alejandra por permitirme ser parte de este equipo de trabajo, por guiarme y proporcionarme el material y equipo necesarios para llevar a cabo este proyecto.

Gracias a mis sinodales por enriquecer este proyecto con sus comentarios y sugerencias.

Agradezco al grupo de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas de la Universidad Nacional de Colombia, en especial a los profesores Zuly, Javier y Diego por permitirme realizar parte de este proyecto en su grupo de trabajo y por enseñarme a sintetizar péptidos. Además, agradezco a Diego y Eri por recibirme en su hogar y hacer de mi estancia en Colombia una experiencia extraordinaria.

Gracias a mis compañeros del laboratorio por su compañerismo, por brindarme su amistad y por permitirme aprender de ellos, agradezco en especial a Pao por enseñarme a usar el citómetro y por acompañarme durante todos mis ensayos de citometría.

Finalmente, agradezco a mi familia. Gracias a mis papás por su apoyo incondicional y por permitirme lograr mis sueños, gracias también a mis tíos Medardo y Gris por recibirme en su casa y por sus consejos, gracias a mis abuelos por alentarme siempre a seguir adelante.

5.3	CULTIVO CELULAR	24
5.4	DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS PÉPTIDOS DERIVADOS DE PaDef EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7	24
5.5	DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE MUERTE INDUCIDA POR LOS PÉPTIDOS DERIVADOS DE PaDef EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 ...	25
5.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
6.	RESULTADOS	28
6.1	ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA DEFENSINA PaDef	28
6.2	DISEÑO Y SÍNTESIS DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA DEFENSINA PaDef	28
6.3	DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS PÉPTIDOS DERIVADOS DE PaDef EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7	300
6.4	EFFECTO DE LOS PÉPTIDOS 570 Y 1007 SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA DE LAS CÉLULAS MCF-7	344
6.5	EVALUACIÓN DE LA TASA DE APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS MCF-7 TRATADAS CON LOS PÉPTIDOS 570 Y 1007	366
7.	DISCUSIÓN	400
8.	CONCLUSIÓN	444
9.	MATERIAL SUPLEMENTARIO	465
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Incidencia de cáncer en el mundo del año 2020.	3
Figura 2. Características de las células cancerosas.....	5
Figura 3. Fuentes de péptidos antimicrobianos.	9
Figura 4. Mecanismos de acción membranolítico de los PAMs.	12
Figura 5. Mecanismos de acción no membranolíticos de los PAMs.....	12
Figura 6. Clasificación de las defensinas de plantas..	166
Figura 7. Características de la defensina PaDef de <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i>	20
Figura 8. El péptido 1007 es citotóxico para las células MCF-7 de cáncer de mama.....	322
Figura 9. El péptido 570 es citotóxico para las células MCF-7 de cáncer de mama.....	333
Figura 10. Efecto de los péptidos 570 y 1007 sobre la viabilidad de las células MCF-12F	344
Figura 11. Efecto del péptido 570 sobre el flujo de calcio y el potencial de membrana de las células MCF-7.....	35
Figura 12. Efecto del péptido 1007 sobre el flujo de calcio y el potencial de membrana de las células MCF-7.	366
Figura 13. Evaluación de la tasa de apoptosis inducida en células MCF-7 por el péptido 570.	377
Figura 14. Evaluación de la tasa de apoptosis inducida en células MCF-7 por el péptido 1007.	388
Figura 15. Los péptidos 570 y 1007 inducen la activación de las caspasas 8 y 9 en las células MCF-7.	39
Figura 16. Caracterización del péptido 1007.....	465
Figura 17. Caracterización del péptido 570.....	476
Figura 18. Caracterización del péptido 571.....	47
Figura 19. Caracterización del péptido 572.....	498
Figura 20. Caracterización del péptido 582.....	49
Figura 21. Caracterización del péptido 583.....	50
Figura 22. Caracterización del péptido 584.....	521
Figura 23. Caracterización del péptido 585.....	52
Figura 24. Caracterización del péptido 595.....	543
Figura 25. Caracterización del péptido 596.....	54
Figura 26. Efecto del péptido 462 en la viabilidad de las células MCF-7.....	55
Figura 27. Efecto del péptido 463 en la viabilidad de las células MCF-7.....	55
Figura 28. Efecto del péptido 484 en la viabilidad de las células MCF-7.....	56
Figura 29. Efecto del péptido 1001 en la viabilidad de las células MCF-7.....	56
Figura 30. Efecto del péptido 571 en la viabilidad de las células MCF-7.....	57
Figura 31. Efecto del péptido 572 en la viabilidad de las células MCF-7.....	57
Figura 32. Efecto del péptido 582 en la viabilidad de las células MCF-7.....	58
Figura 33. Efecto del péptido 483 en la viabilidad de las células MCF-7.....	58
Figura 34. Efecto del péptido 584 en la viabilidad de las células MCF-7.....	59

Figura 35. Efecto del péptido 585 en la viabilidad de las células MCF-7.....	59
Figura 36. Efecto del péptido 595 en la viabilidad de las células MCF-7.....	60
Figura 37. Efecto del péptido 596 en la viabilidad de las células MCF-7.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación molecular del cáncer de mama	6
Tabla 2. Tratamientos contra el cáncer de mama	7
Tabla 3. Clasificación de los PAMs derivados de plantas.....	14
Tabla 4. Características de los péptidos derivados de la defensina PaDef; Error! Marcador no definido.	
Tabla 5. Caracterización de los péptidos diseñados a partir del péptido 1007 de la defensina PaDef	300
Tabla 6. Actividad citotóxica de los péptidos derivados de PaDef en la línea celular MCF-7	311

RESUMEN

Existe una amplia variedad de péptidos antimicrobianos que pueden ser citotóxicos para las células cancerosas. Sin embargo, tienen limitaciones, como la inestabilidad y el alto costo de producción. Esto ha llevado a nuevas estrategias para el diseño *in silico* de péptidos anticancerígenos. En este trabajo se diseñaron 14 péptidos derivados de la defensina PaDef del aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*), utilizando el servidor web AntiCP 2.0. La actividad citotóxica de estos 14 péptidos se evaluó en la línea celular MCF-7. Solo los péptidos 570 y 1007 inhibieron la viabilidad de las células MCF-7 de forma dependiente de la concentración, con una IC50 de 133,41 μM para el péptido 570 y una IC50 de 218,89 μM para el péptido 1007. Ambos péptidos fueron citotóxicos en células MCF-7, a través de un proceso apoptótico dependiente de las caspasas 8 y 9, activando tanto la vía intrínseca como la extrínseca de la apoptosis. El efecto de los péptidos 570 y 1007 fue menor que el mostrado por la defensina completa PaDef. Sin embargo, estos péptidos cortos pueden reducir su inmunogenicidad y reducir los costos de producción. Por lo tanto, los péptidos 1007 y 570 podrían ser moléculas con potencial para el tratamiento del cáncer.

Palabras clave: cáncer de mama, péptidos antimicrobianos, citotoxicidad, defensina de aguacate, diseño de péptidos

ABSTRACT

There is a wide variety of antimicrobial peptides that can be cytotoxic to cancer cells. However, they have limitations, such as unstable and high production cost. This has led to new strategies for the *in silico* design of anticancer peptides. In this work, 14 peptides derived from the PaDef defensin from native Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*), were designed using the AntiCP 2.0 web server. The cytotoxic activity of these 14 peptides was evaluated on the MCF-7 cell line, and only peptides 570 and 1007 inhibited the viability of MCF-7 cells in a concentration-dependent manner, with an IC₅₀ of 133.41 μ M for peptide 570 and an IC₅₀ of 218.89 μ M for peptide 1007. Both peptides were cytotoxic in MCF-7 cells, through an apoptotic process dependent on caspases 8 and 9, activating both the intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis. The effect of peptides 570 and 1007 was lower than that shown by the PaDef complete defensin. However, these short peptides can reduce their immunogenicity and reduce production costs. Therefore, peptides 1007 and 570 could be molecules with potential for cancer treatment.

Keywords: breast cancer, antimicrobial peptides, cytotoxicity, avocado defensin, peptide design

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2018). Estimaciones recientes reportan 9.9 millones de muertes por esta enfermedad en 2020, siendo el cáncer de mama el tipo de cáncer con mayor prevalencia (Figura 1) (Global Cancer Observatory, 2020). Existen diversas técnicas que se han utilizado para combatir el cáncer, entre las que se encuentran la cirugía, radiación, quimioterapia y las terapias dirigidas. Sin embargo, estos enfoques tienen un índice terapéutico bajo y efectos secundarios graves (Al-Benna *et al.*, 2011; Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2015a; Zahreddine & Borden, 2013). Estas limitaciones han llevado a la búsqueda de nuevas terapias contra el cáncer. Una alternativa atractiva es el uso de péptidos antimicrobianos (PAMs), que representan una nueva familia de agentes anticancerosos que evitan las limitaciones de los tratamientos convencionales (Felício *et al.*, 2017).

Los PAMs son moléculas cortas y anfipáticas, constituyen una parte importante de la respuesta inmune innata (RII) de la mayoría de los organismos contra posibles patógenos, donde exhiben una actividad antimicrobiana directa (Kang *et al.*, 2017). Actualmente se han identificado más de 3,200 PAMs de diferentes organismos en la base de datos “The Antimicrobial Peptide Database” y aproximadamente el 7% son citotóxicos para células cancerosas (URL <https://aps.unmc.edu/>) (Flores-Alvarez *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2018). Los mecanismos oncológicos descritos para estos péptidos incluyen: la necrosis a través de la lisis de la membrana celular y la apoptosis (Shoombuatong *et al.*, 2018). Ambos mecanismos parecen depender de la presencia de lípidos aniónicos en la membrana, por lo que se cree que la selectividad de los PAMs hacia las células cancerosas radica en la atracción electrostática hacia la membrana debido a fosfolípidos aniónicos, como la fosfatidilserina que se encuentra en mayor proporción en la superficie de las células cancerosas (Deslouches & Di, 2017).

Sin embargo, a pesar de que los PAMs parecen ser prometedores en el tratamiento del cáncer, también enfrentan algunos desafíos, ya que debido a su naturaleza peptídica los PAMs son lábiles, por lo que pueden tener propiedades farmacocinéticas pobres y por su tamaño tienen

costos altos para su síntesis química. Estas limitaciones han llevado al diseño de nuevos péptidos anticancerosos que conservan las características de los péptidos antimicrobianos, pero con modificaciones que los hacen más estables y de longitudes más cortas (Deslouches & Di, 2017). En nuestro grupo de trabajo se ha descrito la actividad antimicrobiana y citotóxica del PAM PaDef derivado de la pulpa del aguacate nativo Mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*), el cual es una defensina tipo 1 con un péptido maduro de 47 aa.

A través de ensayos *in vitro* se determinó la actividad antimicrobiana de PaDef contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013). Por otro lado, se demostró su actividad citotóxica dependiente de la concentración contra células de cáncer de mama (MCF-7) y de leucemia mieloide crónica (K562). En el caso de las células MCF-7 indujo apoptosis a través de la vía intrínseca con una $IC_{50} = 141.62 \mu\text{g/ml}$ ($27.23 \mu\text{M}$), mientras que en las células K562 su actividad fue a través de la activación de la vía extrínseca de apoptosis con una IC_{50} de $97.3 \mu\text{g/ml}$ ($18.65 \mu\text{M}$) a las 24 h de exposición con el péptido (Flores-Alvarez *et al.*, 2018; Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016). Además, PaDef mostró un efecto citotóxico dependiente de la concentración para la línea celular Jurkat de células de leucemia linfocítica aguda con una IC_{50} de $47,3 \mu\text{M}$, donde indujo muerte celular por apoptosis dependiente de las caspasas 8 y 9, y la inhibición de la activación de la caspasa por los inhibidores de las caspasas 8 y 9 no revirtió la reducción de la viabilidad, lo que sugiere que otros mecanismos, además de la actividad de la caspasa, podrían estar participando en el efecto citotóxico de PaDef.

Por otro lado, PaDef aumentó la acetilación global de la histona 3, lo que sugiere que la actividad antiproliferativa de PaDef en la línea celular Jurkat podría estar relacionada con la modulación epigenética (Jiménez-Alcántar *et al.*, 2022). En este trabajo se diseñaron 14 péptidos derivados de la defensina madura PaDef y se evaluó su actividad citotóxica en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, con el fin de encontrar péptidos de menor tamaño y con una actividad citotóxica mejorada respecto al péptido maduro.

2. ANTECEDENTES

2.1. GENERALIDADES DEL CÁNCER

Cáncer es un término genérico que designa a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, cuya característica definitoria es la proliferación de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos (metástasis). En el año 2015, el cáncer fue reportado como la segunda causa de muerte en el mundo ocasionando 8.8 millones de defunciones, lo que equivale a casi una de cada seis defunciones registradas (Organización Mundial de la Salud, 2018). El último reporte del informe GLOBOCAN estimó que el número de casos nuevos de cáncer a nivel mundial aumentó a 19.2 millones y 9.9 millones de muertes en 2020, siendo el cáncer de mama el tipo de cáncer con mayor prevalencia (Figura 1) (Global Cancer Observatory, 2020).

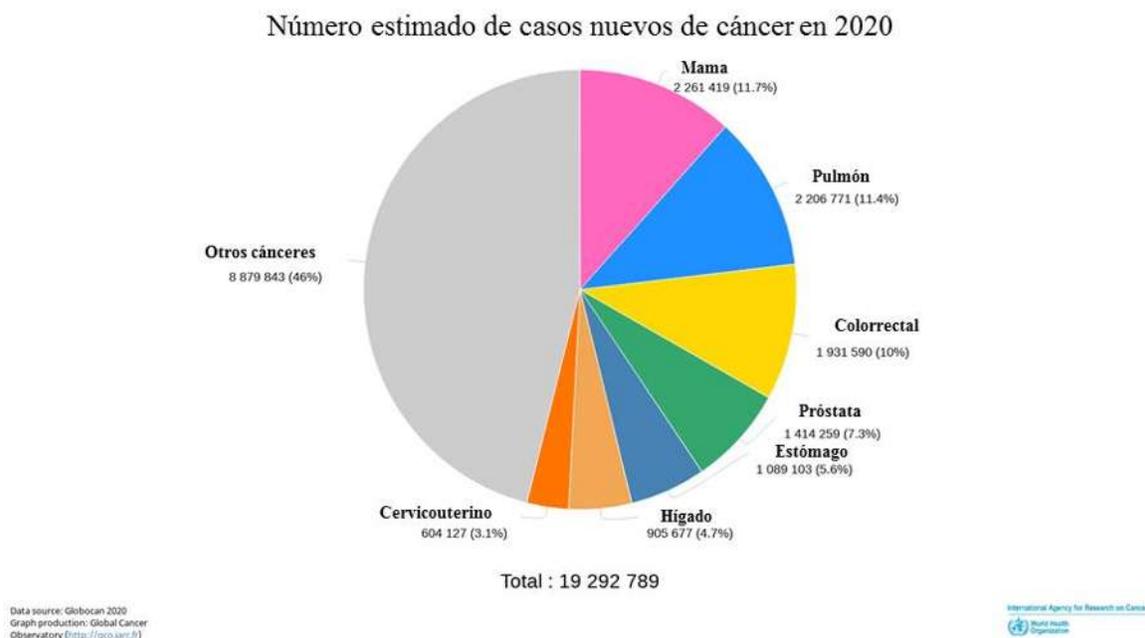


Figura 1. Incidencia de cáncer en el mundo del año 2020. En el año 2020 se registró un estimado de 19.2 millones de casos nuevos de cáncer en el mundo, siendo el cáncer de mama y el cáncer de pulmón los de mayor incidencia. Tomado de: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>) International Agency for Research on Cancer 2020.

El cáncer es una enfermedad que se origina como resultado de alteraciones tanto genéticas como epigenéticas que ocasionan fallas en los mecanismos que controlan el crecimiento y proliferación de las células. Este vínculo entre la genética y la epigenética en el cáncer queda más claro debido a que en el cáncer existen vías metabólicas y bioquímicas alteradas, además de mutaciones en genes que son actores epigenéticos (Stratton *et al.*, 2009; Lodish *et al.*, 2012; Ilango *et al.*, 2020). Las mutaciones responsables del desarrollo de cáncer se agrupan en 3 clases de genes: 1) los protooncogenes, que son genes que normalmente promueven el crecimiento y al adquirir mutaciones se convierten en oncogenes, cuyos productos son excesivamente activos promoviendo el crecimiento de las células; 2) los genes supresores de tumores que normalmente restringen el crecimiento de las células, por lo que las mutaciones que los inactivan permiten una división celular descontrolada; y 3) los genes cuidadores que normalmente protegen la integridad del genoma, pero cuando se inactivan las células adquieren mutaciones que causan la desregulación del crecimiento y la proliferación celular y conducen al cáncer (Lodish *et al.*, 2012). Las alteraciones epigenéticas que regulan los cambios hereditarios también son críticas para el desarrollo de todos los tipos de cáncer. Estas alteraciones incluyen patrones anormales de metilación del ADN, patrones interrumpidos de modificaciones postraduccionales de histonas (PTM) y alteraciones en la composición y organización de la cromatina (Ilango *et al.*, 2020).

1.1 CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER

La tumorigénesis en humanos es un proceso de múltiples pasos, por lo que se requiere más de una mutación o alteración genética, donde cada cambio genético le confiere a la célula algún tipo de ventaja para que se lleve a cabo la transformación de una célula normal a una célula cancerosa (Hanahan, 2022). Existen 14 características que distinguen a las células cancerosas de las células normales (Figura 2), estas son: sostener una señalización proliferativa al sobre expresar factores de crecimiento, evadir los supresores de crecimiento adquiriendo mutaciones que derivan en la pérdida de su función, desbloquear la plasticidad fenotípica para permitir varias formas de diferenciación interrumpida, reprogramación epigenética, desregulación del metabolismo celular, evitar la destrucción de las células cancerosas por acción del sistema inmune, resistir a la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, adquirir mutaciones múltiples, promover una respuesta

inflamatoria, senescencia celular, variación polimórfica en los microbiomas, inducir la angiogénesis y activar la invasión y metástasis (Hanahan, 2022).

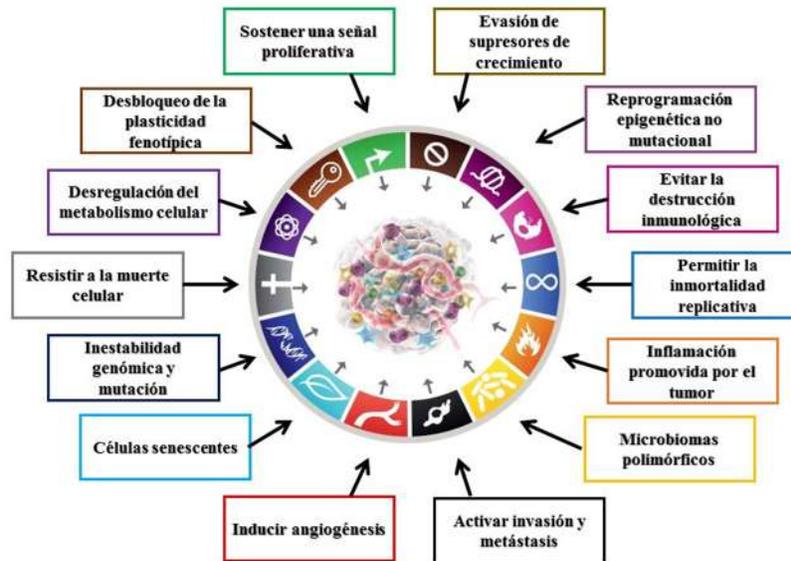


Figura 2. Características de las células cancerosas. En esta figura se muestran las características distintivas de las células cancerosas propuestas por Hanahan. Modificado de (Hanahan, 2022).

1.2 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más diagnosticado en el mundo y la principal causa de muerte en mujeres, se origina en las células epiteliales del tejido glandular de los senos. (Organización Mundial de la Salud, 2021). El cáncer de mama se clasifica de acuerdo a sus bases moleculares e histológicas en tres grupos, 1) cáncer de mama que expresa algún receptor hormonal como el receptor hormonal de estrógeno (ER) o el receptor hormonal de progesterona (PR), 2) cáncer de mama que expresa el receptor epidérmico humano 2 (HER2) y 3) cáncer de mama triple negativo que no expresa ningún receptor (Tabla 1). El tratamiento para el cáncer de mama se enfoca en las características moleculares que se presentan en las células aberrantes (Tabla 2) (Barzaman *et al.*, 2020).

Tabla 1. Clasificación molecular del cáncer de mama

Subtipos de cáncer de mama	Perfil de receptor	Prevalencia del subtipo
Positivo a hormonas	ER+ o PR+	60%
Positivo a HER2	HER2+	20%
Cáncer de mama triple negativo	ER-, PR- y HER2-	10-20%

* ER: receptor de estrógeno, PR: receptor de progesterona, HER2: receptor de crecimiento epidérmico humano.

1.3 TRATAMIENTOS CONTRA EL CÁNCER DE MAMA

Para tratar el cáncer de mama, se pretende principalmente erradicar el tumor y los ganglios linfáticos regionales y prevenir la metástasis. Por lo que el tratamiento a seguir para el control local consiste en resección quirúrgica y la extirpación de los ganglios linfáticos axilares y la posibilidad de aplicar radiación posoperatoria. La terapia sistémica se usa como neoadyuvante o adyuvante y es guiada por el subtipo de cáncer de mama (Tabla 2) (Ag & Ep, 2019). El cáncer de mama que expresa receptores hormonales es tratado mediante terapia endócrina. Los medicamentos más utilizados son el tamoxifeno que es un bloqueador de estrógenos que actúa inhibiendo de forma competitiva la unión de los estrógenos al receptor, y los inhibidores de la aromatasa (letrozol, anastrozol y exemestano) que disminuyen los niveles de estrógeno circulante al inhibir la conversión de andrógenos en estrógeno, lo que impide la producción de hormonas en el ovario. Sin embargo, algunos efectos secundarios graves de estos tratamientos son que aumentan el riesgo de contraer cáncer uterino, enfermedades tromboembólicas y osteoporosis (Ag & Ep, 2019; Barzaman *et al.*, 2020). En el caso de pacientes con cáncer de mama que expresan HER2, existen varios anticuerpos monoclonales antiHER2 como el trastuzumab y el pertuzumab, que se unen a diferentes sitios de HER2, ado-trastuzumab emtansina que es un anticuerpo monoclonal antiHER2 conjugado con mertansina, un inhibidor de microtúbulos. Sin embargo, el tratamiento estándar para los pacientes de cáncer de mama con HER2 positivo es una terapia combinada de anticuerpos monoclonales anti-HER2 y quimioterapia. Los efectos secundarios de los tratamientos antiHER2 van desde astenia, neuropatía sensorial, hasta insuficiencia cardíaca congestiva (Ag & Ep, 2019; Barzaman *et al.*, 2020). El tratamiento de cáncer de mama triple negativo

es el más desafiante en comparación con otros grupos de cáncer de mama. El tratamiento estándar para este grupo es la quimioterapia. Aunque un tratamiento alternativo podría ser una terapia combinada de quimioterapia y bevacizumab, el anticuerpo monoclonal humanizado recombinante contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La quimioterapia al no ser selectiva, puede provocar un gran número de efectos secundarios que pueden llevar a la muerte del paciente por falla cardíaca (Ag & Ep, 2019; Barzaman *et al.*, 2020).

Tabla 2. Tratamientos contra el cáncer de mama

Subtipos de cáncer de mama	Tratamiento	Desventajas
Positivo a hormonas	Terapia hormonal <ul style="list-style-type: none"> • Tamoxifen • Inhibidores de la aromatasas 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Suprime la función ovárica ❖ Riesgo de cáncer de cuello uterino ❖ No son selectivas para células cancerosas ❖ Resistencia terapéutica
	Anticuerpo monoclonal anti-HER2 y quimioterapia	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Solo es efectiva en una parte de la población ❖ Resistencia terapéutica ❖ Costoso
Cáncer de mama triple negativo	Quimioterapia	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Resistencia terapéutica ❖ No son selectivas para células cancerosas ❖ Índices terapéuticos bajos ❖ Efectos secundarios graves

1.4 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son péptidos pequeños que poseen menos de 100 residuos de aminoácidos. Pueden ser codificados por genes o generados a partir del procesamiento proteolítico. (Zhang *et al.*, 2019). Los PAMs constituyen una parte importante de la respuesta inmune innata de la mayoría de los organismos vivos contra posibles patógenos, donde exhiben una actividad antimicrobiana directa, ejercen una función mediadora y representan el sistema de defensa inicial del hospedero (Kang *et al.*, 2017). Su expresión se da como respuesta ante la presencia de una amplia gama de virus, bacterias, protozoos y hongos. Poseen principalmente actividad antimicrobiana; sin embargo, también se les ha descrito actividad antibiofilm, actividad inmunomoduladora y un porcentaje importante ha mostrado actividad anticancerosa (Peters *et al.*, 2010). Actualmente se han identificado más de 3,200 PAMs de diferentes organismos en la base de datos “The Antimicrobial Peptide Database” y aproximadamente el 7% son citotóxicos para células cancerosas (Figura 3) (URL <https://aps.unmc.edu/>) (Flores-Alvarez *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2018). Los PAMs presentan una gran variedad de estructuras y se clasifican en cuatro grandes grupos en función de su estructura secundaria: 1) péptidos α -helicoidales, 2) péptidos de lámina β , 3) péptidos de estructuras extendidas y 4) péptidos de asa. Los péptidos α -helicoidales carecen de residuos de cisteína, generalmente adoptan una estructura desordenada en solución acuosa, pero forman hélices anfipáticas en membranas o entornos que imitan a la membrana, algunos ejemplos son la magainina, la protegrina y LL-37. Los péptidos que contienen láminas β están compuestos por al menos dos cadenas β con 2-4 enlaces disulfuro entre las cadenas y forman estructuras relativamente rígidas. Este grupo incluye α y β -defensinas (que se encuentran en muchos vertebrados), algunos ejemplos son la drosomicina (que se encuentra en las moscas de la fruta) y las tioninas (aisladas de los cereales). Los PAMs extendidos, que son predominantemente ricos en aminoácidos específicos como prolina, triptófano, arginina, glicina e histidina, no tienen una estructura secundaria regular y pueden ser catiónicos o aniónicos en función de su carga neta. Algunos ejemplos son la apidaecina (de abejas y avispas), y la indolicidina. Los PAMs de asa, como la batenecina adoptan una formación de asa con un puente disulfuro intramolecular (Mishra *et al.*, 2018).

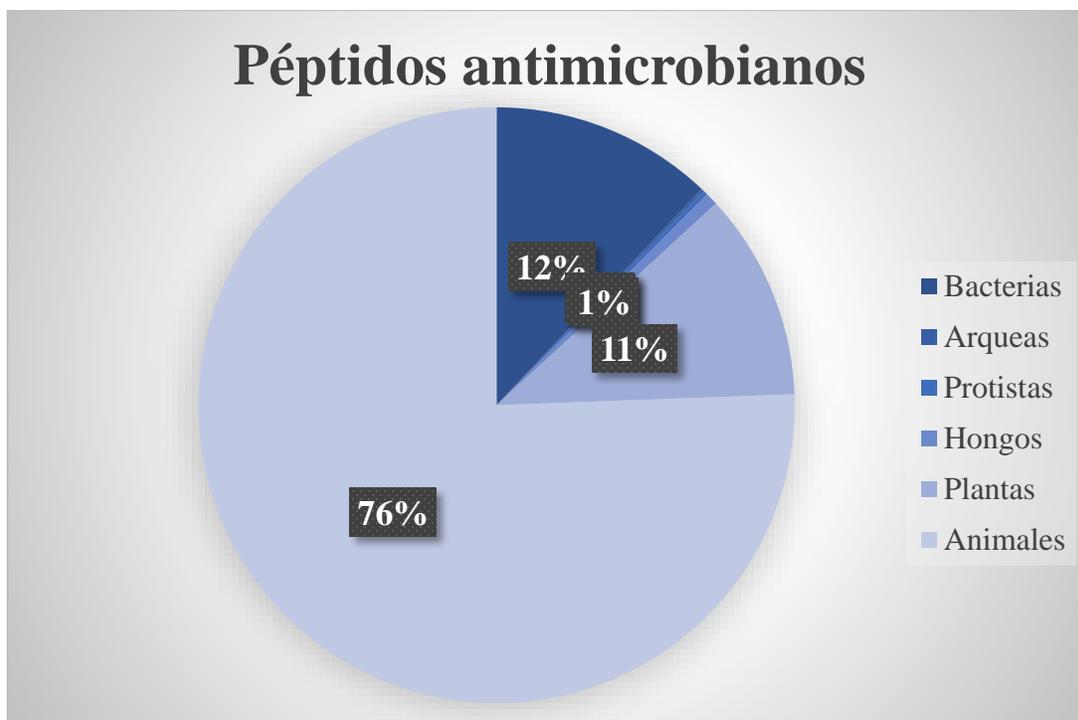


Figura 3. Fuentes de péptidos antimicrobianos. Modificado de Kumar *et al.*, 2018, actualizado a mayo de 2022. Números obtenidos de (<https://aps.unmc.edu/>) consultado el 05 de mayo de 2022.

El descubrimiento continuo de nuevos PAMs en diversos organismos, hace que estas moléculas sean elementos básicos para una nueva generación de tratamientos biomédicos, ya que poseen un amplio espectro de actividades biológicas, su breve período de interacción disminuye la probabilidad de resistencia, presentan una toxicidad selectiva para células cancerosas, lo que reduce los efectos secundarios. Estas propiedades refuerzan la importancia de su estudio y se sugieren como moléculas potenciales en el tratamiento contra el cáncer (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2015; Felício *et al.*, 2017).

Los PAMs tienen varias características estructurales que son esenciales para su actividad. Los PAMs tienen una carga neta positiva (de +2 a +9) debido a la presencia de aminoácidos como la lisina y arginina, que permite la atracción electrostática a las membranas de células cancerosas y microbianas cargadas negativamente, son relativamente inactivos contra las membranas celulares normales de los mamíferos, ya que poseen una carga neutral (Pushpanathan *et al.*, 2013; Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2017). Debido a que estas interacciones no están mediadas por receptores específicos, la conversión de enantiómeros L a D no necesariamente altera la capacidad de unión de los PAMs (Deslouches

& Di, 2017). Otra característica importante de los PAMs es que del 40-50 % de sus residuos son hidrófobos ordenados de tal manera que su forma plegada adquiere una estructura anfipática, lo que permite que el péptido interactúe con los núcleos hidrofóbicos de las membranas celulares (Al-Benna *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2018). Sin embargo, se ha mostrado que un aumento en la hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos de los PAMs se correlaciona con una baja selectividad y un aumento en la citotoxicidad en las células normales de mamíferos (Kang *et al.*, 2017). Es por esto que se ha propuesto que la selectividad de los PAMs hacia las células cancerosas radica en la diferencia de cargas con respecto a las células normales, ya que las células transformadas generalmente incorporan fosfatidilserina (PS) en un 3-9% de la cantidad total de fosfolípidos en la cara externa de la membrana plasmática. La PS generalmente se encuentra en la cara interna de la membrana citoplasmática de las células normales de mamíferos. Sin embargo, puede transferirse a la cara externa de la membrana plasmática de las células que sufren apoptosis, lo que interrumpe la asimetría observada para las membranas celulares de mamíferos normales. Este cambio en la asimetría generalmente es compartido por las células apoptóticas y varios tipos de células cancerosas y facilita el reconocimiento y la eliminación de estas células por los monocitos. Otros factores que pueden contribuir a elevar las cargas negativas en las células cancerosas incluyen los sulfatos de heparina y mucinas O-glicosiladas en la superficie de las células tumorales (Iwasaki *et al.*, 2009; Deslouches & Di, 2017). Además, las membranas de las células cancerosas a menudo contienen más microvellosidades por área de superficie, lo que mejora aún más la unión de los PAMs a las células cancerosas para aumentar su eficacia contra el cáncer (Zhang *et al.*, 2019).

Los PAMs se dividen en dos grupos diferentes de acuerdo al efecto que tienen sobre las membranas de las células. Los PAMs membranolíticos y los no membranolíticos (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2017). Para explicar la actividad de los PAMs membranolíticos se ha propuesto varios modelos que inducen la alteración de la membrana de las células cancerosas (Figura 4). En el modelo de "alfombra", los péptidos cargados positivamente se asocian primero con la membrana celular a través de interacciones electrostáticas y la cubren formando una alfombra local, después de alcanzar una concentración umbral particular, los péptidos se insertan en la membrana y la impregnan, lo que conduce a la formación de agujeros transitorios en la membrana. En el modelo de "poro

toroidal”, los péptidos asociados a la membrana inducen la despolarización y forman un poro transmembrana con forma toroidal que conduce a la formación de micelas y a la muerte celular. Otro modelo es el de “bastón” en el que los péptidos se unen a la superficie de la membrana celular orientándose de tal manera que sus residuos hidrofóbicos se dirigen hacia el núcleo lipídico de la membrana y los residuos hidrofílicos apuntan hacia adentro para formar canales o poros transmembranales llenos de agua que causan la liberación del contenido intracelular, y consecuentemente la muerte de la célula. Sin embargo, en contraste con los péptidos que utilizan el mecanismo de “alfombra”, los PAMs que usan este mecanismo no son selectivos y también lisan células normales (Pushpanathan *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2017; Sierra *et al.*, 2017). Existe otro modelo, el “agregado”, en el cual las interacciones electrostáticas entre los PAMs y la bicapa de fosfolípidos son seguidas de la formación de complejos de lípidos y péptidos que inducen a la formación de poros sin una orientación específica con formas y tamaños heterogéneos. Esto permite que los PAMs crucen transitoriamente la membrana y se dirijan a blancos intracelulares (Sierra *et al.*, 2017).

Además de estos diferentes mecanismos de alteración de la membrana, se han propuesto otros mecanismos (Figura 5). Los PAMs no membranolíticos pueden inhibir la síntesis de biomoléculas intracelulares y extracelulares como proteínas, ADN, ARN, bloquean la síntesis de la pared celular y provocan alteraciones en el metabolismo (Nan *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2019). Los PAMs también pueden aumentar el flujo de salida de K^+ y la acumulación de Ca^{+2} en el citoplasma y las mitocondrias, lo que produce la interrupción de la homeostasis del Ca^{+2} seguida de la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y la apoptosis de la célula. Otro mecanismo no membranolítico es la inhibición de la síntesis de ATP al interrumpir las actividades de la ATP sintasa o al bloquear la cadena de transferencia de electrones. El fracaso de la síntesis de ATP conduce a un daño del metabolismo energético. Además, los PAMs disminuyen la actividad de las enzimas dependientes de ATP al interactuar directamente con el ATP, por lo que los procesos celulares dependientes de ATP se bloquean (Zhang *et al.*, 2019). Los mecanismos oncológicos descritos para estos péptidos incluyen: la necrosis a través de la lisis de la membrana celular y la apoptosis (Shoombuatong *et al.*, 2018).

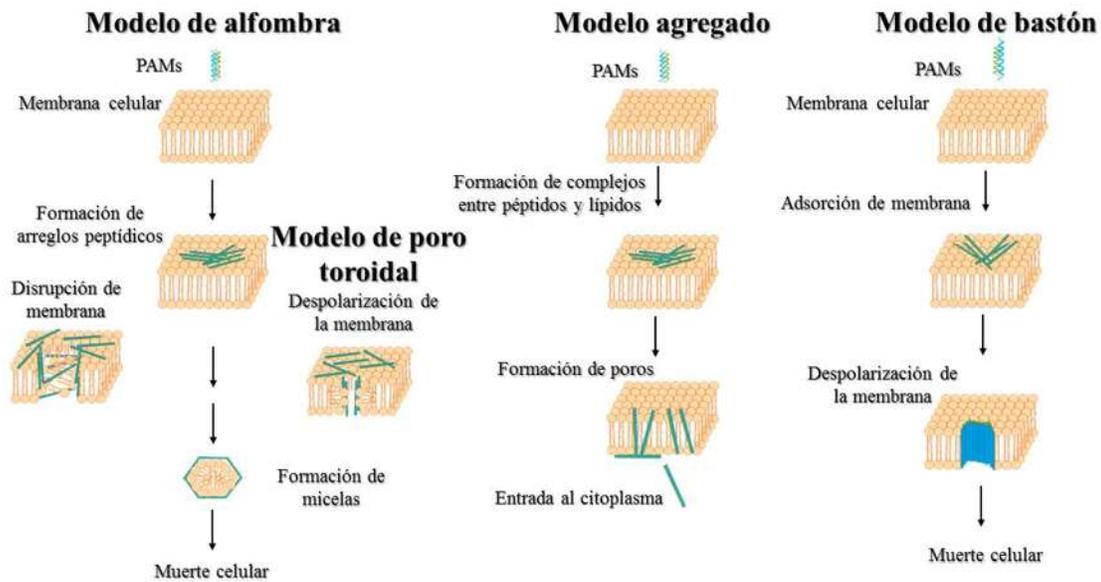


Figura 4. Mecanismos de acción membranólítico de los PAMs. En la figura se muestran los mecanismos membranólíticos que utilizan los PAMs para internalizarse en la membrana celular de las células cancerosas. Modificado de Pushpanathan *et al.*, 2013.

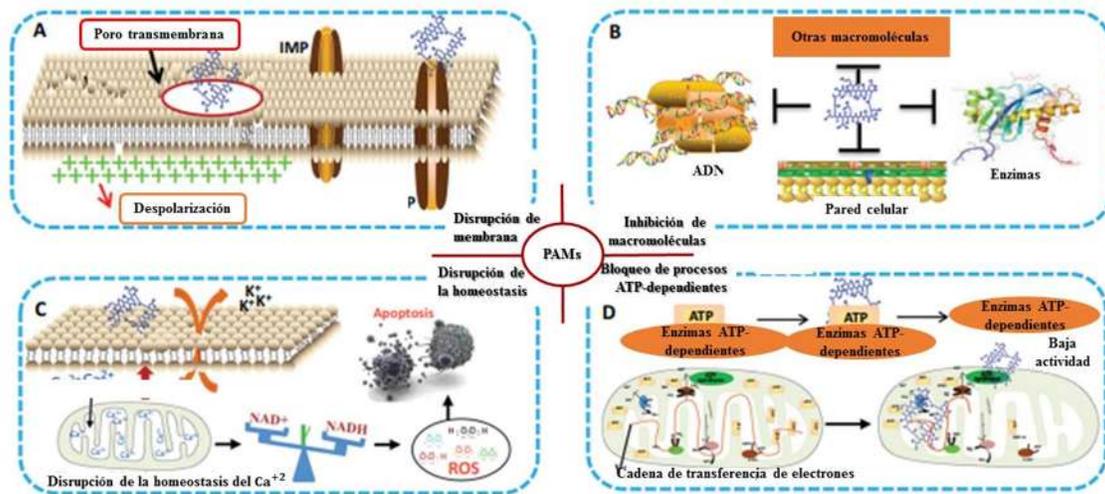


Figura 5. Mecanismos de acción no membranólíticos de los PAMs. En la figura se muestran los mecanismos membranólíticos que utilizan los PAMs para internalizarse en la membrana celular de las células cancerosas. Los PAMs pueden actuar a través de la disrupción de la membrana generando poros, la despolarización de la membrana o uniéndose a importantes proteínas de membrana (A). Los PAMs inhiben macromoléculas intracelulares o extracelulares, incluida la síntesis de ADN, enzimas, peptidoglucano, que es el precursor de la pared celular, y otras macromoléculas (B). Los PAMs también actúan interrumpiendo la homeostasis de las células al aumentar la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma y las mitocondrias (C). Los PAMs interactúan directamente con el ATP y luego disminuyen la actividad de las enzimas dependientes de ATP. Por otro lado, los PAMs bloquean la síntesis de ATP al interactuar con la ATP sintasa o al bloquear la cadena de transferencia de electrones (D). Figura modificada de Zhang *et al.*, 2019.

A pesar de que los PAMs muestran características prometedoras como agentes anticancerosos, solo pocos de ellos se han probado en modelos *in vivo*. La cecropina B *Hyalophora cecropia* aumenta el tiempo de supervivencia de los ratones portadores de células de adenocarcinoma de colon murino ascítico (Moore *et al.*, 1994). De la misma manera, se probó la actividad anticancerosa *in vivo* de péptidos derivados de la magainina 2 de *Xenopus* contra cuatro tumores de ascitis murina mostrando una supervivencia mejorada de los animales en un 45% (Baker *et al.*, 1993). En un estudio más reciente se demostró el papel de la defensina de *Drosophila* en el control de la progresión tumoral (Parvy *et al.*, 2019). Sin embargo, hay pocos datos sobre los efectos anticancerosos de los PAMs derivados de plantas.

1.5 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DERIVADOS DE PLANTAS

Los péptidos antimicrobianos de plantas se han aislado de raíces, semillas, flores, tallos y hojas de una amplia variedad de especies y han demostrado actividades hacia los fitopatógenos, así como contra organismos patógenos para humanos, virus, bacterias, hongos, protozoos, parásitos y células neoplásicas (Nawrot *et al.*, 2014). De los péptidos antimicrobianos de las plantas que se han caracterizado hasta la fecha, una gran proporción comparte características comunes. Generalmente son péptidos pequeños de 40-50 aminoácidos (<10 kDa), altamente básicos y ricos en residuos de cisteína (típicamente 4, 6 u 8). Estas cisteínas participan en la formación de enlaces disulfuro intramoleculares y proporcionan al péptido estabilidad estructural y termodinámica (Lay & Anderson, 2005). Se agrupan en 12 familias (Tabla 3) que muestran principalmente actividad bactericida y fungicida, pero las familias de las tioninas, defensinas y ciclótidos muestran citotoxicidad para células cancerosas (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2015).

Las tioninas no son selectivas, pero pueden ser una fuente de diseño de nuevas moléculas, mientras que la selectividad de los ciclótidos podría depender de su estructura primaria y la potencia se puede correlacionar con la habilidad de identificar y desorganizar la membrana celular. Por otro lado, las defensinas han mostrado mayor atención debido a su selectividad, pero aún hay pocos estudios que describan su mecanismo de citotoxicidad (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2015).

Tabla 3. Clasificación de los PAMs derivados de plantas

Familia	Enlaces disulfuro	Actividad
Tioninas	3-4	Bacterias, hongos y citotóxica
Defensinas	3-4	Bacterias, hongos y citotóxica
Ciclótidos	3	Bacterias, virus, insectos y citotóxica
Tipo Knotina	3	Bacterias Gram (+) y hongos
Seferdinas	0 (lineal)	Bacterias y hongos
MBP-1	2	Bacterias y hongos
Ib-AMPs	2	Bacterias Gram (+) y hongos
LTP	3-4	Bacterias y hongos
Snakinas	6	Bacterias y hongos
Tipo Heveína	4	Bacterias Gram (+) y hongos
Barriles β	6	Hongos
Albúminas 2S	2	Bacterias y hongos

Modificado de Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2015

1.6 DEFENSINAS VEGETALES

Las defensinas vegetales pertenecen a un grupo evolutivo de proteínas amplio y diverso llamado superfamilia cis-defensina, que se identificó utilizando similitud estructural y topología para detectar homología evolutiva remota. Las estructuras de las cis-defensinas varían, pero están construidas alrededor de un andamio central conservado. La estructura se conoce como CS $\alpha\beta$, y consta de una hélice α y tres láminas β antiparalelas en una configuración $\beta\alpha\beta\beta$ que se estabiliza mediante enlaces disulfuro intramoleculares, donde un par de cisteínas en un motivo CxC en el filamento final de la lámina β antiparalela forman un par de enlaces disulfuro a las cisteínas en una hélice α (Lay & Anderson, 2005; Parisi *et al.*, 2019). Las defensinas vegetales están formadas por 45-54 residuos de aminoácidos y se mantienen unidos por cuatro enlaces disulfuro. Estos enlaces disulfuro hacen que la molécula sea altamente estable a las proteasas y a los cambios de pH y temperatura (Parisi

et al., 2019). Además del motivo CS $\alpha\beta$, las defensinas vegetales también tienen otra región conservada y caracterizada, llamada γ -core, que tiene la secuencia conservada GXCX₃₋₉C, donde X puede ser cualquier residuo de aminoácido. Algunos estudios han demostrado que la región responsable de la actividad biológica de las defensinas vegetales reside en la región del γ -core (de Oliveira Mello *et al.*, 2019). (Sagaram *et al.*, 2011), demostraron que los principales determinantes de la actividad antifúngica de MsDef1 y MtDef4 (defensinas de *Medicago sativa* y *M. truncatula*, respectivamente) residen en sus motivos de γ -core. Por otro lado, de Oliveira Mello *et al.* (2019) realizaron un estudio en el que pretendían mejorar la actividad de la defensina PvD₁ derivada de *Phaseolus vulgaris*, reportaron que la actividad antifúngica de PvD₁ no está estrictamente localizada en el motivo γ -core y que el incremento en la carga neta positiva del péptido está directamente relacionado con la actividad antifúngica. Estos datos muestran que aún hay mucho por aprender acerca de la actividad biológica de las defensinas de plantas.

Las defensinas se clasifican en dos clases dependiendo de la estructura de las proteínas precursoras de las que son derivadas (Figura 6). Las defensinas vegetales de clase I es el grupo más grande y comprenden una secuencia señal del retículo endoplasmático y un dominio de defensina maduro. Por el contrario, las defensinas de clase II se producen a partir de precursores más grandes con una secuencia de señal del retículo endoplasmático junto con un dominio de defensina maduro y un pro-dominio C-terminal (CTPP) de 27-33 aminoácidos. Las defensinas de clase I se dirigen a la vía secretora, carecen de señales para modificaciones postraduccionales o direccionamiento subcelular y se acumulan en las paredes celulares y el espacio extracelular. Las defensinas de clase II están dirigidas a la vacuola por el CTPP, donde se procesan proteolíticamente para liberar la defensina madura y se almacenan (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2015; Parisi *et al.*, 2019).

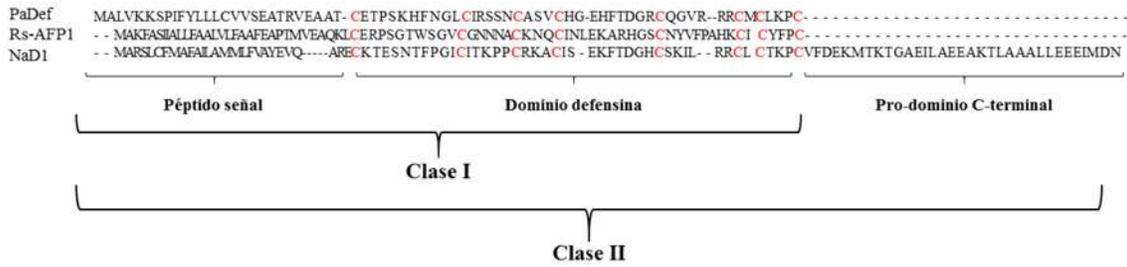


Figura 6. Clasificación de las defensinas de plantas. Las defensinas de plantas se clasifican en dos clases dependiendo de la estructura de las defensinas precursoras. Figura modificada de Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013.

1.7 ACTIVIDAD ANTICANCEROSA DE LAS DEFENSINAS VEGETALES

La primera defensina de plantas que se reportó con actividad anticancerosa fue la sesquina aislada de *Vigna sesquipedalis*, que mostró inhibición de la proliferación en células de cáncer de mama (MCF-7) y leucemia M1 (2.5 mg/mL) (Wong & Ng, 2005). Además, se reportó que la defensina limenina aislada de *Phaseolus limensis* presentó inhibición diferenciada de la proliferación en células de leucemia L1210 en un 60% y en células de mieloma M1 en un 30% (Wong & Ng, 2006). PvD₁ es una defensina vegetal aislada de las semillas de frijol que mostró un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y la diseminación metastásica de las células de cáncer de mama (Figueira *et al.*, 2017). Psd1 es una defensina de la planta del guisante que inhibió el crecimiento de células cancerosas tanto A-431 como B16F10 de una manera dependiente de la concentración, sin promover el daño a los linajes de células sanas. Así mismo, Psd1 inhibió completamente la formación de nódulos de metástasis pulmonar B16F10 en ratones en concentraciones superiores a 0.5 mg/kg cuando se administró por vía intravenosa (do Amaral *et al.*, 2020). La javanicina recombinante ejerció actividad antiproliferativa contra las líneas celulares de cáncer de mama humano MCF-7 y MDA-MB-231 (Orrapin *et al.*, 2019). Un péptido con homología a la secuencia de las defensinas aislado del frijol polar morado extra largo (*Phaseolus vulgaris*) inhibió la proliferación de células de hepatoma (HepG2) con una IC₅₀ de 4.1 µM, y en las células de cáncer de mama (MCF7) con una IC₅₀ de 8.3 µM (Lin *et al.*, 2009). Otra defensina con actividad anticancerosa es la defensina del tabaco ornamental *Nicotiana alata* NaD1 que induce la muerte celular de tipo necrótico en varios tipos de células tumorales dentro de los 30 minutos posteriores al tratamiento, a concentraciones de 10 µM (Baxter *et al.*, 2017). De igual manera, la defensina

de tomate TPP3 induce muerte celular a través de la lisis de la membrana en células de cáncer de cuello uterino epitelial humano (HeLa) y células de linfoma monocítico de leucemia (U937) a concentraciones de 10 μ M, mediante la unión exclusiva al fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (Baxter *et al.*, 2015).

1.8 DISEÑO DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS COMO AGENTES TERAPEÚTICOS

Los PAMs poseen muchas ventajas para el desarrollo de fármacos anticancerosos, ya que poseen una alta selectividad hacia células cancerosas, una amplia potencia y baja toxicidad (Wu *et al.*, 2014). Sin embargo, también enfrentan algunos desafíos ya que debido a su naturaleza peptídica los PAMs son lábiles y probablemente tienen propiedades farmacocinéticas pobres, son caros de fabricar y no reconocen receptores específicos (Deslouches & Di, 2017). Para superar estas desventajas de los PAMs, se ha optado por diseñar un gran número de péptidos cortos que afectan selectivamente a las células cancerosas. Estas terapias tienen una serie de beneficios sobre los PAMs de longitud completa y otras moléculas quimioterapéuticas. Los péptidos anticancerosos cortos, en comparación con los PAMs y los anticuerpos de longitud completa, son menos inmunogénicos, más estables en almacenamiento a temperatura ambiente y tienen una mejor permeabilidad de los tumores. Además, la producción de péptidos cortos es más rentable (Fisher *et al.*, 2019).

En este contexto, para diseñar un péptido que sea económica y terapéuticamente viable, se requiere que el péptido cumpla con ciertas características como: a) identificar la secuencia mínima de aminoácidos que posea actividad biológica para obtener péptidos cortos que sean más fáciles de sintetizar y con un menor costo de fabricación; b) que el péptido posea una carga neta positiva adecuada para dirigir la unión del péptido a las células cargadas negativamente y que sea anfipático para que conserve las características originales de los PAMs; c) realizar modificaciones que mejoren la estabilidad y biodisponibilidad del péptido, y así obtener como resultado fármacos anticancerosos mejorados con una mayor selectividad para las células neoplásicas y una reducción de los efectos nocivos sobre los tejidos sanos (Gaspar *et al.*, 2013; Deslouches & Di, 2017).

En cuanto a la estrategia para obtener péptidos cortos, existen tres formas de hacerlo: péptidos naturales derivados de fragmentos de proteínas de plantas, animales o humanos; péptidos producidos mediante tecnologías de ADN recombinante; y péptidos obtenidos por síntesis química. De estas estrategias la que tiene más ventajas es la obtención de péptidos mediante síntesis química, ya que los péptidos sintéticos tienen una diversidad estructural más amplia, mediante la síntesis química se puede modificar un péptido para mejorar o cambiar sus efectos farmacológicos, y es el método de obtención de péptidos más rentable (Fisher *et al.*, 2019).

Se ha reportado el diseño de péptidos cortos derivados de PAMs que mejoran su actividad al ser modificados. Fadnes *et al.* (2011), evaluaron la actividad anticancerosa de tres péptidos de 9 aminoácidos modificados químicamente a partir de la lactoferricina bovina (LfcinB), observaron que los tres péptidos mostraban una actividad citotóxica mejorada debido a que su tamaño reducido mejoró su internalización en la membrana. En otro estudio se analizó el efecto anticanceroso de FK-16, un fragmento de la catelicidina humana LL-37. FK-16 mostró una mejor actividad anticancerosa que el péptido completo a través de la inducción de apoptosis dependiente de AIF/EndoG y la muerte celular autofágica a través de la cascada común p53-Bax/Bcl-2 en células de cáncer de colon (Ren *et al.*, 2013). Por otro lado, Vargas Casanova *et al.* (2017), mostraron que el diseño de péptidos polivalentes derivados de la lactoferricina B que contienen el motivo mínimo de actividad, aumenta la actividad citotóxica de los péptidos en líneas celulares de cáncer de mama. Así mismo, en un estudio más reciente se encontró que al aumentar la anfipaticidad de estos péptidos diméricos al intercambiar residuos de metionina por residuos menos polares como el triptófano, fenilalanina y leucina, aumenta el efecto citotóxico del péptido (Insuasty-Cepeda *et al.*, 2020). Otras estrategias incluyen la ciclación de extremo a extremo y la amidación C-terminal que pueden conferir estabilidad peptídica al disminuir la susceptibilidad a la digestión de la proteasa (Deslouches & Di, 2017). Recientemente Agrawal *et al.* (2020) propusieron un modelo de predicción *in silico* que es útil para predecir y diseñar péptidos anticancerosos, para implementar este modelo realizaron un análisis de composición de residuos de los péptidos anticancerosos descritos en las bases de datos que muestra la preferencia de A, F, K, L y W, los residuos A, F y K se favorecen en el extremo N y los residuos L y K se prefieren en el extremo C. Además el análisis de motivos reveló la presencia de motivos como LAKLA, AKLAK, FAKL y

LAKL en los ACP. Este modelo se implementó en el servidor web AntiCP 2.0 que está disponible en URL: <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/anticp2/> (Agrawal *et al.*, 2020).

1.9 DEFENSINA PaDef DEL AGUACATE NATIVO MEXICANO (*Persea americana* var. *drymifolia*)

En nuestro grupo de trabajo se ha descrito la actividad antimicrobiana y citotóxica del PAM PaDef derivado de la pulpa de aguacate nativo Mexicano, la cual es una defensina tipo 1 con un péptido maduro de 47 aa, de los cuales 8 son cisteínas, por lo que puede formar 4 puentes disulfuro; además, posee una estructura CS $\alpha\beta$ y el motivo “ γ -core” característico de las defensinas (Figura 7). A través de ensayos *in vitro* se determinó la actividad antimicrobiana de PaDef contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013). Por otro lado, se demostró su actividad citotóxica dependiente de la concentración contra células de cáncer de mama (MCF-7) y de leucemia mieloide crónica (K562). En el caso de las células MCF-7 indujo apoptosis a través de la vía intrínseca con una IC₅₀ = 141.62 $\mu\text{g/ml}$ (27.23 μM), mientras que en las células K562 su actividad fue a través de la activación de la vía extrínseca de apoptosis con una IC₅₀ de 97.3 $\mu\text{g/ml}$ (18.65 μM) a las 24 h de exposición con el péptido. Cabe mencionar que PaDef no mostró citotoxicidad frente a las células mononucleares de sangre periférica, lo que sugiere selectividad ante las células cancerosas (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016; Flores-Alvarez *et al.*, 2018). En un estudio más reciente, PaDef mostró un efecto citotóxico dependiente de la concentración para la línea celular Jurkat de células de leucemia linfocítica aguda con una IC₅₀ de 47.3 μM , donde indujo muerte celular por apoptosis dependiente de las caspasas 8 y 9, y la inhibición de la activación de la caspasa por los inhibidores de las caspasas 8 y 9 no revirtió la reducción de la viabilidad, lo que sugiere que otros mecanismos, además de la actividad de la caspasa, podrían estar participando en el efecto citotóxico de PaDef. Por otro lado, PaDef aumentó la acetilación global de la histona 3, lo que sugiere que la actividad antiproliferativa de PaDef en la línea celular Jurkat podría estar relacionada con la modulación epigenética (Jiménez-Alcántar *et al.*, 2022).

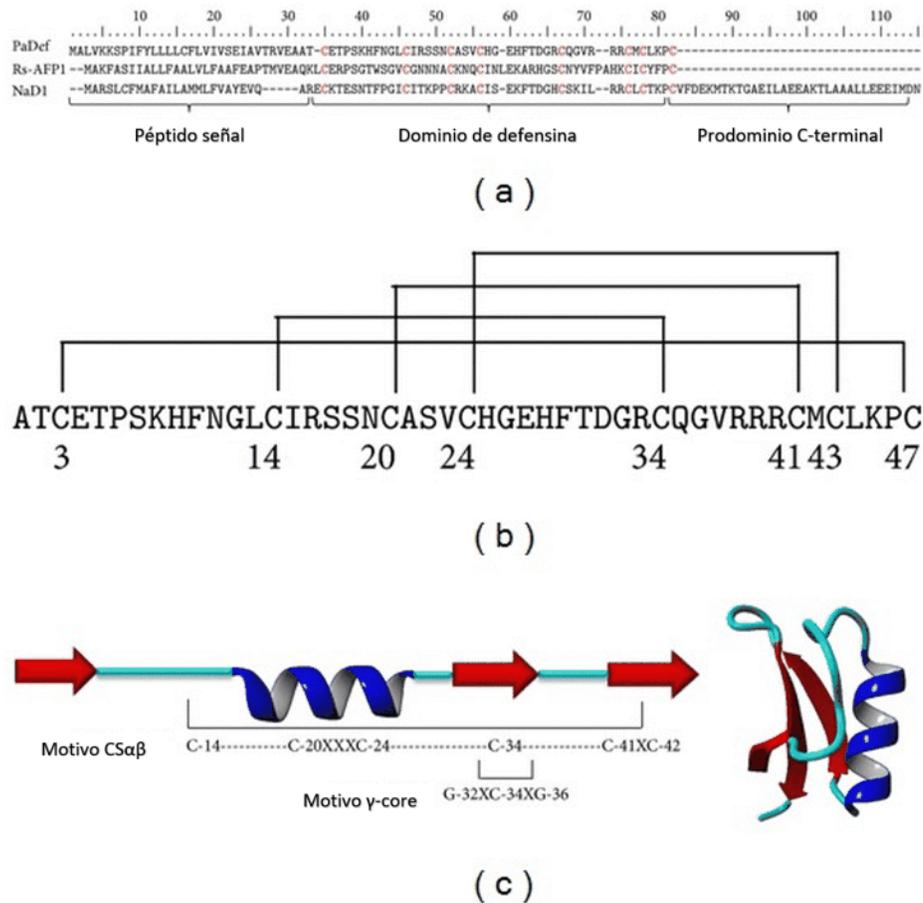


Figura 7. Características de la defensina PaDef de *Persea americana* var. *drymifolia*. (a) Alineación de la defensina PaDef con el holotipo defensina tipo 1 (*Raphanus sativus* Rs-AFP1) y el holotipo defensina tipo 2 (*Nicotiana glauca* NaD1). En rojo, se indican las 8 cisteínas conservadas. (b) Predicción de puentes disulfuro de la defensina PaDef. (c) Organización estructural del péptido defensina PaDef. Izquierda: estructura secundaria que muestra el motivo característico CSαβ de las defensinas. Las flechas rojas indican las hojas β y en azul se muestra la hélice α. Derecha: modelo de homología del péptido defensina PaDef. Figura tomada de Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2013.

Con base en los resultados obtenidos anteriormente se propone que al obtener péptidos más pequeños de la defensina PaDef de *P. americana* var. *drymifolia* se mejore la actividad citotóxica del péptido según lo ya descrito por otros autores (Fadnes *et al.*, 2011; Gaspar *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2013).

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente las terapias convencionales para el tratamiento del cáncer suelen tener índices terapéuticos bajos y provocan efectos secundarios graves; esto debido a que por lo regular son terapias sistémicas que no distinguen entre células cancerosas y células sanas, además de que generan resistencia terapéutica. Es por esto que es importante encontrar nuevos fármacos terapéuticos más selectivos y eficientes. En este sentido, los péptidos antimicrobianos (PAMs) han demostrado tener una citotoxicidad selectiva para las células cancerosas, disminuyendo con ello la selección de resistencia a múltiples fármacos, además de que poseen efectos aditivos en la terapia combinada. Sin embargo, para que un PAM sea económica y terapéuticamente viable se requiere de moléculas pequeñas con penetración y absorción eficiente para las células cancerosas. En este proyecto se evaluó la actividad citotóxica de péptidos pequeños derivados de la defensina PaDef de aguacate nativo Mexicano en la línea celular MCF-7, la cual en estudios previos de nuestro grupo de trabajo mostró actividad citotóxica mediante la inducción de apoptosis en esta línea celular.

3. HIPÓTESIS

El diseño de péptidos derivados de la defensina PaDef de aguacate nativo Mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) permite obtener moléculas pequeñas con una actividad citotóxica mejorada en comparación con el péptido maduro en células de cáncer de mama MCF-7 a través de la inducción de apoptosis.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la actividad citotóxica de péptidos derivados de la defensina PaDef de aguacate nativo Mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) en la línea celular MCF-7, así como determinar el modo de muerte activado.

4.1.1. Objetivos Específicos

1. Diseñar *in silico* péptidos con actividad anticancerosa a partir de la secuencia de la defensina PaDef de aguacate nativo Mexicano.
2. Determinar la citotoxicidad de los péptidos derivados de la defensina PaDef contra la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.
3. Establecer el modo de muerte y el mecanismo inducido por los péptidos derivados de la defensina PaDef en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 DISEÑO DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA DEFENSINA PaDef

Para la obtención de péptidos, primero se diseñaron 3 fragmentos del péptido PaDef (ATCETPSKHFNGLCIRSSNCASVCHGEHFTDGRCQGVRRCMCLKPC, 47 aa) (Genbank KC007441) que consistieron en la región amino terminal (péptido 463, 24 aa), la región carboxilo terminal (péptido 462, 23 aa) y el motivo γ -core (péptido 484, 12 aa) (Tabla 4). Los criterios considerados en el diseño fueron: 1) que posean el N-terminal libre; 2) la región C-terminal amidada; y 3) sus cisteínas reducidas. Además, se consideró que alguno de los péptidos contenga el motivo “ γ -core” característico de las defensinas.

Asimismo, se analizó la secuencia del péptido maduro de PaDef en el servidor web AntiCP 2.0 (URL: <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/anticp2/>) y se diseñaron 2 fragmentos de PaDef con la mejor predicción de citotoxicidad de acuerdo a los parámetros del programa (péptidos 1001 y 1007) (Tabla 4). Así mismo, se hicieron modificaciones de aa a esos dos péptidos con el objetivo de aumentar la carga y la proporción hidrofóbica, algunos péptidos se diseñaron intercambiando aa al azar por aa hidrofóbicos y catiónicos o haciendo dímeros (péptidos 570, 571, 572, 595 y 596) (Tabla 4), y se evaluaron en el servidor web AntiCP 2.0. Otros péptidos se diseñaron al cambiar las cisteínas del péptido 1007 con glicina y serina, para evaluar si las cisteínas jugaban un papel importante en el efecto citotóxico del péptido 1007 en las células MCF-7 (péptidos 582, 583, 584 y 585) (Tabla 4), y se analizaron en el servidor web AntiCP 2.0. También, para corroborar la eficiencia del servidor web AntiCP 2.0 se evaluaron 2 péptidos que ya habían sido reportados con efecto anticanceroso (Tabla 4).

5.2 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

Los péptidos 462, 463, 484, 570, 571, 572, 582, 583, 584, 585, 595 y 596 fueron químicamente sintetizados y obtenidos durante una estancia en el Departamento de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP) de la Universidad Nacional de Colombia, en Bogotá. Se sintetizaron mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS-Fmoc/tBu). Se utilizó una resina Rink amida (0.46 meq/g) como soporte sólido. Sobre este soporte, se realizó un alargamiento de las secuencias peptídicas mediante etapas sucesivas de (i) desprotección del grupo alfa-amino, eliminando el grupo Fmoc en condiciones básicas con 4-metilpiperidina al 2.5% (v/v), (ii) activación del aminoácido Fmoc con DCC y 6-Cl-HOBt

en DMF y DCM (1:1), (iii) acople del aminoácido a la cadena de soporte sólido en crecimiento realizando una reacción asistida por microondas. Posteriormente, los péptidos se escindieron de la resina mediante la adición de TFA / H₂O / TIS / EDT (92.5/2.5/2.5/2.5%, v/v) y se agitaron durante 8 h, y luego los péptidos se precipitaron con éter dietílico a -20 °C. Se secaron a temperatura ambiente y se caracterizaron mediante RP-HPLC y ESI MS-QTOF. Para el análisis de los péptidos por RP-HPLC (1 mg/mL), se utilizó como fase móvil el disolvente A: TFA al 0.05% en agua, y el disolvente B: TFA al 0.05% en ACN. Como fase estacionaria se utilizó una columna monolítica Chromolith® C-18 (50 x 4.6 mm). Se utilizó un gradiente de elución del 5% al 50% de disolvente B durante 8 min a un flujo de 2 ml/min, un volumen de inyección de 10 µl y 210 nm para la detección, en un cromatógrafo Agilent Serie 1260. Para la purificación de los péptidos se utilizaron columnas RP-SPE de 5 g (tamaño de partícula: 40-60 µm). El péptido se disolvió en TFA al 0.05% en agua y la muestra se inyectó en la columna y luego se eluyó con soluciones que contenían diferentes porcentajes de TFA en ACN. Las fracciones que contenían el péptido puro se recogieron y liofilizaron (Insuasty Cepeda *et al.*, 2019). Los péptidos 1001 y 1007 fueron químicamente sintetizados por la compañía BIOMATIK.

5.3 CULTIVO CELULAR

Se utilizaron las líneas celulares humanas: 1) MCF-7, de células epiteliales de la glándula mamaria derivadas del sitio metastásico con diagnóstico de adenocarcinoma, y 2) MCF12-F, una línea celular no tumorigénica de células epiteliales de la glándula mamaria, ambas líneas se obtuvieron de la colección ATCC. Los cultivos se realizaron en medio de crecimiento F-12 Ham (Sigma), suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v) y 100 U/ml de penicilina y estreptomina, y se cultivaron a una atmósfera de 37°C con 5% de CO₂ (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016).

5.4 DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS DERIVADOS DE PaDef EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7

La citotoxicidad de los péptidos se determinó por ensayos de MTT, este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en formazán, un compuesto de color azul, lo que permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células

tratadas. Se cultivaron 1×10^4 células MCF-7 en placas de 96 pocillos usando medio completo suplementado por 24 h, después se sincronizaron usando medio incompleto (sin suero) por otras 24 h. Las células se trataron con los péptidos (25-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o con el vehículo y se incubaron de 24 a 48 h. Se agregaron 10 μl de solución de MTT (5 mg/mL , Sigma) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a cada pocillo y se incubaron durante 4 h a 37 °C. Finalmente, los cristales de formazán se disolvieron con isopropanol ácido (100 μL , 95% de isopropanol y 5% de HCl 1 N). Las lecturas de absorbancia se realizaron en un lector de microplacas (Bio Rad) a 595 nm. Se utilizó actinomicina D (Act-D) a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ como control positivo de muerte celular. Los resultados de viabilidad celular se reportan como el porcentaje de células viables con respecto a las células tratadas con el vehículo (H_2O desionizada para los péptidos 462, 463, 484, 570, 571, 572, 582, 583, 584, 585, 595 y 596, y DMSO 5% para los péptidos 1001 y 1007) (Flores-Alvarez *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2018). Se calculó la concentración inhibitoria media máxima (IC_{50}) mediante análisis de regresión usando GraphPad.

Además, para el péptido 1007 se determinó también la citotoxicidad por medio del ensayo de viabilidad del colorante azul tripano. Para ello, se sembraron 1×10^4 células en placas de 96 pocillos usando medio completo suplementado por 24 h, después se sincronizaron usando medio incompleto por otras 24 h. Las células se incubaron con los tratamientos (25-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 24 h. Luego, las células se recolectaron mediante tripsinización y se mezclaron 10 μl de la suspensión celular de cada tratamiento con 10 μl de azul tripano (0.4%). Las células muertas y viables se contaron usando un hematocitómetro en un microscopio invertido (Primo Vert, Zeiss). La viabilidad se registró como el porcentaje de células viables con respecto al vehículo (DMSO 5%) y se calculó IC_{50} . Para el resto de los experimentos se utilizó la IC_{50} determinada para cada uno de los péptidos activos (Flores-Alvarez *et al.*, 2018).

5.5 DETERMINACIÓN DEL MECANISMO DE MUERTE INDUCIDA POR LOS DERIVADOS DE PaDef EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7

Los cambios en el potencial transmembrana de las células se evaluaron utilizando el colorante DiSC3(5) (yoduro de 3,3'-dipropiltiadicarbocianina, Sigma). Para esto, se sembraron 1×10^4 células/pocillo en placas de pared negra de 96 pocillos, se incubaron con 0.2 mM de

DiSC3(5) disuelto en el buffer HEPES de Hank durante 30 min en una incubadora de CO₂. Luego, se agregaron los tratamientos (IC₅₀ de los péptidos y el vehículo) y se monitoreó la intensidad de fluorescencia durante 2 h usando un espectrofotómetro Varioskan (Thermo Scientific). Se utilizó valinomicina (0.4 mM, Sigma) como control positivo (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016; Flores-Alvarez *et al.*, 2018).

Además, se realizaron pruebas de flujo de calcio empleando un kit de ensayo de calcio (Calcium Assay Kit 640176, BD Biosciences) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para esto, se cultivaron 1x10⁵ células/ml en medio incompleto 24 h y se añadió el colorante indicador durante 1 h. Se estableció una fluorescencia de referencia durante 6 min y se agregaron los tratamientos (IC₅₀ de los péptidos y el vehículo). Se usó acetato de miristato de forbol (3 µM; PMA, Sigma) como control positivo. El flujo de calcio se evaluó en un citómetro BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016; Flores-Alvarez *et al.*, 2018).

Así mismo, se midió la tasa de apoptosis mediante un ensayo de anexina V/7AAD. Los ensayos se realizaron cultivando 8 x 10⁴ células en placas de 24 pozos. Las células se sincronizaron por 24 horas usando medio incompleto y se agregaron los tratamientos (IC₅₀ de los péptidos y el vehículo). Después de 24 h de tratamiento, las células se recolectaron y se tiñeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (anexina V, conjugado Alexa Fluor 488, Invitrogen) en un citómetro BD Accuri™ C6 (BD Biosciences). Los datos se analizaron con el software FlowJo v10.4 (TreeStar, Inc.). Se usó la actinomicina D (Sigma) como control positivo para la apoptosis (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016; Flores-Alvarez *et al.*, 2018).

Además, se evaluó la activación de las caspasas 8 y 9 utilizando el kit CaspGLOW^{MT} Fluorescein active Caspase-8 Staining kit y kit CaspGLOW^{MT} Fluorescein active Caspase-9 Staining kit, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para esto, las células (8x10⁴ células/pozo) se sembraron en placas de 24 pozos, se incubaron con la IC₅₀ de los péptidos o el vehículo en medio sin suero durante 24 h. Se agregaron los sustratos de las caspasas y se evaluó la fluorescencia en un citómetro BD Accuri™ C6 (BD Biosciences). Se utilizó actinomicina D (20 µM) como control positivo y el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK (100 µM) (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016; Flores-Alvarez *et al.*, 2018).

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se obtuvieron de 3 experimentos independientes por triplicado ($n = 9$) y se comparó con un análisis de varianza (ANOVA) con un análisis *post hoc* de Tukey. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando se obtuvo un valor de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA DEFENSINA

PaDef

Se diseñaron inicialmente 3 péptidos derivados de la defensina PaDef madura (47aa) que comprendían: 1) la región amino terminal (péptido 463, 24 aa), 2) la región carboxilo terminal (péptido 462, 23 aa) y 3) el motivo γ -core (péptido 484, 12 aa) (Tabla 4). Los péptidos fueron sintetizados en el Departamento de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP) de la Universidad Nacional de Colombia, por el M.C. Diego Insuasty Cepeda. El análisis predicho de la potencia anticancerosa de estos 3 péptidos con el servidor AntiCP 2.0 (URL: <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/anticp2/>) indicó que no presentaban un buen potencial anticanceroso, ya que su puntuación fue cercana a 0.3 (Tabla 4), lo cual coincidió con los resultados de citotoxicidad, ya que estos péptidos no afectaron la viabilidad de las células MCF-7 (Figuras 26-28 en material suplementario).

6.2 DISEÑO Y SÍNTESIS DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA DEFENSINA PaDef

Debido a que los péptidos 462, 463 y 484 no mostraron citotoxicidad, se diseñaron 2 nuevos péptidos con la ayuda del servidor web AntiCP 2. Se analizaron distintas porciones del péptido maduro de la defensina PaDef que comprendieran regiones de aproximadamente 10 aa. Se eligieron las dos secuencias con el mejor puntaje predicho para ejercer una actividad citotóxica, el cual fue cercano a 1, y fueron denominados péptidos 1001 y 1007. La secuencia de aa y sus características se presentan en la Tabla 4. Ambos péptidos fueron químicamente sintetizados por la compañía BIOMATIK con purezas superiores al 80%. Como control de la predicción bioinformática se analizó la secuencia de los péptidos FK-16 y 26_[M] (reportados con actividad citotóxica en células de cáncer de colon y cáncer de mama, respectivamente) (Ren *et al.*, 2013; Insuasty-Cepeda *et al.*, 2020). Los resultados mostraron la existencia de una buena correlación entre los datos de citotoxicidad reportados *in vitro* para estos dos péptidos y el potencial anticanceroso predicho en el servidor web AntiCP 2.0 (Tabla 4).

Así mismo, derivado del resultado de citotoxicidad del péptido 1007 en la línea celular MCF-7 (ver más adelante), se diseñaron los péptidos 570, 571, 572, 582, 583, 584, 585, 595 y 596, haciendo modificaciones a la secuencia de aa del péptido 1007 con el objetivo de aumentar la carga y la proporción hidrofóbica. Algunos péptidos se diseñaron intercambiando aa al

azar por aa hidrofóbicos y catiónicos o haciendo dímeros (péptidos 570, 571, 572, 595 y 596) (Tabla 4), y se evaluaron en el servidor web AntiCP 2.0. Otros péptidos se diseñaron al cambiar las cisteínas del péptido 1007 con glicina y serina, para evaluar si las cisteínas jugaban un papel importante en el efecto citotóxico del péptido 1007 en las células MCF-7 (péptidos 582, 583, 584 y 585) (Tabla 4), y se analizaron en el servidor web AntiCP 2.0. Para la síntesis de estos péptidos se realizó una estancia en el Departamento de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

Tabla 4. Características de los péptidos derivados de la defensina PaDef

Péptido	Secuencia	Región	Carga	Proporción hidrofóbica	Puntuación
PaDef	ATCETPSKHFNGLCIRSSNCASVCH GEHFTDGRGQGVRRRCMCLKPC	PaDef (1-47)			-
462	HGEHFTDGRGQGVRRRCMCLKPC	PaDef (25-47)	+3.5	34%	0.31
463	ATCETPSKHFNGLCIRSSNCASVC	PaDef (1-24)	+1.25	41%	0.31
484	GRCQGVRRRCMC	PaDef (32-43)	+4	41%	0.29
1001	ATCETPSKHF	PaDef (1-10)	+0.25	30%	0.79
1007	GLCIRSSNCA	PaDef (12-21)	+1	50%	0.8
570	IKWLWKFACL	-	+3	70%	0.99
571	GAKIKWSWKL	-	+3	50%	0.9
572	IKWSWKFAKL	-	+3	60%	0.85
582	GLGIRSSNGA	-	+1	30%	0.29
583	GLSIRSSNSA	-	+1	30%	0.35
584	GLGIRSSNCA	-	+1	40%	0.32
585	GLCIRSSNGA	-	+1	40%	0.24
595	GACIKWSWKPL	-	+2	55%	0.95
596	(GLGIRSSNGA)2-K-Ahx	-	+3	27%	0.42
FK-16	FKRIVQRIKDFLRNLV	LL37 (17-33)	+4	50%	1
26_[M]	(RRWQWRMKKLG)2-K-Ahx	LfcinB (4-14)	+5	35%	0.9

*En rojo se muestran los péptidos que el servidor web AntiCP 2 predice con actividad anticancerosa y en azul la comparativa con los péptidos reportados con actividad citotóxica en células de cáncer. -: no aplica.

Los péptidos 1007, 570, 571, 572, 582, 583, 584, 585, 595 y 596 se obtuvieron con una pureza mayor al 85% y su caracterización por ESI MS-QTOF correspondió con la masa teórica. Las secuencias de los péptidos obtenidos y su caracterización por RP-HPLC y ESI MS-QTOF se muestran en la Tabla 5. Los análisis realizados para caracterizar cada uno de los péptidos se muestran en las Figuras 16-25 del material suplementario.

Tabla 5. Caracterización de los péptidos diseñados a partir del péptido 1007 de la defensina PaDef

Código	Secuencia	CARACTERIZACIÓN					
		HPLC				ESI MS-QTOF	
		Crudo		Puro		Masa teórica	(m/z) exp
		t _R	Pureza (%)	t _R	Pureza (%)		
566	GLCIRSSNCA	4.4	82	4.4	94	1021.469	1021.4816
570	IKWLWKFAKL	6.7	91	6.7	98	1330.817	1330.836
571	GAKIKWSWKL	5.9	85	5.9	92	1214.718	1214.748
572	IKWSWKFAKL	6.3	81	6.2	97	1304.765	1304.7852
582	GLGIRSSNGA	3.9	98	3.9	92	929.493	929.5112
583	GLSIRSSNSA	3.9	97	3.9	89	989.514	989.531
584	GLGIRSSNCA	4.2	86	4.0	97	975.481	975.4988
585	GLCIRSSNGA	4.2	86	4.1	97	975.481	975.4968
595	GACIKWSWKPL	6.4	90	6.3	95	1286.685	1286.7099
596	(GLGIRSSNGA) ₂ -K-Ahx	4.8	93	4.7	99	2100.14	2084.1684

6.2 DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS PÉPTIDOS DERIVADOS DE PaDef EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7

Inicialmente se evaluó la actividad citotóxica de los péptidos 1001 y 1007 (25, 50, 100, 200 y 300 µg/mL) mediante el ensayo del colorante azul tripano a las 24 y 48 h. De acuerdo a los resultados, solo el péptido 1007 mostró un efecto citotóxico dependiente de la concentración en las células MCF-7 a las 24 h, con una IC₅₀ de 218.89 µM (Figura 8); sin embargo, su actividad fue menor a la reportada para PaDef (IC₅₀= 27.23 µM) (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016a). Interesantemente, se observó que las células tratadas con este péptidos mostraban una tendencia a la aglomeración (Figura 8C).

Debido a la actividad citotóxica del péptido 1007 en la línea celular MCF-7, se usó la secuencia de éste como base para hacer cambios en la secuencia de aa con el fin de diseñar péptidos con una mejoría en su actividad. Se intercambiaron algunos aa polares por aa hidrofóbicos, esto aumentó la proporción hidrofóbica; también se agregaron aa catiónicos para aumentar la carga positiva. Las secuencias diseñadas se analizaron con el servidor web AntiCP 2.0 y se predijo su potencial anticanceroso. Este análisis permitió elegir las mejores

9 secuencias de péptidos para su síntesis química y posteriormente evaluar su actividad citotóxica en la línea celular MCF-7 (Tabla 6). Se evaluaron concentraciones de 25, 50, 100, 150 y 200 µg/mL a las 24 y 48 h. De los 9 péptidos, solo el péptido 570 mostró un efecto citotóxico dependiente de la concentración en las células MCF-7 a las 48 h (Figura 9), con una IC₅₀ de 120.2 µM. Además, la morfología de las células MCF-7 tratadas con el péptido 570 mostraron alteraciones que sugieren un mecanismo de muerte por apoptosis, tales como la pérdida de adherencia y células redondeadas similar a las células tratadas con la actinomicina D (Figura 9C). Sin embargo, aunque la IC₅₀ del péptido 570 es menor a la del péptido 1007, no mejoró el efecto citotóxico de PaDef en las células MCF-7 (IC₅₀= 27.23 µM) (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016a).

Tabla 6. Actividad citotóxica de los péptidos derivados de PaDef en la línea celular MCF-7

Péptido	Secuencia	Carga	Proporción hidrofóbica	MCF-7 (IC ₅₀ , µM)
1001	ATCETPSKHF	+0.25	30%	-
1007	GLCIRSSNCA	+1	50%	218.89 µM
570	IKWLWKFAKL	+3	70%	120.2 µM
571	GAKIKWSWKL	+3	50%	-
572	IKWSWKFAKL	+3	60%	-
582	GLGIRSSNGA	+1	30%	-
583	GLSIRSSNSA	+1	30%	-
584	GLGIRSSNCA	+1	40%	-
585	GLCIRSSNGA	+1	40%	-
595	GACIKWSWKPL	+2	55%	-
596	(GLGIRSSNGA)2-K-Ahx	+3	27%	-

-: No mostró citotoxicidad. Los resultados de los péptidos no citotóxicos se muestran en las Figuras 26-37 del material suplementario.

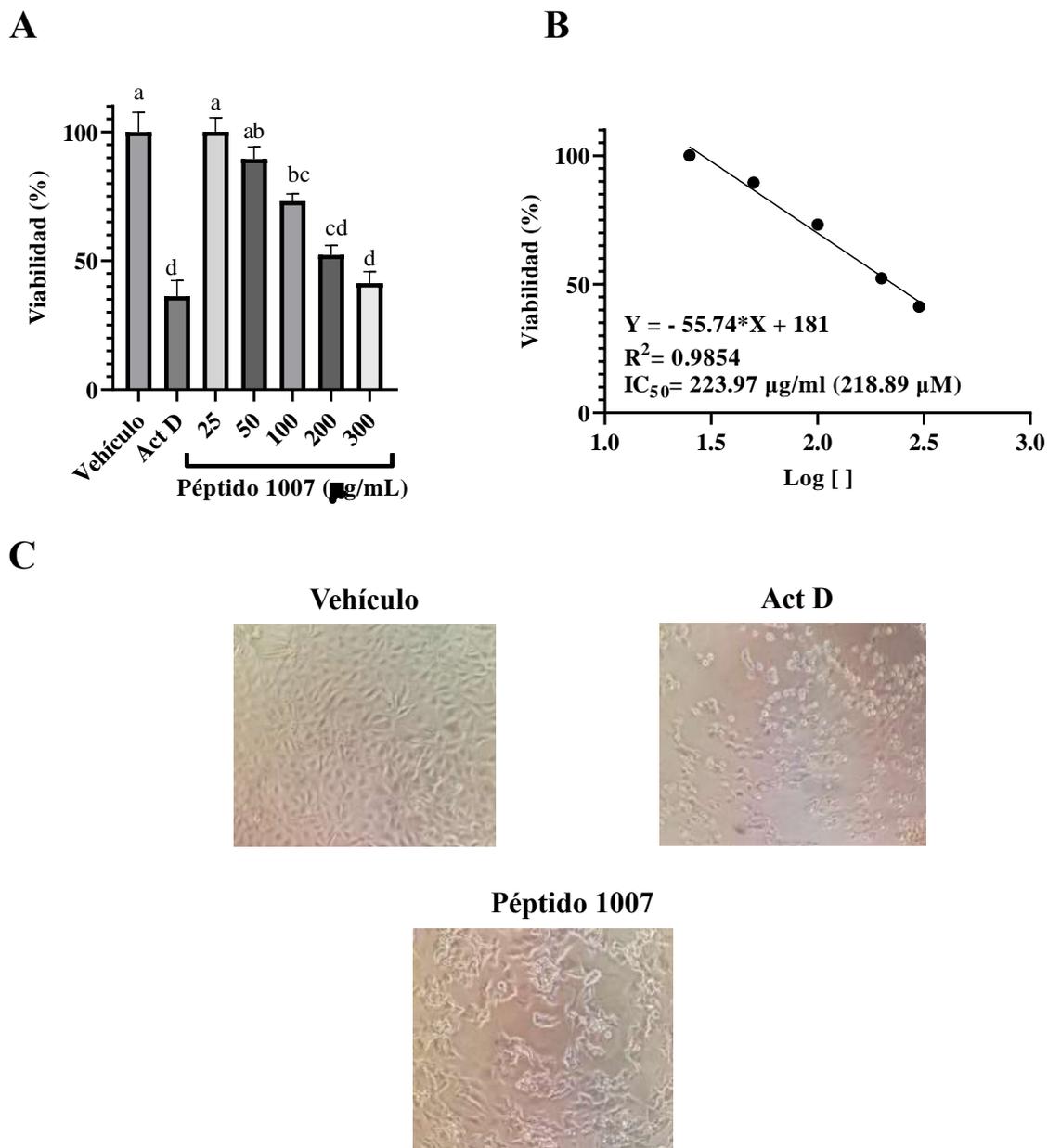


Figura 8. El péptido 1007 es citotóxico para las células MCF-7 de cáncer de mama. Efecto del péptido 1007 sobre la viabilidad de las células MCF-7. (A) Las células se trataron con concentraciones crecientes del péptido 1007 (25, 50, 100, 200 y 300 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 h, y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de Azul Tripano. Se utilizó DMSO (5%) como vehículo y Actinomicina D (Act D) a una concentración de 10 μM como control de muerte positivo. Los datos muestran la media \pm SE de tres experimentos realizados por triplicado. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p < 0.05$). (B). Se muestra el análisis de regresión de la respuesta a la concentración para determinar la concentración inhibitoria máxima (IC_{50}) del péptido 1007 en células MCF-7; $IC_{50} = 218.89 \mu\text{M}$; $R = 0.9854$. (C) Se muestra el cambio de morfología celular por efecto del péptido 1007 en las células MCF-7.

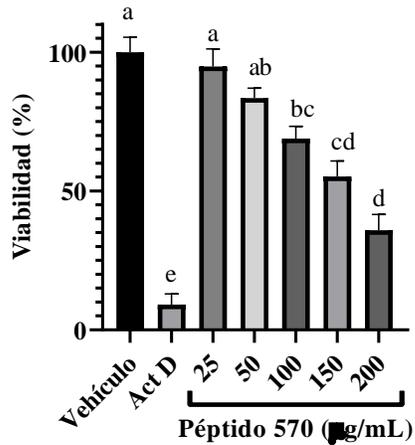
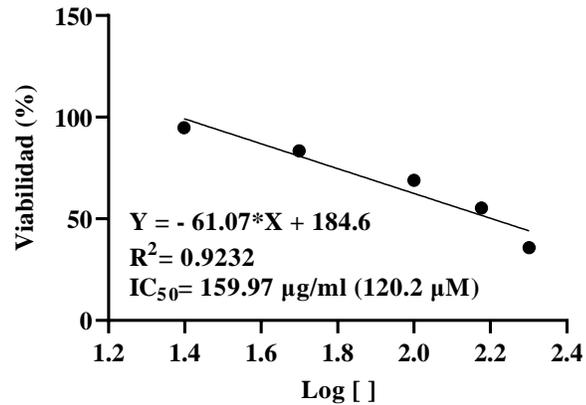
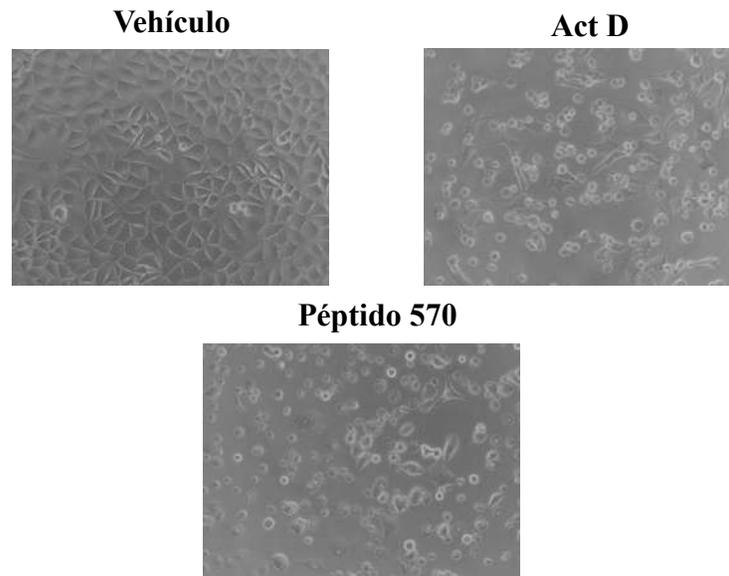
A**B****C**

Figura 9. El péptido 570 es citotóxico para las células MCF-7 de cáncer de mama. Efecto del péptido 570 sobre la viabilidad de las células MCF-7. **(A)** Las células se trataron con concentraciones crecientes del péptido 570 (25, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/mL}$) durante 48 h, y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de Azul Tripano. Se utilizó agua desionizada como vehículo y Actinomicina D (Act D) a una concentración de 10 μM como control de muerte positivo. Los datos muestran la media \pm SE de tres experimentos realizados por triplicado. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p < 0.05$). **(B)** Se muestra el análisis de regresión de la respuesta a la concentración para determinar la concentración inhibitoria máxima (IC_{50}) del péptido 570 en células MCF-7; $IC_{50} = 120.2 \mu\text{M}$; $R = 0.9232$. **(C)** Se muestra el cambio de morfología celular por efecto del péptido 570 en las células MCF-7.

Para determinar si los péptidos 570 y 1007 poseen un efecto citotóxico selectivo, se determinó su efecto sobre células epiteliales normales de la glándula mamaria. Para ello se utilizó a la línea MCF-12F, la cual es una línea no tumorogénica. Se evaluó la viabilidad celular mediante MTT y se probaron concentraciones de 100, 200 y 300 $\mu\text{g/mL}$ de ambos péptidos. Los resultados mostraron que los péptidos 570 y 1007 no afectaron la viabilidad de las células MCF-12F (Figura 10).

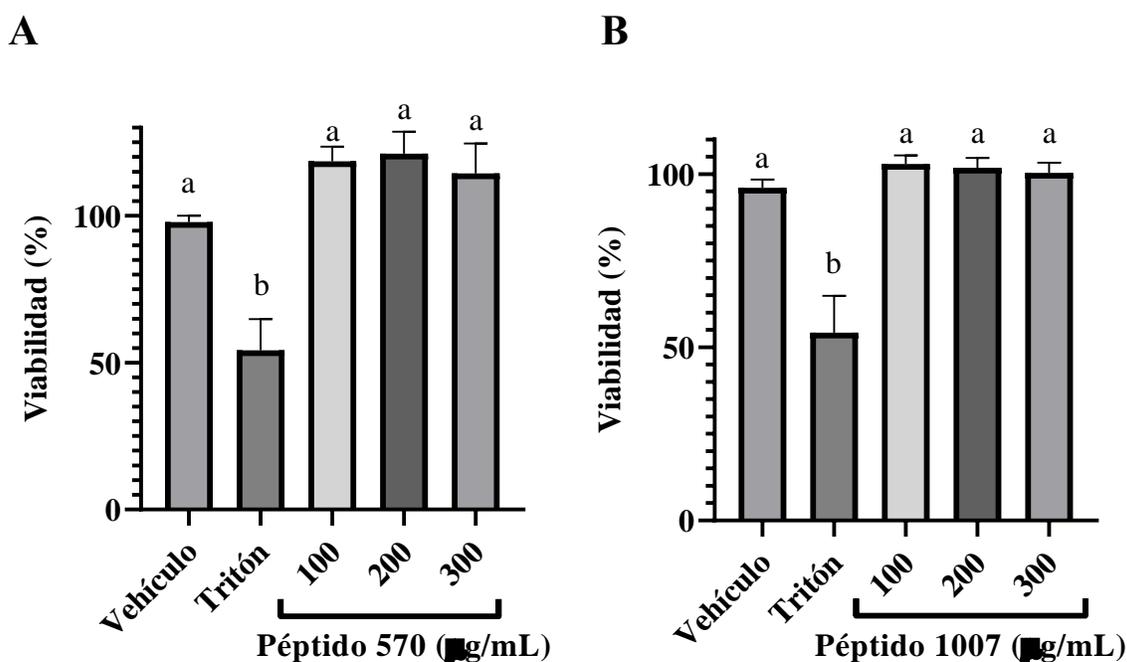


Figura 10. Efecto de los péptidos 570 y 1007 sobre la viabilidad de las células MCF-12F. Las células se trataron con concentraciones crecientes de los péptidos (A) 570 y (B) 1007 (100, 200 y 300 $\mu\text{g/mL}$) durante 48 h, y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. Se utilizó agua desionizada como vehículo para el péptido (A) 570 y DMSO (5%) para el péptido 1007. Se usó Tritón (0.01%) como control de muerte positivo. Los datos muestran la media \pm SE de tres experimentos realizados por triplicado. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p < 0.05$).

6.3 EFECTO DE LOS PÉPTIDOS 570 Y 1007 SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA DE LAS CÉLULAS MCF-7

Como se ha descrito, algunos de los mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos se asocian al daño de la membrana celular. Se evaluó si la citotoxicidad de los péptidos 570 y 1007 en las células MCF-7 está asociada con el daño de la membrana. Para ello se evaluaron dos parámetros: 1) variaciones del calcio intracelular, y 2) el potencial eléctrico de la

membrana. Los péptidos 570 y 1007 no afectaron la salida de calcio intracelular según lo monitoreado por citometría de flujo (Figuras 11 y 12). Por otro lado, el efecto de los péptidos sobre el potencial eléctrico de la membrana plasmática de las células MCF-7 se analizó utilizando el colorante DiSC3(5). Como se muestra en las figuras 11 y 12, los péptidos 570 y 1007 no afectaron el potencial eléctrico de membrana de las células, en comparación con el control positivo (valinomicina 0.4 mM). Estos resultados sugieren que el mecanismo de citotoxicidad de los dos péptidos derivados de PaDef en las células MCF-7 no está relacionado con la formación de poros.

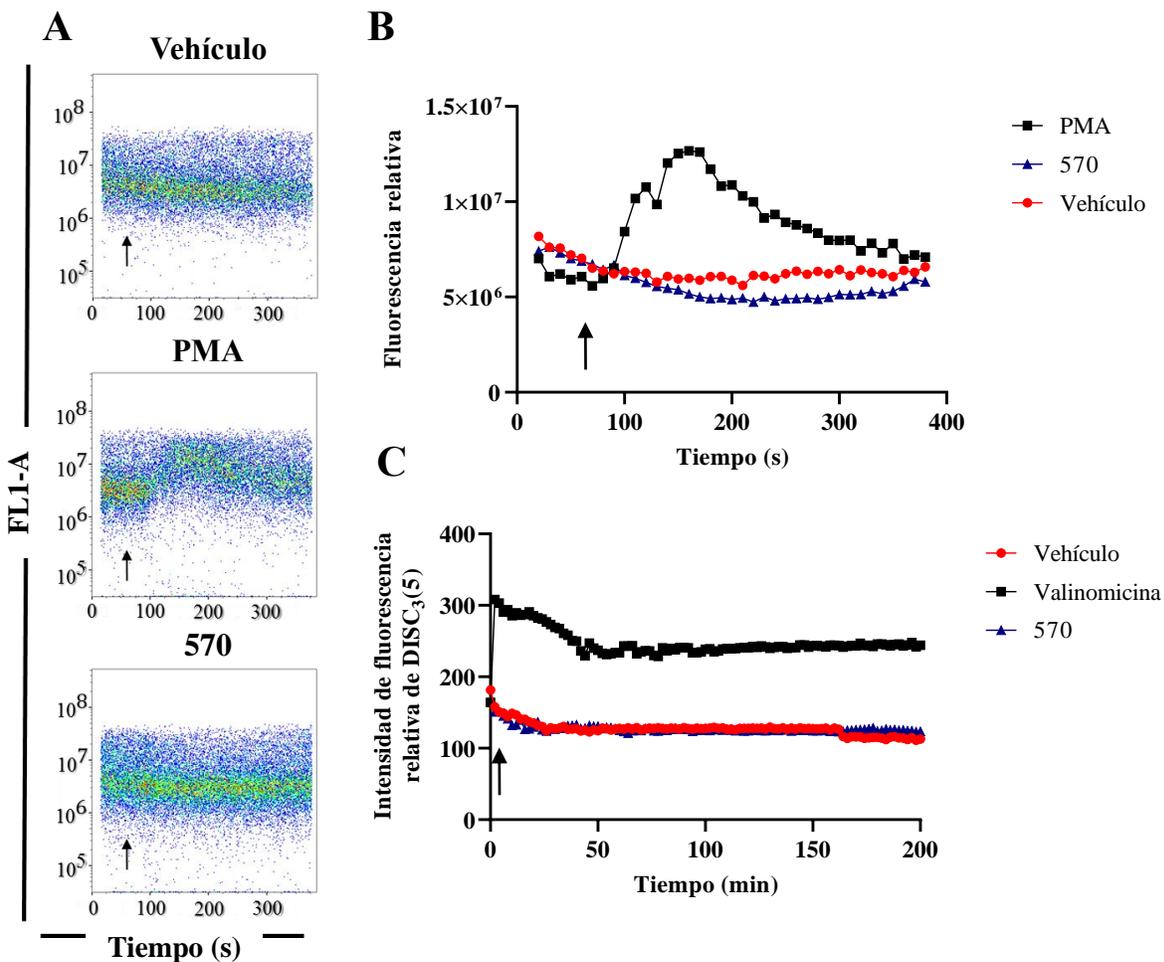


Figura 11. Efecto del péptido 570 sobre el flujo de calcio y el potencial de membrana de las células MCF-7. El flujo de calcio se analizó mediante citometría de flujo. Las mediciones se realizaron durante 6 min. El panel (A) muestra gráficos representativos del análisis por citometría de las diferentes condiciones. El panel (B) indica las intensidades de fluorescencia relativas para la liberación de calcio extracelular. Se utilizó PMA (3 mM) como control positivo. Los cambios en el potencial de membrana de las células MCF-7 se midieron utilizando un colorante sensible al potencial de membrana (C). Las células se incubaron con DiSC₃(5) 0.2 mM durante 30 min a 37 °C y luego se trataron con la IC₅₀ del péptido 570. Se utilizó valinomicina (0.4 mM) como control positivo. Las flechas indican el momento en que se agregaron los tratamientos en todas las evaluaciones.

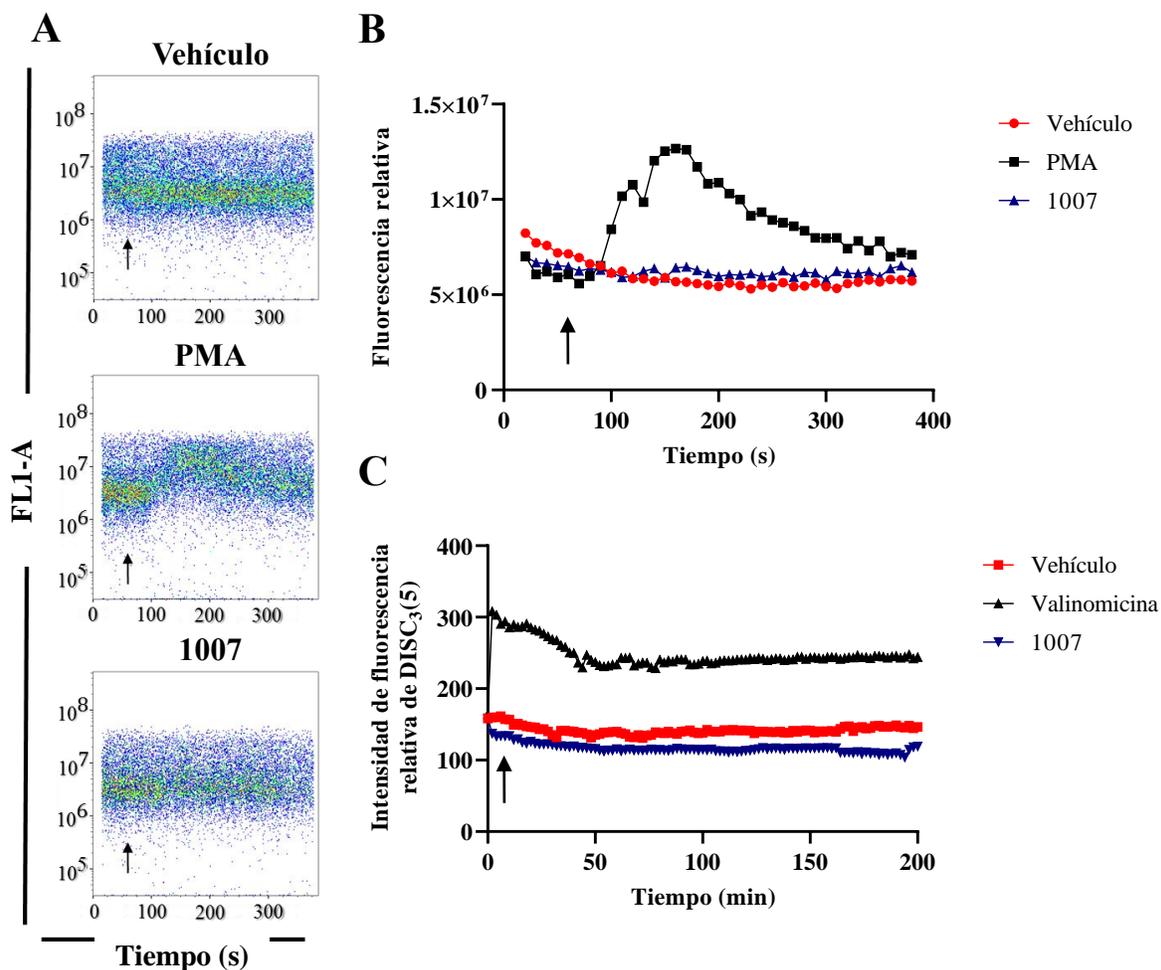


Figura 12. Efecto del péptido 1007 sobre el flujo de calcio y el potencial de membrana de las células MCF-7. El flujo de calcio se analizó mediante citometría de flujo. Las mediciones se realizaron durante 6 min. El panel (A) muestra gráficos representativos del análisis por citometría de las diferentes condiciones. El panel (B) indica las intensidades de fluorescencia relativas para la liberación de calcio extracelular. Se utilizó PMA (3 mM) como control positivo. Los cambios en el potencial de membrana de las células MCF-7 se midieron utilizando un colorante sensible al potencial de membrana (C). Las células se incubaron con DiSC₃(5) 0.2 mM durante 30 min a 37 °C y luego se trataron con la IC₅₀ del péptido 570. Se utilizó valinomicina (0.4 mM) como control positivo. Las flechas indican el momento en que se agregaron los tratamientos en todas las evaluaciones.

6.4 EVALUACIÓN DE LA TASA DE APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS MCF-7 TRATADAS CON LOS PÉPTIDOS 570 Y 1007

Se ha documentado que la inducción de la apoptosis es un mecanismo citotóxico activado por los péptidos antimicrobianos. Por ello, se evaluó si la IC₅₀ de los péptidos 570 y 1007 induce la apoptosis en células MCF-7, esto se realizó mediante citometría de flujo utilizando anexina V. Las figuras 13 y 14 muestran diagramas de puntos representativos para los tratamientos con los péptidos 570 y 1007 a las 24 h. Los resultados mostraron que los

péptidos 570 y 1007 inducen la apoptosis (>50% y >30%, respectivamente) en las células MCF-7.

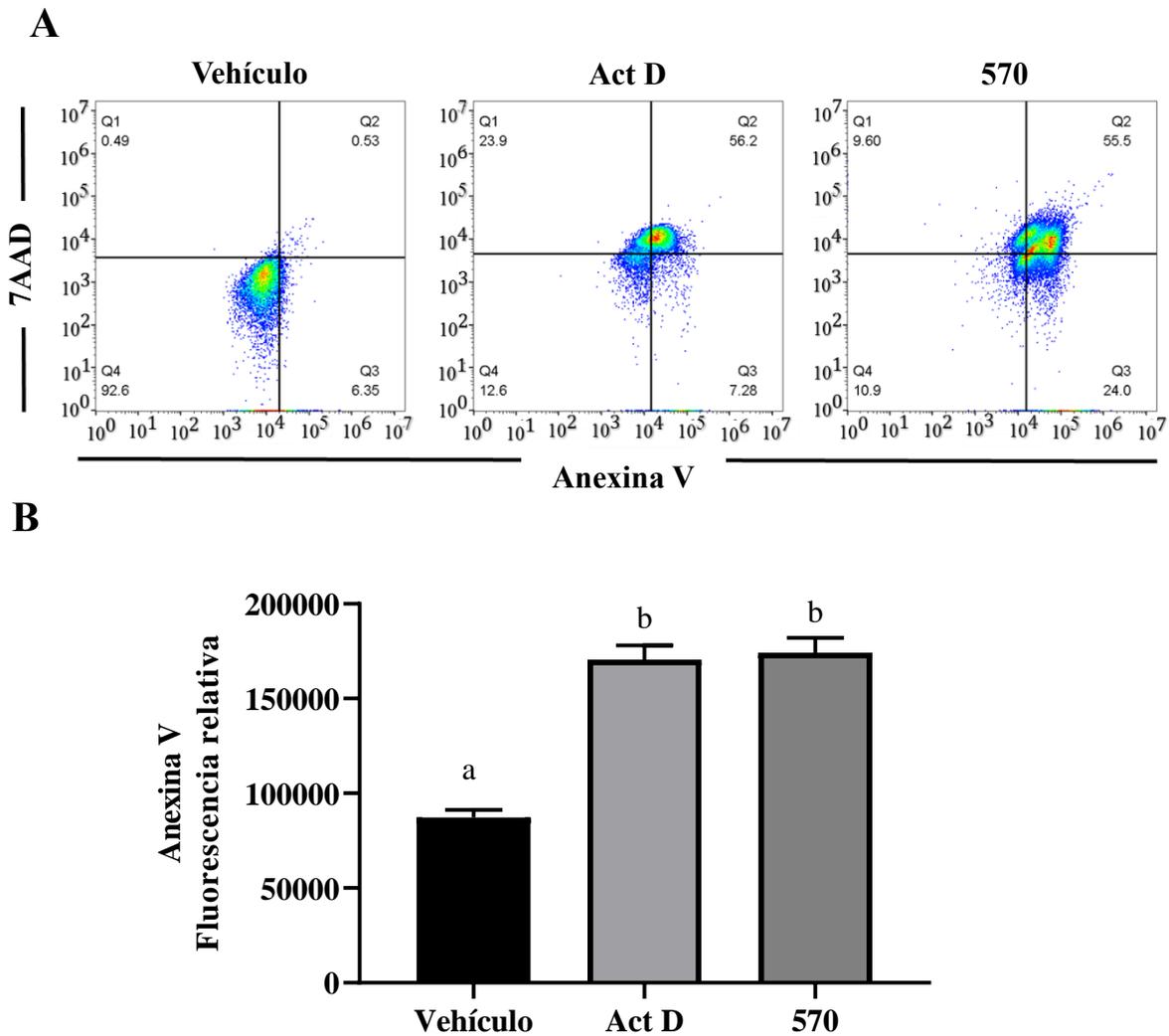
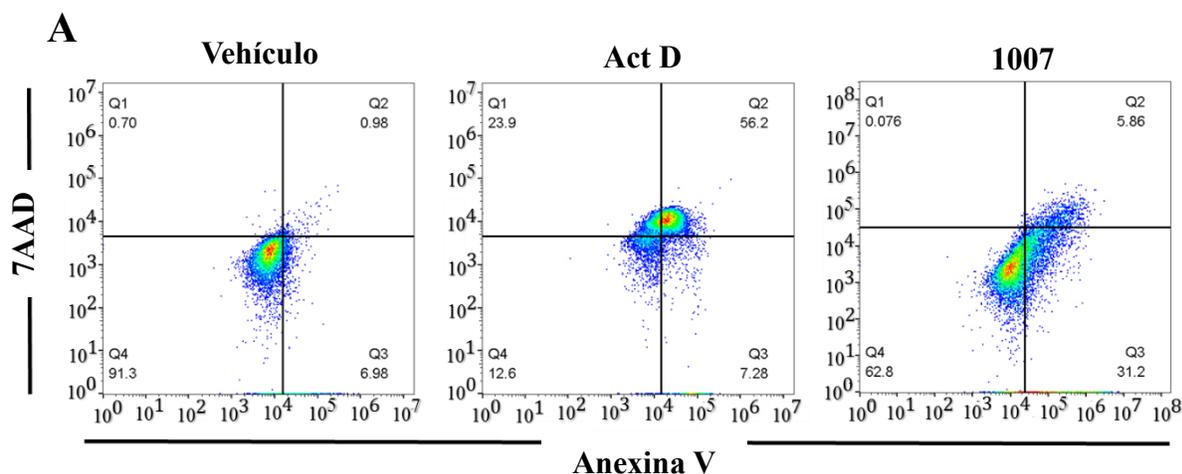


Figura 13. Evaluación de la tasa de apoptosis inducida en células MCF-7 por el péptido 570. Las células se trataron con la IC_{50} del péptido 570 por 24 h. La apoptosis se analizó mediante citometría de flujo utilizando tinción con anexina V/7AAD. (A) Las células viables no se unen a la anexina V o 7AAD (cuadrante inferior izquierdo). El cuadrante inferior derecho de cada histograma representa la apoptosis temprana, el cuadrante superior derecho representa la apoptosis tardía, y el cuadrante superior izquierdo contiene células necróticas. (B) La gráfica muestra las unidades de fluorescencia relativa para cada condición. Cada barra muestra la media \pm SE de tres experimentos independientes por triplicado. Se recolectó un mínimo de 10,000 eventos por muestra. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p < 0.05$).



B

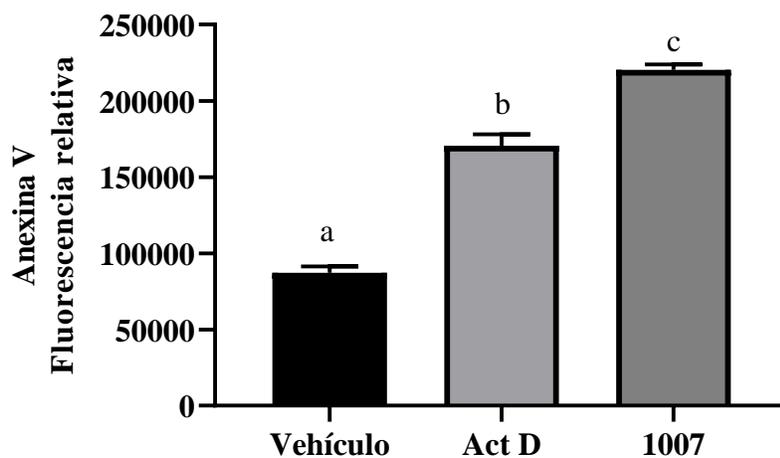


Figura 14. Evaluación de la tasa de apoptosis inducida en células MCF-7 por el péptido 1007. Las células se trataron con la IC₅₀ del péptido 1007 por 24 h. La apoptosis se analizó mediante citometría de flujo utilizando tinción con anexina V/7AAD. El cuadrante inferior derecho de cada histograma representa la apoptosis temprana, el cuadrante superior derecho representa la apoptosis tardía y el cuadrante superior izquierdo contiene células necróticas. **(B)** La gráfica muestra las unidades de fluorescencia relativa para cada condición. Cada barra muestra la media \pm SE de tres experimentos independientes por triplicado. Se recolectó un mínimo de 10,000 eventos por muestra. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p < 0.05$).

Para determinar la vía de apoptosis activada por los péptidos 570 y 1007 se evaluó la actividad de las caspasas 8 y 9, involucradas en la vía extrínseca e intrínseca, respectivamente. Los resultados de esta evaluación mostraron que los péptidos 570 y 1007 activan las caspasas 8 y 9 en las células MCF-7. Estos resultados sugieren que los péptidos 570 y 1007 activan tanto la vía intrínseca como la vía extrínseca de la apoptosis (Figura 15).

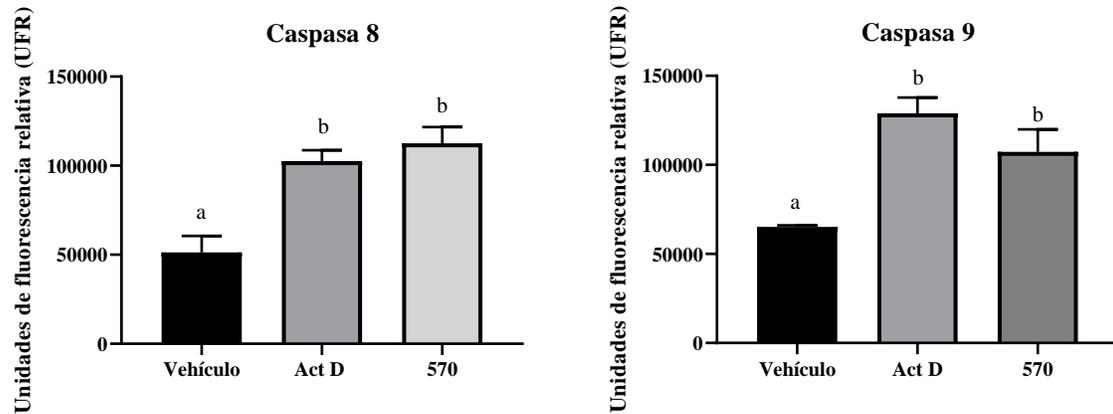
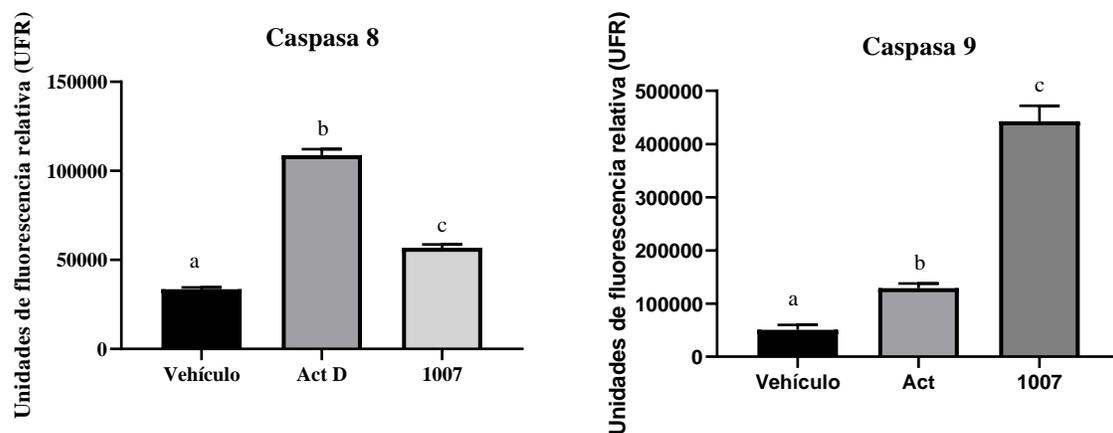
A**B**

Figura 15. Los péptidos 570 y 1007 inducen la activación de las caspasas 8 y 9 en las células MCF-7. Se analizó la actividad de la caspasa 8 (gráfico de la izquierda) y la caspasa 9 (gráfico de la derecha) en las células MCF-7. Las células MCF-7 se trataron con la IC₅₀ de los péptidos (A) 570 y (B) 1007, actinomicina D (20 μM) y el vehículo (agua desionizada para el péptido 570 y DMSO al 5% para el péptido 1007) durante 24 h. Las células se tiñeron usando FITC-IETD-FMK para caspasa 8 (A) y FITC-LEHD-FMK para caspasa 9 (B), y posteriormente se analizaron por citometría de flujo. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, p < 0.05).

7. DISCUSIÓN

Los péptidos antimicrobianos poseen muchas ventajas para el desarrollo de fármacos anticancerosos, ya que poseen una alta selectividad hacia células cancerosas, una amplia potencia y baja toxicidad (Wu *et al.*, 2014). Sin embargo, los PAMs también enfrentan algunos desafíos debido a su naturaleza peptídica, son lábiles y pueden tener propiedades farmacocinéticas pobres, son caros de fabricar y no reconocen receptores específicos. Estas limitaciones han llevado al diseño de nuevos péptidos anticancerosos que conservan las características de los péptidos antimicrobianos, pero con modificaciones que los hacen más estables y de longitudes más cortas, lo que reduce su costo de producción y potencia su efecto citotóxico (Deslouches & Di, 2017). En este sentido se han desarrollado una gran variedad de estrategias de diseño *in silico* para péptidos anticancerosos que pueden contribuir a mejorar la actividad de los PAMs y reducir su costo de producción, una de estas estrategias es el uso de algoritmos que predicen la actividad anticancerosa de péptidos mediante la comparación de secuencias peptídicas que se registraron como anticancerosas (Agrawal *et al.*, 2020). Se ha evaluado la efectividad de algunos de estos algoritmos, un ejemplo es el algoritmo de evolución molecular simulada (SME) en el que el 83% de sus predicciones fueron correctas. Este modelo de aprendizaje automático permitió el diseño de 4 nuevos péptidos anticancerosos con actividad a concentraciones menores de 20 μM en células A549 de cáncer de pulmón y MCF-7 de cáncer de mama (Gabernet *et al.*, 2019). Por lo tanto, el uso de estos modelos de predicción puede ser de gran ayuda para el diseño *in silico* de nuevos PAMs con actividad anticancerosa.

En este trabajo se utilizó el servidor web AntiCP 2.0 para diseñar 14 péptidos con actividad anticancerosa, usando como base la secuencia de la defensina PaDef de aguacate nativo Mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*), que ya había mostrado actividad citotóxica en células de cáncer. En la línea celular MCF-7 PaDef tuvo un efecto citotóxico dependiente de la concentración a las 48 h a través de la activación de la vía intrínseca de la apoptosis con una IC_{50} de 27.23 μM (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016a). En la línea K562 mostró un efecto citotóxico dependiente de la concentración con una IC_{50} de 18.6 μM a las 24 h, induciendo la activación de la vía extrínseca de la apoptosis (Flores-Alvarez *et al.*, 2018a). Por último, en la línea celular Jurkat PaDef fue citotóxico con una IC_{50} de 47.3 μM activando ambas vías de la apoptosis, y actuando como modulador epigenético al inhibir la actividad de las HDACs

y aumentar la acetilación de la histona 3 (Jiménez-Alcántar *et al.*, 2022). Los 14 péptidos diseñados fueron obtenidos por síntesis química y se probó su actividad anticancerosa en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. Solo los péptidos 1007 y 570 mostraron actividad anticancerosa (Tabla 6). Diversos autores han reportado que la presencia de puentes disulfuro intramoleculares e intermoleculares en las defensinas están involucrados en la mejora de su actividad antimicrobiana, ya que la reducción de los enlaces disulfuro en las defensinas mostró una reducción en la actividad y el aumento de enlaces disulfuro mostró un aumento en la estabilidad de los péptidos a altas temperaturas y un aumento en la actividad (Eijsink *et al.*, 1998; Fimland *et al.*, 2000; Baidara *et al.*, 2017). Esto se debe a que los puentes disulfuro aumentan la estabilidad estructural a los péptidos, además de promover la resistencia a la degradación por las proteasas. (Fass, 2012). También, las cisteínas permiten que los péptidos formen agregados que entregan la concentración local necesaria de péptidos para actuar sobre la membrana celular (Fass, 2012; Petkov *et al.*, 2019). Esto concuerda con los datos obtenidos en este trabajo, ya que los péptidos 582, 583, 584 y 585 contienen la misma secuencia del péptido 1007 pero sin cisteínas; sin embargo, estos no tuvieron un efecto citotóxico. Además, se observó que al reducir las cisteínas del péptido 1007 se disminuye su actividad citotóxica en las células MCF-7 (datos no mostrados). Estos datos sugieren que al oxidar el péptido 1007, este podría estar formando agregados que aumentan su estabilidad y proporciona la concentración local necesaria de péptido para su ejercer su acción sobre las células cancerosas. Por lo tanto, las cisteínas son esenciales para mantener el efecto citotóxico del péptido 1007. Por otro lado, la única diferencia entre el péptido 570 y 572 es el cambio de una leucina por una serina en la posición 4, pero sólo el péptido 570 mostró actividad anticancerosa. Esto es similar a lo reportado por Insuasty-Cepeda *et al.* (2020), ya que evaluaron la actividad citotóxica de dímeros de la LfcinB (20-30) con modificaciones en el aa 26 en las líneas celulares de cáncer HTB-132 y MCF-7. Observaron que el cambio por aa hidrofóbicos aumentaba la actividad, mientras que el cambio por aa polares disminuye la actividad. Por lo que el aumento de la proporción hidrofóbica en los péptidos con el cambio de un solo aminoácido puede alterar su efecto anticanceroso. Esto podría deberse a que una mayor hidrofobicidad de los péptidos permite una mejor interacción con los lípidos de la membrana celular.

Además, con el tratamiento del péptido 1007 se observó una tendencia de las células MCF-7 hacia la aglomeración y un retraso al despegar las células con tripsina (Figura 8C), esta conducta no se observó con el péptido 570. Esto es interesante ya que se ha reportado que cuando las células cancerosas sufren alteraciones en su morfología y forman uniones adherentes con células adyacentes, es debido a la presencia de E-cadherina, que está establecida como un antagonista de la invasión y metástasis (Hanahan & Weinberg, 2011). Por lo tanto, se requiere evaluar la expresión de E-cadherina en las células MCF-7 tratadas con el péptido 1007 y realizar estudios de migración celular, para ver si el péptido afecta la metástasis.

Los péptidos 570 y 1007 fueron citotóxicos para las células MCF-7 de forma dependiente de la concentración, con una IC_{50} de 120.2 y 218.89 μ M, respectivamente. Sin embargo, la actividad que muestran ambos péptidos no supera el efecto citotóxico de PaDef en las células MFC-7. A pesar de esto, la estabilidad *in vivo* de los péptidos antimicrobianos ha sido deficiente ya que generan inmunogenicidad y son blanco de enzimas proteolíticas, por lo que finalmente terminan administrándose a dosis mucho más concentradas (Eckert, 2011). En este sentido, los péptidos cortos tienen varias ventajas, ya que reducen la inmunogenicidad y se internalizan con mayor facilidad en las células cancerosas (Hu *et al.*, 2016). Los péptidos 570 y 1007 al ser pequeños adquieren estas ventajas sobre el péptido PaDef. Además, la actividad citotóxica de estos péptidos se puede mejorar al hacer algunas modificaciones. Algunas propuestas son construir dímeros y tetrámeros de estos péptidos, como se ha visto con el motivo RRWQWR de la LfcinB, donde los dímeros y tetrámeros de este motivo lograron mejorar su efecto citotóxico en células de cáncer (Solarte *et al.*, 2015; Vargas Casanova *et al.*, 2017; Guerra *et al.*, 2019). Otra propuesta es aumentar la proporción hidrofóbica del péptido 1007 al intercambiar aa polares por aa hidrofóbicos sin modificar las cisteínas, que han mostrado tener un rol importante en el efecto anticanceroso de este péptido (Insuasty-Cepeda *et al.*, 2020).

Aunque se ha descrito que los PAMs poseen diferentes mecanismos de acción, dentro de los que se incluye la formación de poros transmembrana, el mecanismo citotóxico de PaDef en las líneas celulares MCF-7, K562 y Jurkat ha sido a través de la inducción de apoptosis, (Pushpanathan *et al.*, 2013; Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016; Flores-Alvarez *et al.*, 2018;

Jiménez-Alcántar *et al.*, 2022). La apoptosis es un tipo de muerte controlada que elimina células con un daño mínimo a los tejidos circundantes. Una de las características del cáncer es evadir la muerte celular al desarrollar estrategias que limitan o evitan la apoptosis (D'Arcy, 2019). Por lo tanto, la apoptosis es el mecanismo deseado en el desarrollo de nuevas terapias anticancerosas. Curiosamente, los péptidos 572 y 1007 inducen apoptosis en las células MCF-7, por lo que mantiene el mismo mecanismo citotóxico que PaDef (Figura 13 y 14). La evaluación de la activación de caspasas mostró que ambos péptidos indujeron un incremento en la activación de las caspasas 8 y 9, lo que significa que activan la vía extrínseca y la vía intrínseca de la apoptosis.

Por otro lado, los péptidos 570 y 1007 también se probaron en células MCF-12F, que son células epiteliales no tumorogénicas de la glándula mamaria humana. Ambos péptidos no mostraron un efecto citotóxico. Esto sugiere que al igual que PaDef, los péptidos 570 y 1007 mantienen un efecto citotóxico selectivo para células cancerosas (Figura 9) (Guzmán-Rodríguez *et al.*, 2016; Flores-Alvarez *et al.*, 2018).

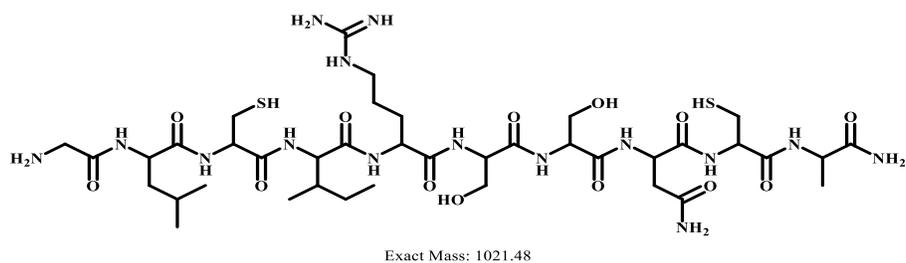
8. CONCLUSIÓN

Del total de 14 péptidos diseñados a partir del péptido maduro de la defensina PaDef, solo los péptidos 570 y 1007 presentaron actividad citotóxica en las células de cáncer de mama MCF-7. El mecanismo de muerte inducido en las células MCF-7 fue la apoptosis. Sin embargo, la actividad citotóxica de estos péptidos fue menor a la reportada para la defensina PaDef en esta línea celular. Estos resultados son contrarios a la hipótesis planteada. No obstante, los péptidos 570 y 1007 aún presentan un potencial en el diseño de fármacos anticancerosos, ya que se puede modificar su composición de aminoácidos cargados e hidrofóbicos para mejorar su actividad.

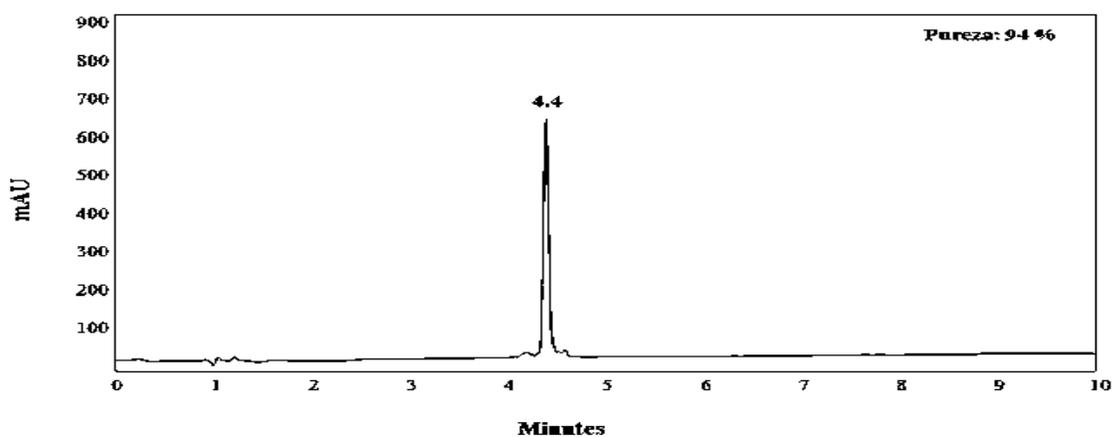
9. MATERIAL SUPLEMENTARIO

PÉPTIDO 1007: GLCIRSSNCA

A



B



C

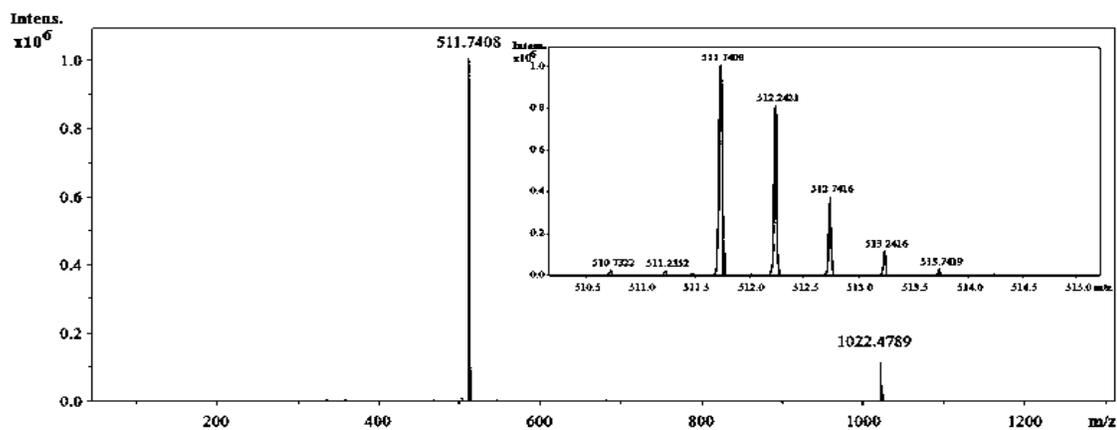
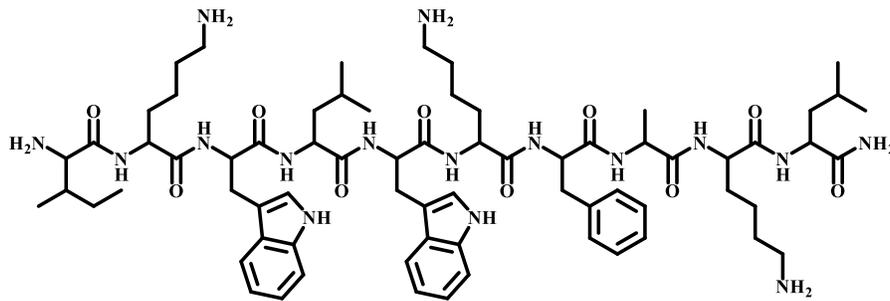


Figura 16. Caracterización del péptido 1007. Se muestra la secuencia de aminoácidos (A) y los gráficos de la cromatografía líquida de alta eficiencia en modo fase reversa (B) y la espectrometría de masas (C).

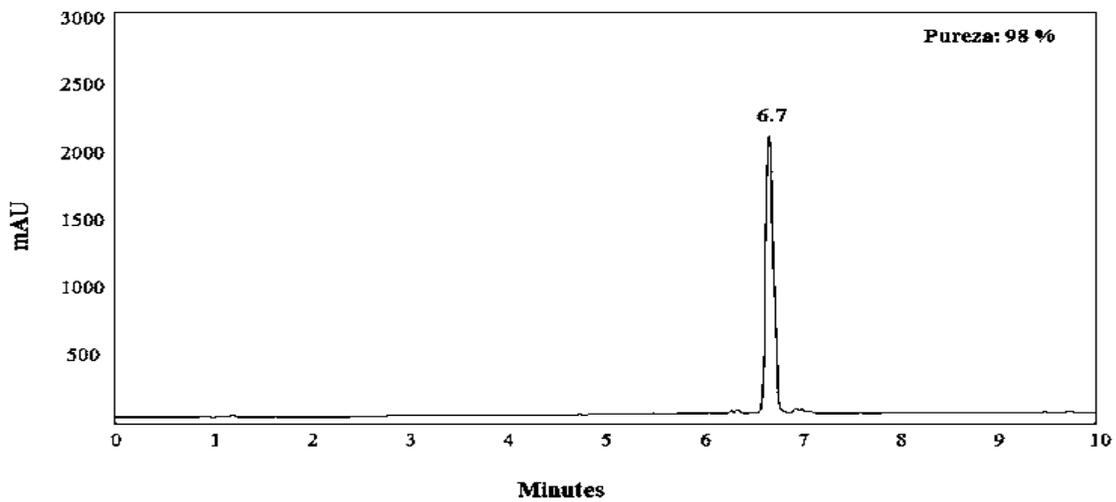
PÉPTIDO 570: IKWLWKFAKL

A



Exact Mass: 1330.83

B



C

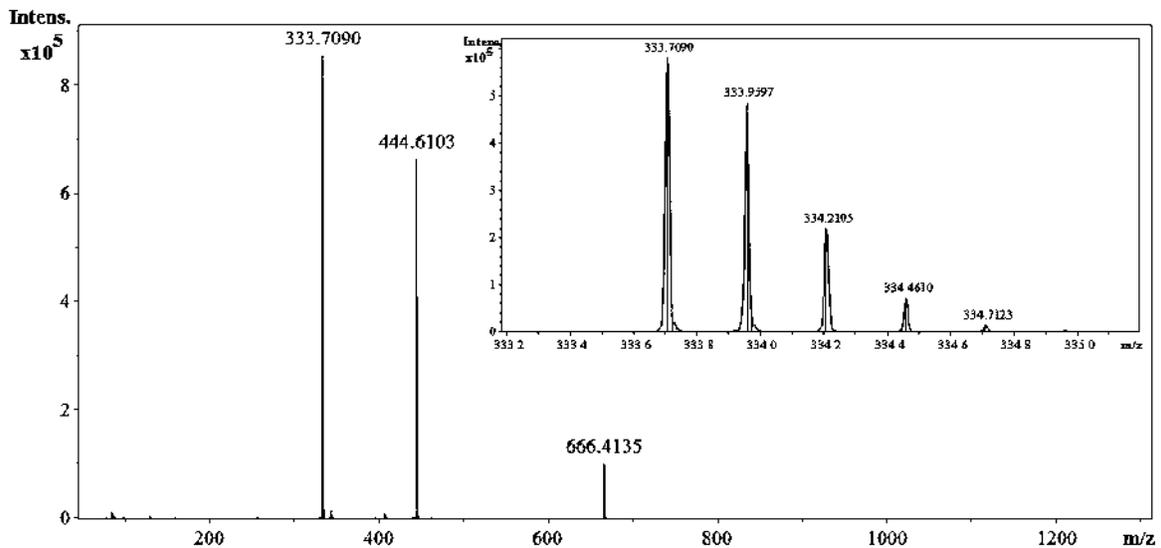
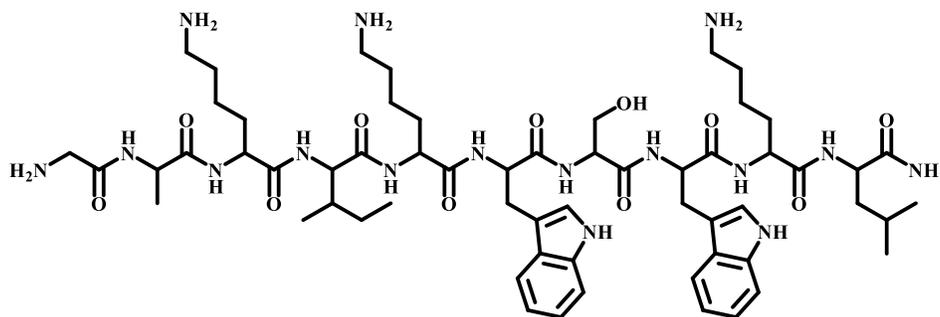


Figura 17. Caracterización del péptido 570. Se muestra la secuencia de aminoácidos (A) y los gráficos de la cromatografía líquida de alta eficiencia en modo fase reversa (B) y la espectrometría de masas (C).

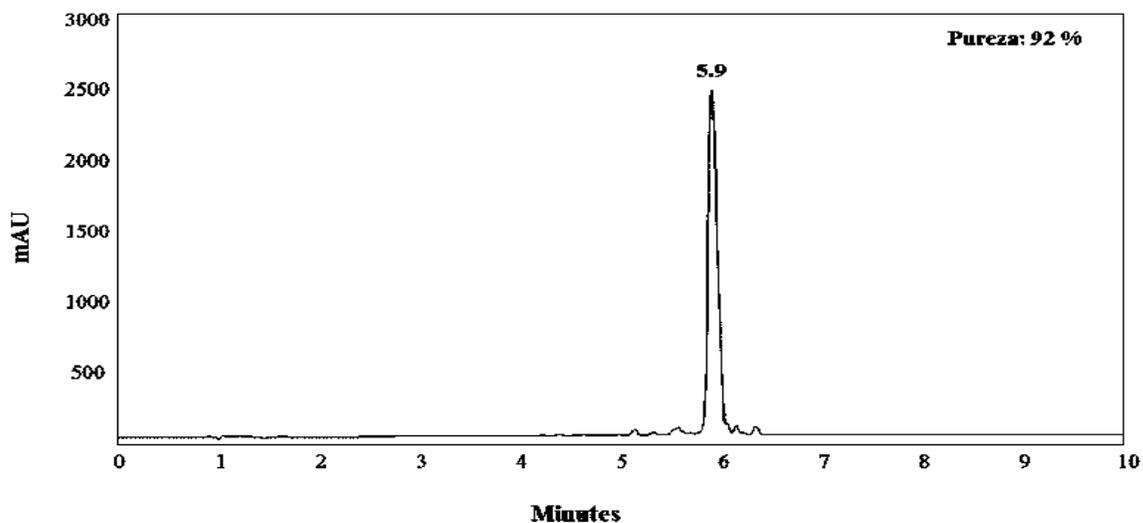
PÉPTIDO 571: GAKIKWSWKL

A



Exact Mass: 1214.73

B



C

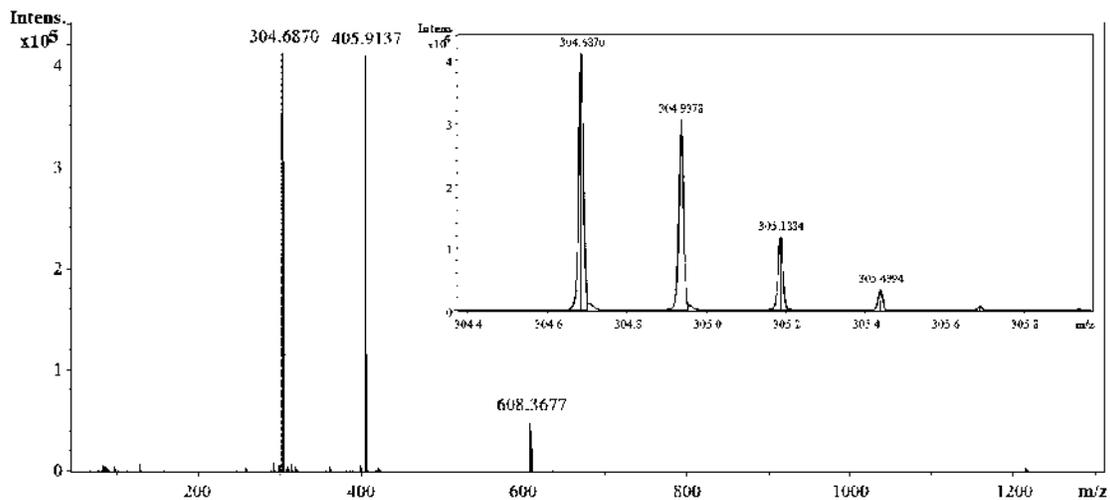
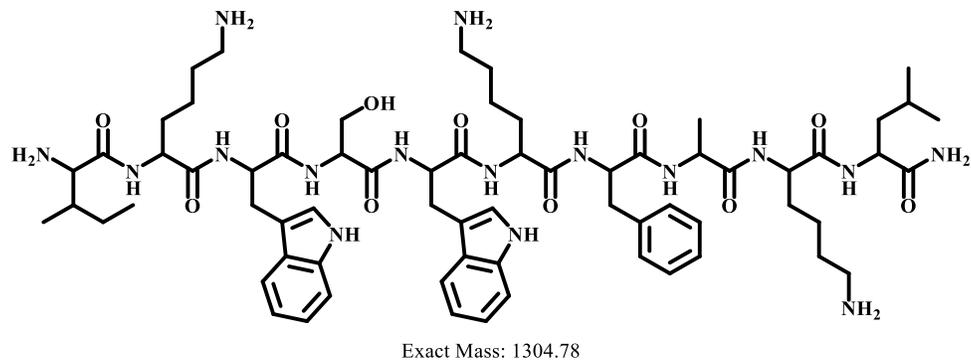


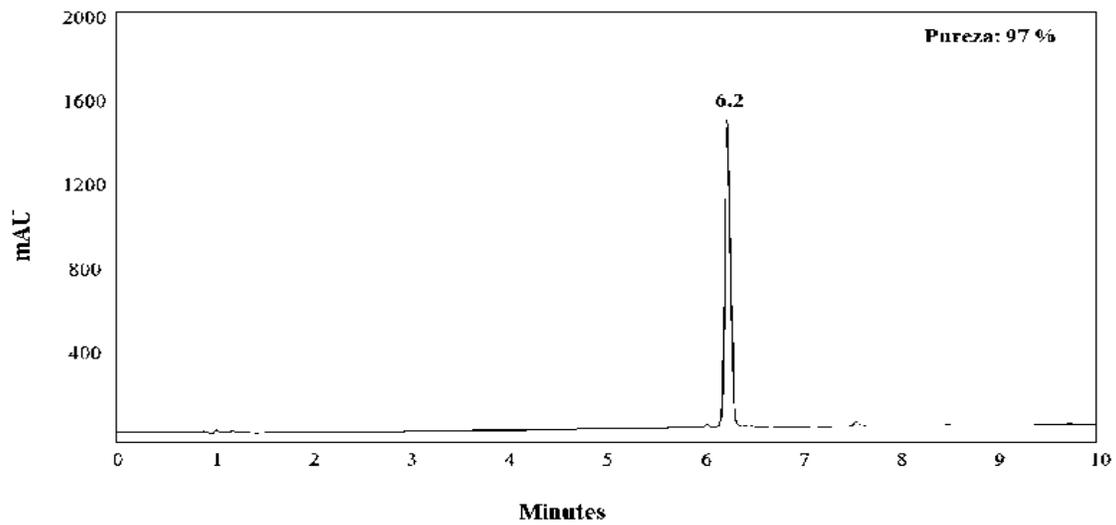
Figura 18. Caracterización del péptido 571. Se muestra la secuencia de aminoácidos (A) y los gráficos de la cromatografía líquida de alta eficiencia en modo fase reversa (B) y la espectrometría de masas (C).

PÉPTIDO 572: IKWSWKFAKL

A



B



C

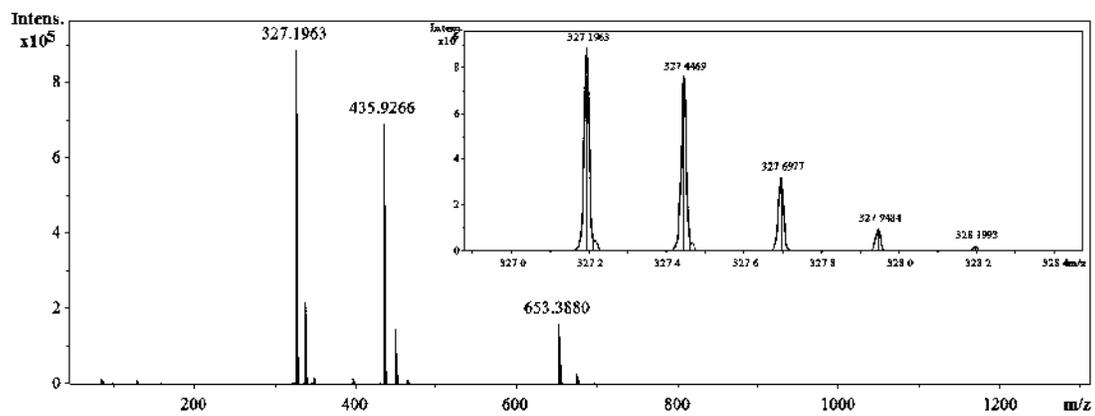
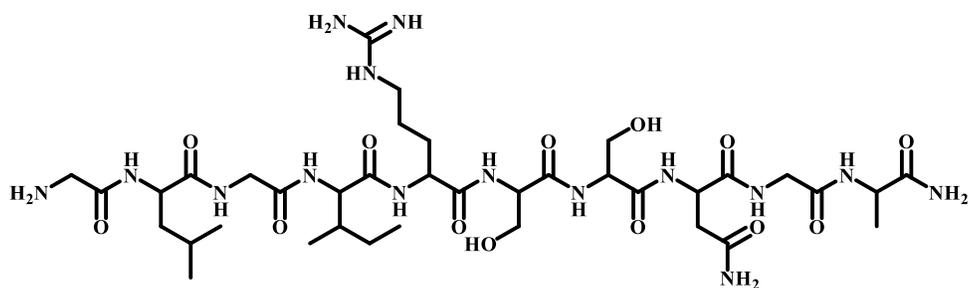


Figura 19. Caracterización del péptido 572. Se muestra la secuencia de aminoácidos (A) y los gráficos de la cromatografía líquida de alta eficiencia en modo fase reversa (B) y la espectrometría de masas (C).

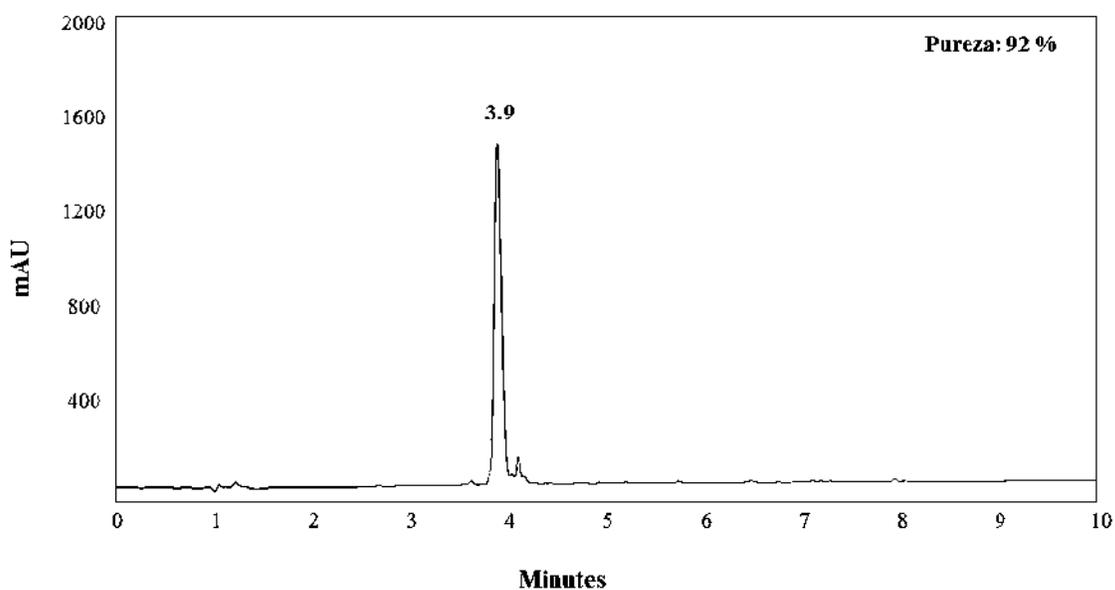
PÉPTIDO 582: GLGIRSSNGA

A



Exact Mass: 929.50

B



C

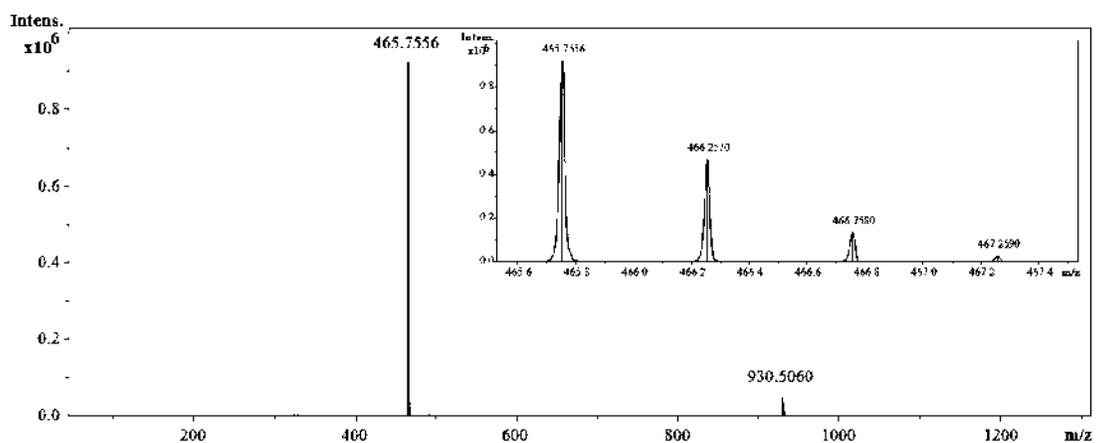
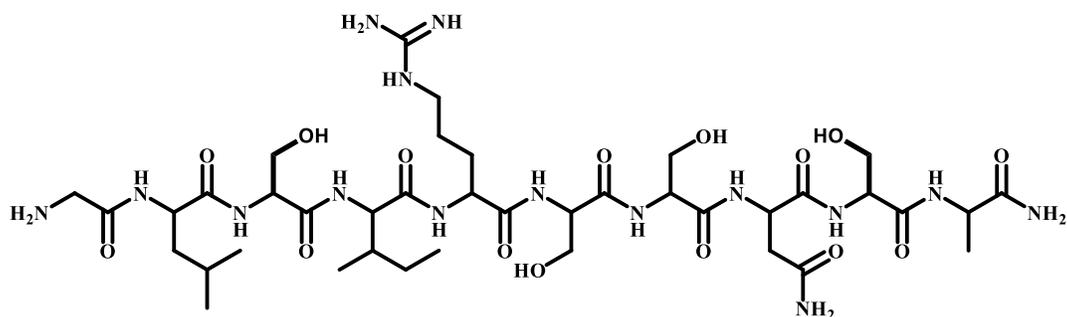


Figura 20. Caracterización del péptido 582. Se muestra la secuencia de aminoácidos (A) y los gráficos de la cromatografía líquida de alta eficiencia en modo fase reversa (B) y la espectrometría de masas (C).

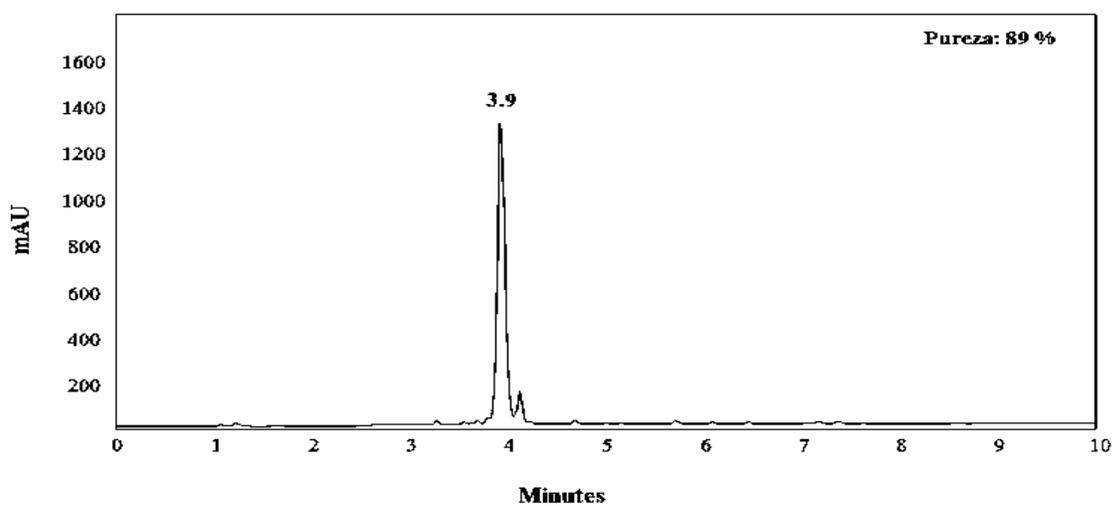
PÉPTIDO 583: GLSIRSSNSA

A



Exact Mass: 989.53

B



C

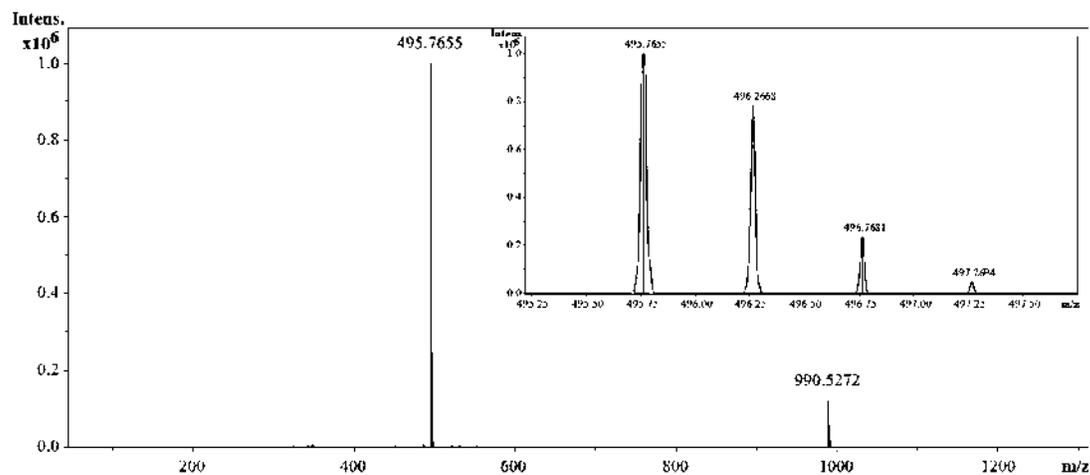
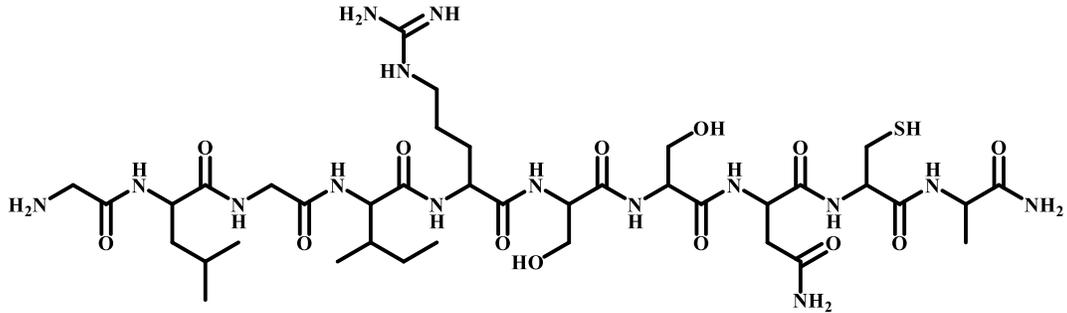


Figura 21. Caracterización del péptido 583. Se muestra la secuencia de aminoácidos (A) y los gráficos de la cromatografía líquida de alta eficiencia en modo fase reversa (B) y la espectrometría de masas (C).

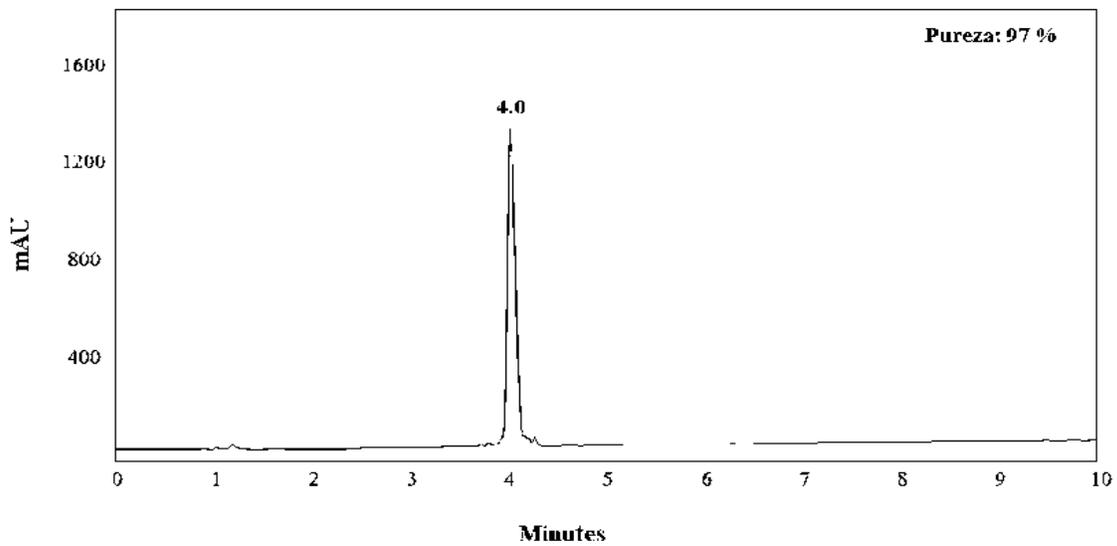
PÉPTIDO 584: GLGIRSSNCA

A



Exact Mass: 975.49

B



C

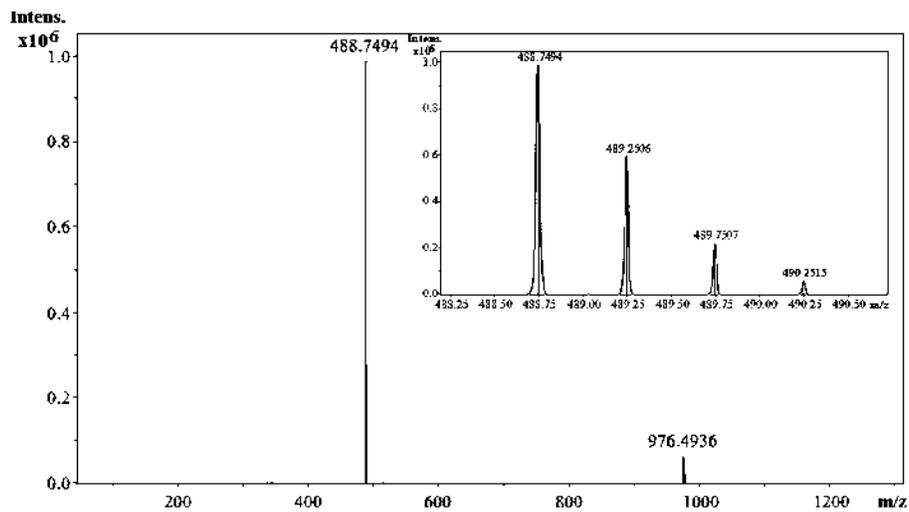
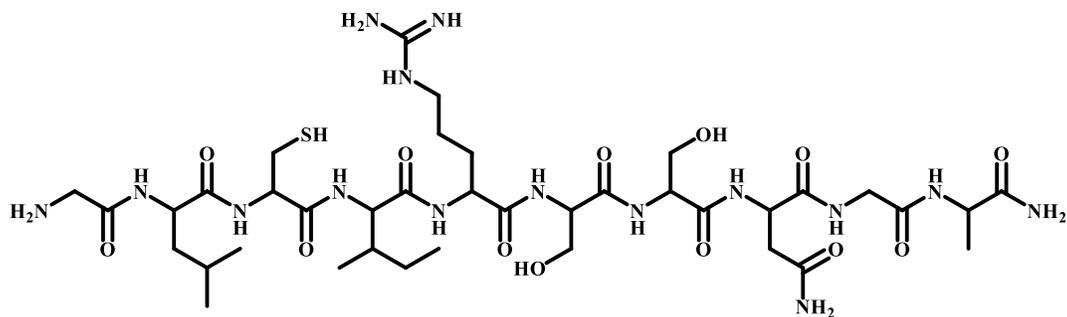


Figura 22. Caracterización del péptido 584. Se muestra la secuencia de aminoácidos (A) y los gráficos de la cromatografía líquida de alta eficiencia en modo fase reversa (B) y la espectrometría de masas (C).

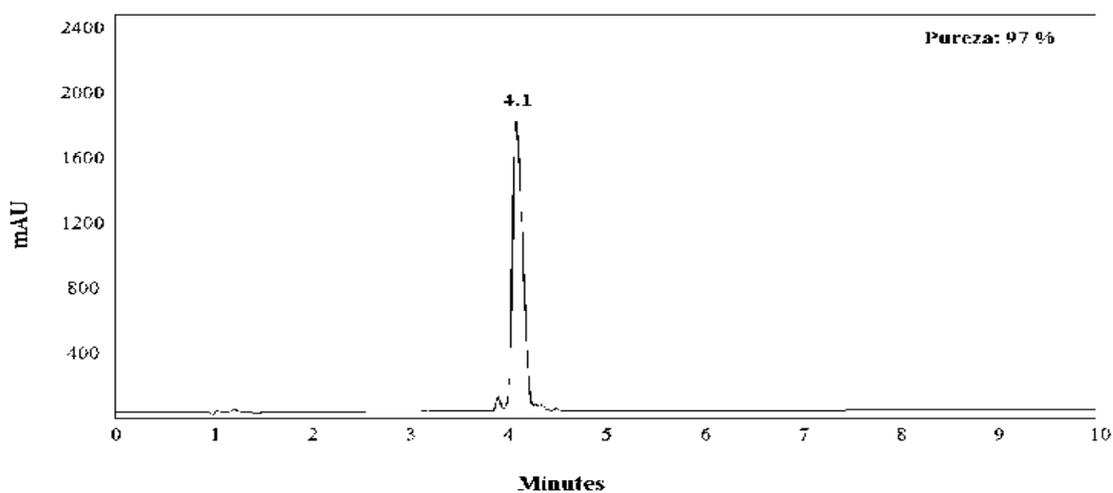
PÉPTIDO 585: GLCIRSSNGA

A



Exact Mass: 975.49

B



C

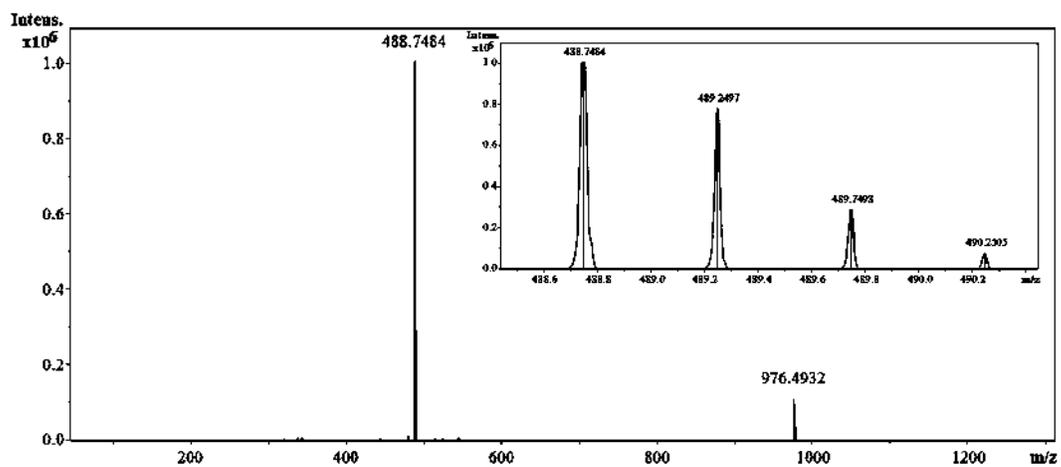
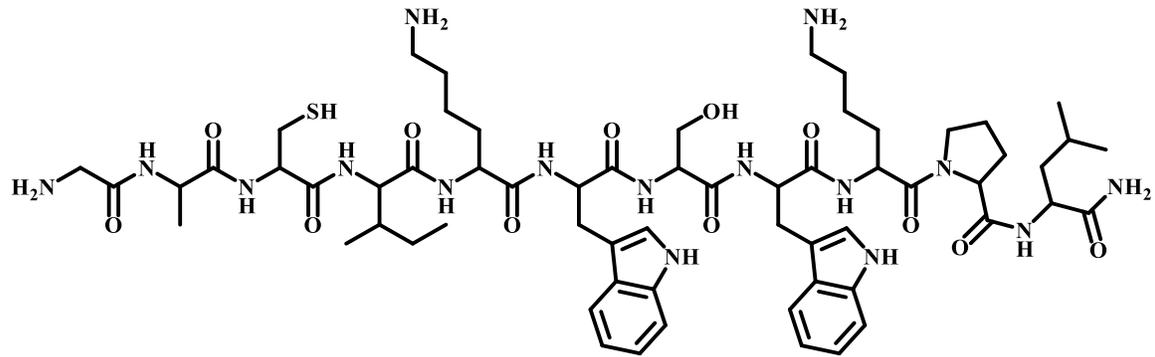


Figura 23. Caracterización del péptido 585. Se muestra la secuencia de aminoácidos (A) y los gráficos de la cromatografía líquida de alta eficiencia en modo fase reversa (B) y la espectrometría de masas (C).

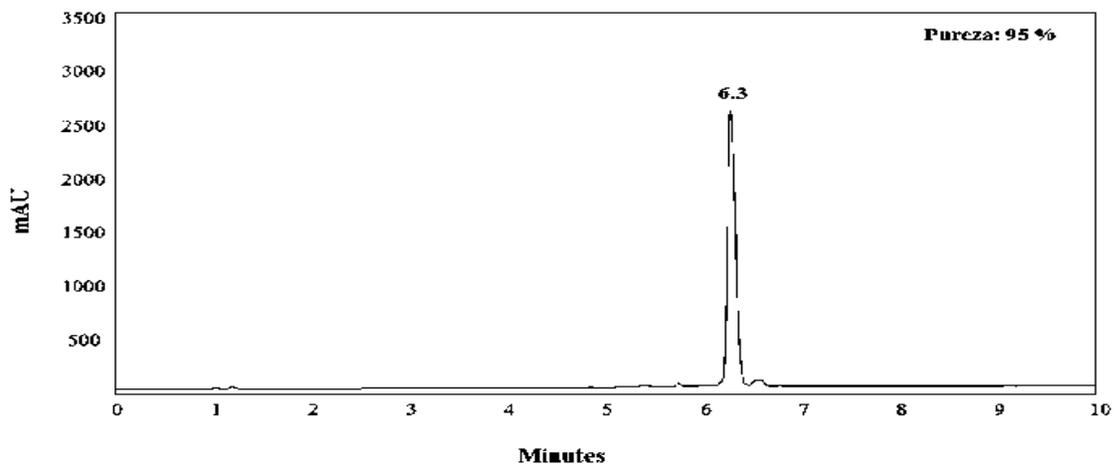
PÉPTIDO 595: GACIKWSWKPL

A



Exact Mass: 1286.70

B



C

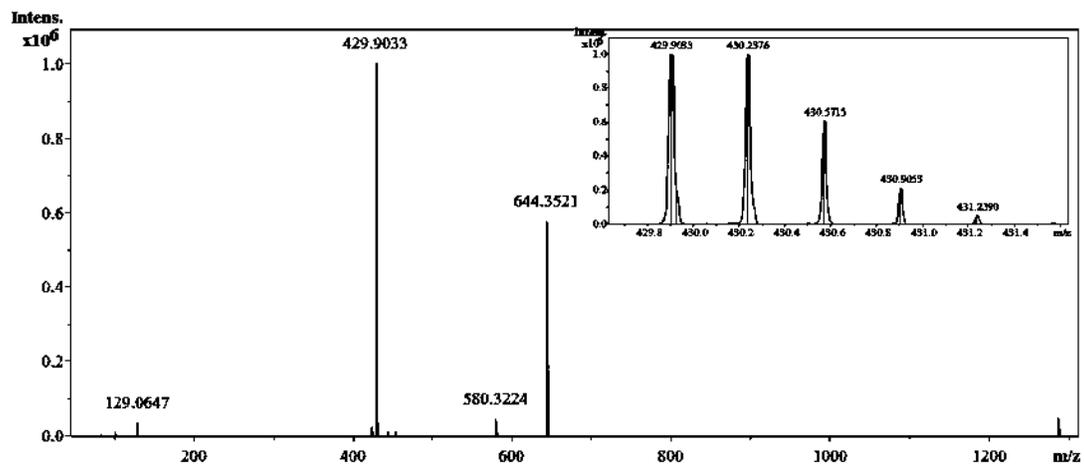
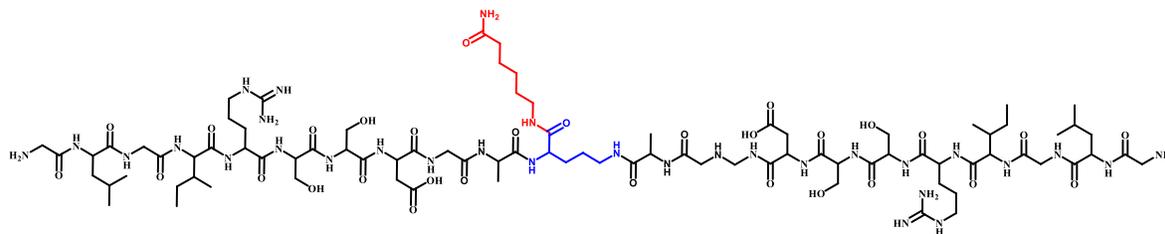


Figura 24. Caracterización del péptido 595. Se muestra la secuencia de aminoácidos (A) y los gráficos de la cromatografía líquida de alta eficiencia en modo fase reversa (B) y la espectrometría de masas (C).

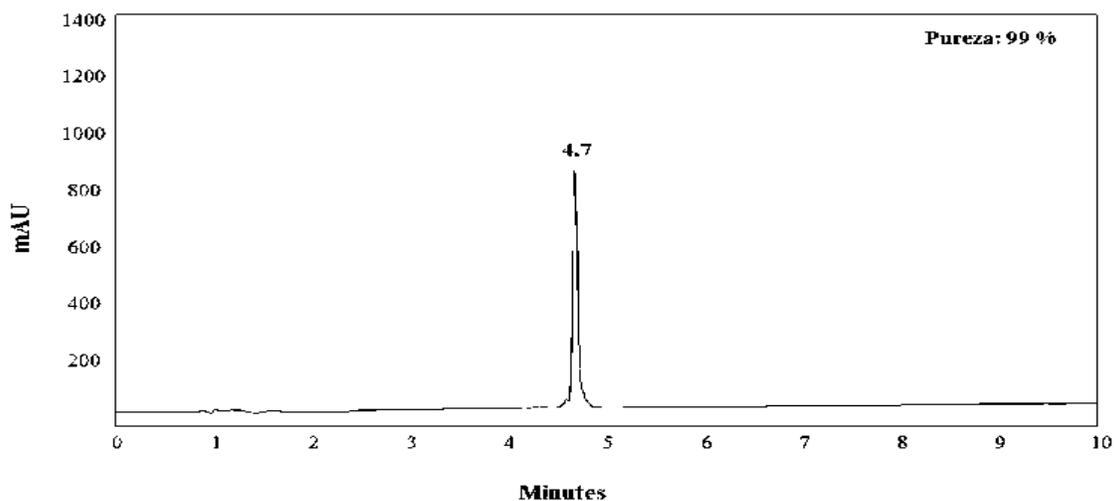
PÉPTIDO 596: (GLGIRSSNGA)2-K-Ahx

A



Exact Mass: 2100.14

B



C

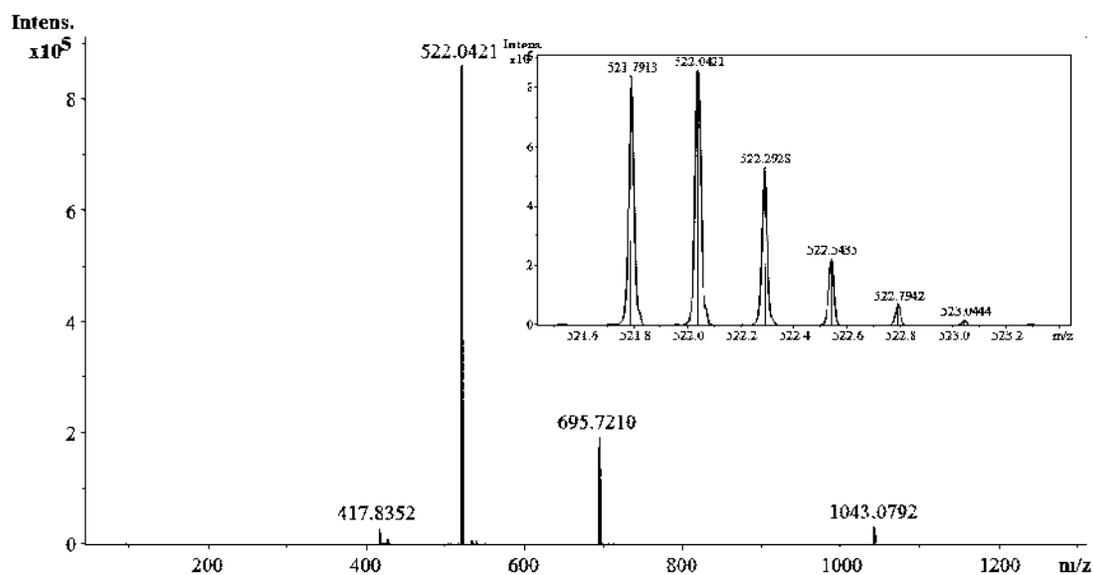


Figura 25. Caracterización del péptido 596. Se muestra la secuencia de aminoácidos (A) y los gráficos de la cromatografía líquida de alta eficiencia en modo fase reversa (B) y la espectrometría de masas (C).

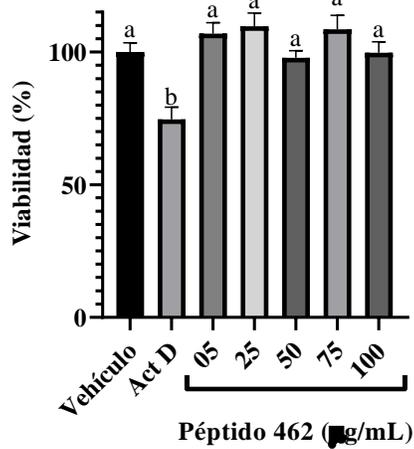
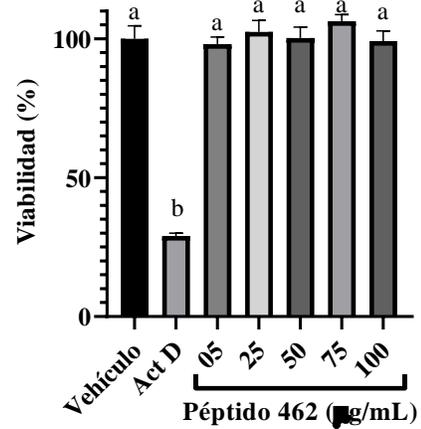
A**B**

Figura 26. Efecto del péptido 462 en la viabilidad de las células MCF-7. Las células se trataron con concentraciones crecientes del péptido 462 (05, 25, 50, 75 y 100 µg/mL) durante (A) 24 y (B) 48 h, y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. Se utilizó agua desionizada como vehículo y Actinomicina D (Act D) a una concentración de 10 µM como control de muerte positivo. Los datos muestran la media de tres experimentos realizados por triplicado. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p < 0.05$).

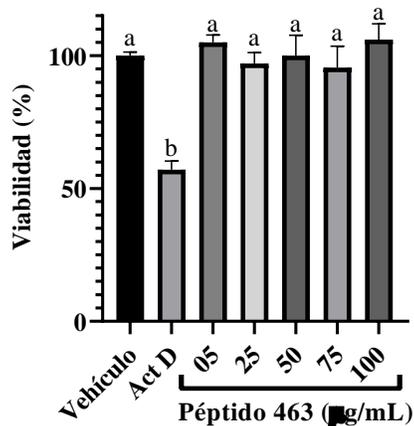
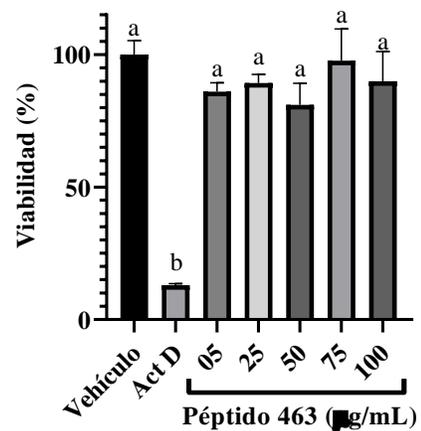
A**B**

Figura 27. Efecto del péptido 463 en la viabilidad de las células MCF-7. Las células se trataron con concentraciones crecientes del péptido 463 (05, 25, 50, 75 y 100 µg/mL) durante (A) 24 y (B) 48 h, y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. Se utilizó agua desionizada como vehículo y Actinomicina D (Act D) a una concentración de 10 µM como control de muerte positivo. Los datos muestran la media de tres experimentos realizados por triplicado. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p < 0.05$).

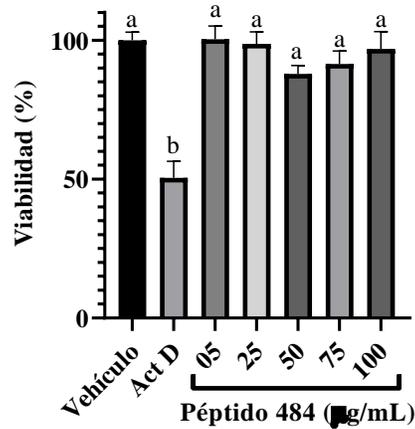
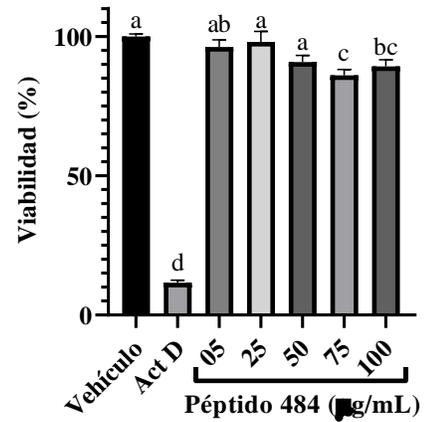
A**B**

Figura 28. Efecto del péptido 484 en la viabilidad de las células MCF-7. Las células se trataron con concentraciones crecientes del péptido 484 (05, 25, 50, 75 y 100 µg/mL) durante (A) 24 y (B) 48 h, y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. Se utilizó agua desionizada como vehículo y Actinomicina D (Act D) a una concentración de 10 µM como control de muerte positivo. Los datos muestran la media de tres experimentos realizados por triplicado. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p < 0.05$).

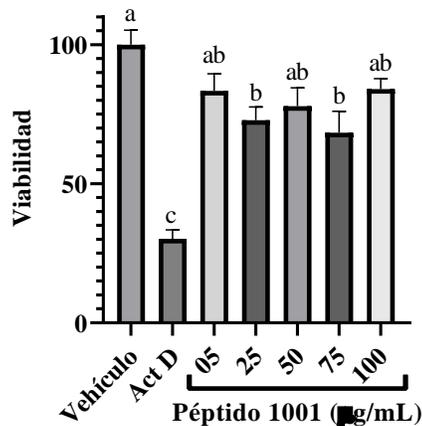
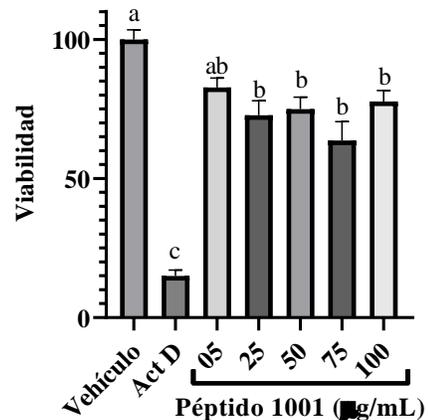
A**B**

Figura 29. Efecto del péptido 1001 en la viabilidad de las células MCF-7. Las células se trataron con concentraciones crecientes del péptido 1001 (05, 25, 50, 75 y 100 µg/mL) durante (A) 24 y (B) 48 h, y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. Se utilizó DMSO (5%) como vehículo y Actinomicina D (Act D) a una concentración de 10 µM como control de muerte positivo. Los datos muestran la media de tres experimentos realizados por triplicado. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p < 0.05$).

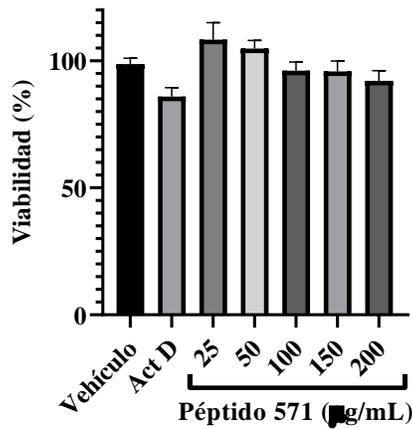
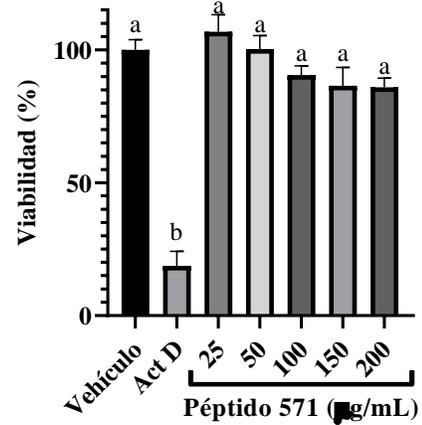
A**B**

Figura 30. Efecto del péptido 571 en la viabilidad de las células MCF-7. Las células se trataron con concentraciones crecientes del péptido 571 (25, 50, 100, 150 y 200 µg/mL) durante (A) 24 y (B) 48 h, y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. Se utilizó agua desionizada como vehículo y Actinomicina D (Act D) a una concentración de 10 µM como control de muerte positivo. Los datos muestran la media de tres experimentos realizados por triplicado. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p < 0.05$).

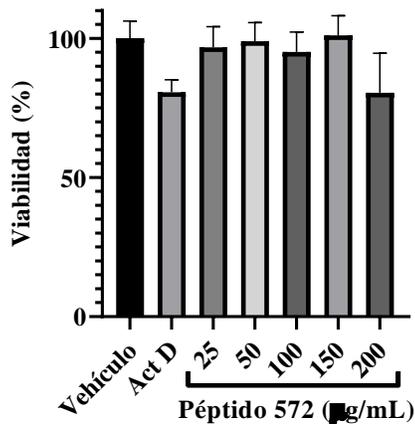
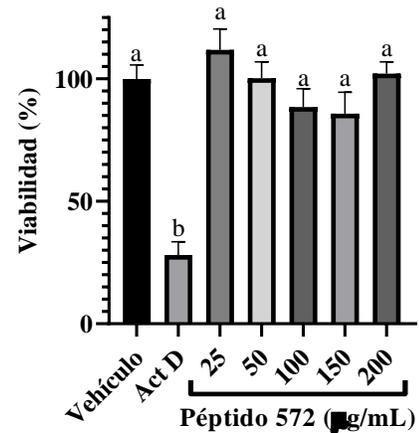
A**B**

Figura 31. Efecto del péptido 572 en la viabilidad de las células MCF-7. Las células se trataron con concentraciones crecientes del péptido 572 (25, 50, 100, 150 y 200 µg/mL) durante (A) 24 y (B) 48 h, y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. Se utilizó agua desionizada como vehículo y Actinomicina D (Act D) a una concentración de 10 µM como control de muerte positivo. Los datos muestran la media de tres experimentos realizados por triplicado. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p < 0.05$).

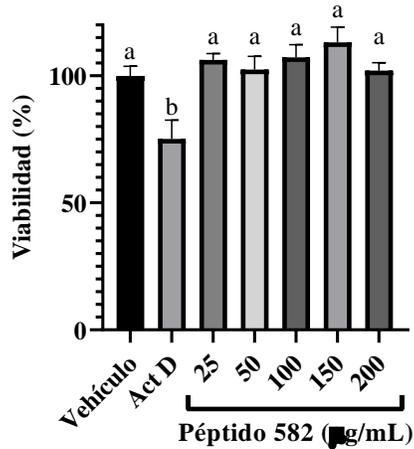
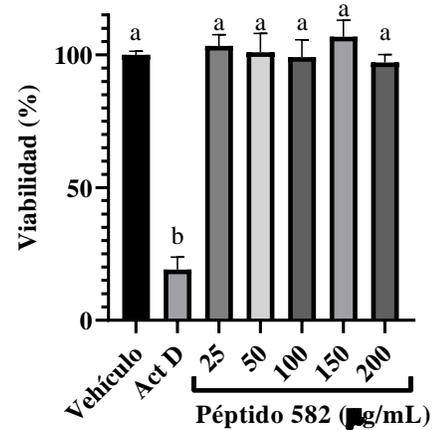
A**B**

Figura 32. Efecto del péptido 582 en la viabilidad de las células MCF-7. Las células se trataron con concentraciones crecientes del péptido 582 (25, 50, 100, 150 y 200 µg/mL) durante (A) 24 y (B) 48 h, y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. Se utilizó agua desionizada como vehículo y Actinomicina D (Act D) a una concentración de 10 µM como control de muerte positivo. Los datos muestran la media de tres experimentos realizados por triplicado. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p < 0.05$).

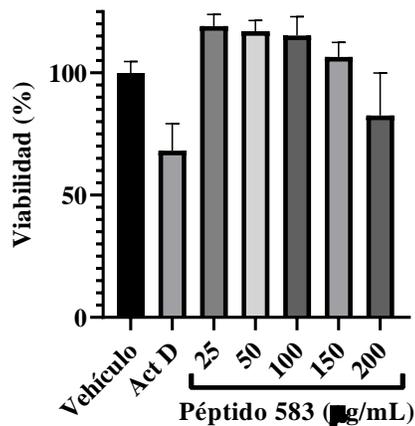
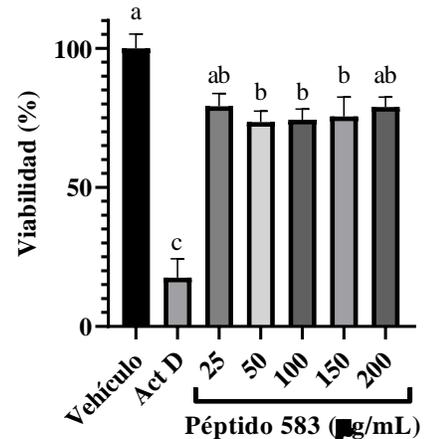
A**B**

Figura 33. Efecto del péptido 583 en la viabilidad de las células MCF-7. Las células se trataron con concentraciones crecientes del péptido 583 (25, 50, 100, 150 y 200 µg/mL) durante (A) 24 y (B) 48 h, y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. Se utilizó agua desionizada como vehículo y Actinomicina D (Act D) a una concentración de 10 µM como control de muerte positivo. Los datos muestran la media de tres experimentos realizados por triplicado. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p < 0.05$).

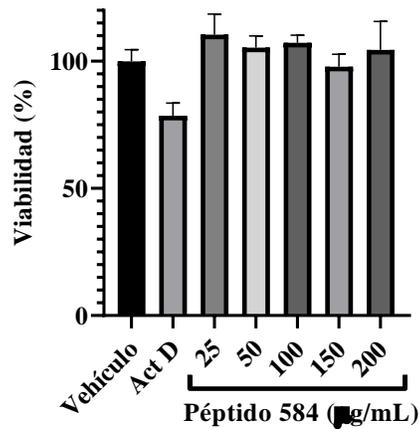
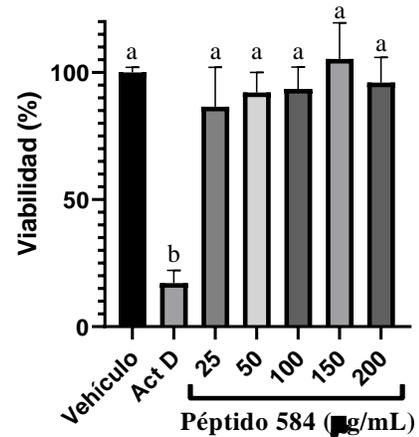
A**B**

Figura 34. Efecto del péptido 584 en la viabilidad de las células MCF-7. Las células se trataron con concentraciones crecientes del péptido 584 (25, 50, 100, 150 y 200 µg/mL) durante (A) 24 y (B) 48 h, y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. Se utilizó agua desionizada como vehículo y Actinomicina D (Act D) a una concentración de 10 µM como control de muerte positivo. Los datos muestran la media de tres experimentos realizados por triplicado. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p < 0.05$).

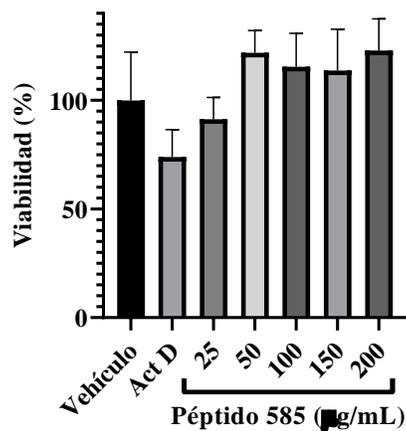
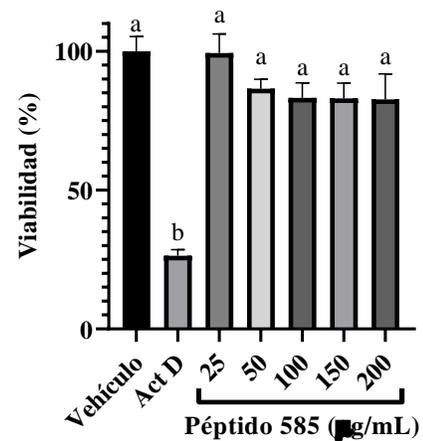
A**B**

Figura 35. Efecto del péptido 585 en la viabilidad de las células MCF-7. Las células se trataron con concentraciones crecientes del péptido 585 (25, 50, 100, 150 y 200 µg/mL) durante (A) 24 y (B) 48 h, y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. Se utilizó agua desionizada como vehículo y Actinomicina D (Act D) a una concentración de 10 µM como control de muerte positivo. Los datos muestran la media de tres experimentos realizados por triplicado. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p < 0.05$).

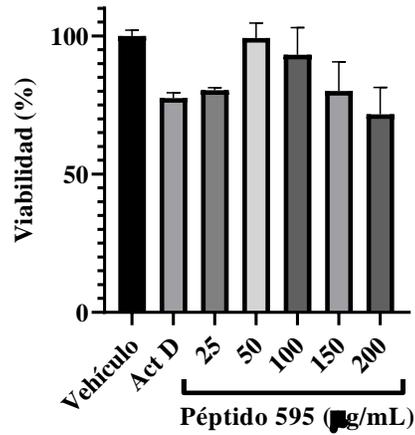
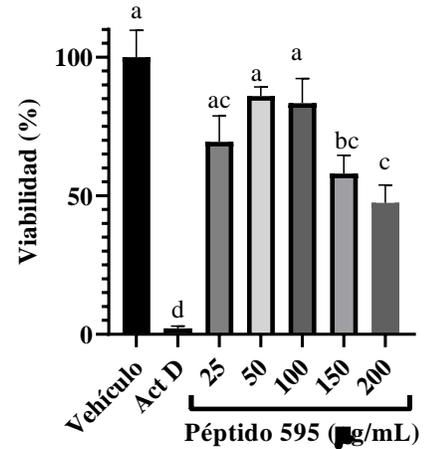
A**B**

Figura 36. Efecto del péptido 595 en la viabilidad de las células MCF-7. Las células se trataron con concentraciones crecientes del péptido 595 (25, 50, 100, 150 y 200 µg/mL) durante (A) 24 y (B) 48 h, y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. Se utilizó agua desionizada como vehículo y Actinomicina D (Act D) a una concentración de 10 µM como control de muerte positivo. Los datos muestran la media de tres experimentos realizados por triplicado. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p < 0.05$).

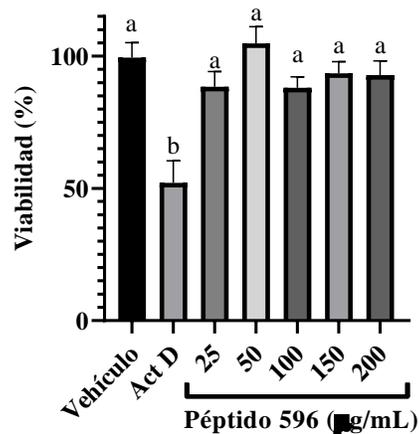
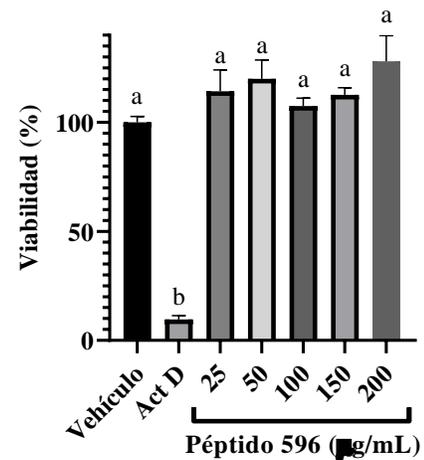
A**B**

Figura 37. Efecto del péptido 596 en la viabilidad de las células MCF-7. Las células se trataron con concentraciones crecientes del péptido 596 (25, 50, 100, 150 y 200 µg/mL) durante (A) 24 y (B) 48 h, y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. Se utilizó agua desionizada como vehículo y Actinomicina D (Act D) a una concentración de 10 µM como control de muerte positivo. Los datos muestran la media de tres experimentos realizados por triplicado. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía y comparación de Tukey, $p < 0.05$).

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, P., Bhagat, D., Mahalwal, M., Sharma, N., & Raghava, G. (2021). AntiCP 2.0: an updated model for predicting anticancer peptides. *Briefings in bioinformatics*, 22(3), bbaa153. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa153>
- Al-Benna, S., Shai, Y., Jacobsen, F., & Steinstraesser, L. (2011). Oncolytic activities of host defense peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(11), 8027-8051. <https://doi.org/10.3390/ijms12118027>
- Baindara, P., Kapoor, A., Korpole, S., & Grover, V. (2017). Cysteine-rich low molecular weight antimicrobial peptides from *Brevibacillus* and related genera for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 33(6), 124. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2291-9>
- Baker, M., Maloy, W., Zasloff, M., & Jacob, L. (1993). Anticancer efficacy of Magainin2 and analogue peptides. *Cancer Research*, 53(13), 3052-3057.
- Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M., Moradi-Kalbolandi, S., Safari, E., & Farahmand, L. (2020). Breast cancer: biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*, 84, 106535. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106535>
- Baxter, A., Poon, I., & Hulett, M. (2017). The plant defensin NaD1 induces tumor cell death via a non-apoptotic, membranolytic process. *Cell Death Discovery*, 3, 16102. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.102>
- Baxter, A., Richter, V., Lay, F., Poon, I., Adda, C., Veneer, P., Phan, T., Bleackley, M., Anderson, M., Kvansakul, M. & Hulett, M. (2015). The tomato defensin TPP3 binds phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate via a conserved dimeric cationic grip

- conformation to mediate cell lysis. *Molecular and Cellular Biology*, 35(11), 1964-1978. <https://doi.org/10.1128/MCB.00282-15>
- D'Arcy, M. (2019). Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582-592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- de Oliveira Mello, É., Taveira, G. B., de Oliveira Carvalho, A., & Gomes, V. M. (2019). Improved smallest peptides based on positive charge increase of the γ -core motif from PvD1 and their mechanism of action against *Candida* species. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 407-420. <https://doi.org/10.2147/IJN.S187957>
- Deslouches, B. & Di, Y. (2017). Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: prospect for anticancer applications. *Oncotarget*, 8(28), 46635-46651. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16743>
- do Amaral, V., Santos, S., de Andrade, P., Nowatzki, J., Júnior, N., de Medeiros, L., Gitirana, L., Pascutti, P., Almeida, V., Monteiro, R. & Kurtenbach, E. (2020). *Pisum sativum* defensin 1 eradicates mouse metastatic lung nodules from B16F10 melanoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2662. <https://doi.org/10.3390/ijms21082662>
- Eckert, R. (2011). Road to clinical efficacy: Challenges and novel strategies for antimicrobial peptide development. *Future Microbiology*, 6(6), 635-651. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.27>
- Eijsink, V., Skeie, M., Middelhoven, P., Brurberg, M., & Nes, I. (1998). Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3275-3281.

- Fadnes, B., Uhlin-Hansen, L., Lindin, I., & Rekdal, Ø. (2011). Small lytic peptides escape the inhibitory effect of heparan sulfate on the surface of cancer cells. *BMC Cancer*, *11*, 116. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-116>
- Fass, D. (2012). Disulfide bonding in protein biophysics. *Annual review of biophysics*, *41*, 63–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-050511-102321>
- Felício, M., Silva, O., Gonçalves, S., Santos, N. & Franco, O. (2017). Peptides with dual antimicrobial and anticancer activities. *Frontiers in Chemistry*, *5*, 5. <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00005>
- Figueira, T., Oliveira, F., Almeida, I., Mello, É., Gomes, V., Castanho, M. & Gaspar, D. (2017). Challenging metastatic breast cancer with the natural defensin PvD1. *Nanoscale*, *9*(43), 16887-16899. <https://doi.org/10.1039/C7NR05872A>
- Fimland, G., Johnsen, L., Axelsson, L., Brurberg, M., Nes, I., Eijsink, V., & Nissen-Meyer, J. (2000). A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *Journal of Bacteriology*, *182*(9), 2643-2648. <https://doi.org/10.1128/JB.182.9.2643-2648.2000>
- Fisher, E., Pavlenko, K., Vlasov, A., & Ramenskaya, G. (2019). Peptide-based therapeutics for oncology. *Pharmaceutical Medicine*, *33*(1), 9-20. <https://doi.org/10.1007/s40290-018-0261-7>
- Flores-Alvarez, L. J., Guzmán-Rodríguez, J. J., López-Gómez, R., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J. E. (2018). PaDef defensin from avocado (*Persea americana* var. *Drymifolia*) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *99*, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.03.013>

- Gabernet, G., Gautschi, D., Müller, A. T., Neuhaus, C. S., Armbrrecht, L., Dittrich, P. S., Hiss, J. A., & Schneider, G. (2019). In silico design and optimization of selective membranolytic anticancer peptides. *Scientific Reports*, 9, 11282. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47568-9>
- Gaspar, D., Veiga, A. S., & Castanho, M. A. R. B. (2013). From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in Microbiology*, 4, 294. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00294>
- Global Cancer Observatory*. Recuperado 7 de julio de 2021, de <https://gco.iarc.fr/>
- Guerra, J. R., Cárdenas, A. B., Ochoa-Zarzosa, A., Meza, J. L., Umaña Pérez, A., Fierro-Medina, R., Rivera Monroy, Z. J., & García Castañeda, J. E. (2019). The tetrameric peptide LfcinB (20-25)₄ derived from bovine lactoferricin induces apoptosis in the MCF-7 breast cancer cell line. *RSC Advances*, 9(36), 20497-20504. <https://doi.org/10.1039/c9ra04145a>
- Guzmán-Rodríguez, J. J., López-Gómez, R., Salgado-Garciglia, R., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J. E. (2016). The defensin from avocado (*Persea americana* var. *Drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 82, 620-627. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.048>
- Guzmán-Rodríguez, J. J., López-Gómez, R., Suárez-Rodríguez, L. M., Salgado-Garciglia, R., Rodríguez-Zapata, L. C., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J. E. (2013). Antibacterial activity of defensin PaDef from avocado fruit (*Persea americana* var. *Drymifolia*) expressed in endothelial cells against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*, 2013, 986273. <https://doi.org/10.1155/2013/986273>

- Guzmán-Rodríguez, J. J., Ochoa-Zarzosa, A., López-Gómez, R., & López-Meza, J. E. (2015). Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents. *BioMed Research International*, 2015, 735087. <https://doi.org/10.1155/2015/735087>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hu, C., Chen, X., & Zhao, W. (2016). Design and modification of anticancer peptides. *Drug Designing: Open Access*, 05(03). <https://doi.org/10.4172/2169-0138.1000138>
- Ilango, S., Paital, B., Jayachandran, P., Padma, P. R., & Nirmaladevi, R. (2020). Epigenetic alterations in cancer. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 25(6), 1058-1109. <https://doi.org/10.2741/4847>
- Insuasty Cepeda, D. S., Pineda Castañeda, H. M., Rodríguez Mayor, A. V., García Castañeda, J. E., Maldonado Villamil, M., Fierro Medina, R., & Rivera Monroy, Z. J. (2019). Synthetic peptide purification via solid-phase extraction with gradient elution: a simple, economical, fast, and efficient methodology. *Molecules*, 24(7), 1215. <https://doi.org/10.3390/molecules24071215>
- Insuasty-Cepeda, D. S., Barragán-Cárdenas, A. C., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Fierro-Medina, R., García-Castañeda, J. E., & Rivera-Monroy, Z. J. (2020). Peptides derived from (RRWQWRMKKLG)2-K-Ahx induce selective cellular death in breast cancer cell lines through apoptotic pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12). <https://doi.org/10.3390/ijms21124550>
- Iwasaki, T., Ishibashi, J., Tanaka, H., Sato, M., Asaoka, A., Taylor, D., & Yamakawa, M. (2009). Selective cancer cell cytotoxicity of enantiomeric 9-mer peptides derived

- from beetle defensins depends on negatively charged phosphatidylserine on the cell surface. *Peptides*, 30(4), 660-668. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.12.019>
- Jiménez-Alcántar, P., López-Gómez, R., López-Meza, J. E., & Ochoa-Zarzosa, A. (2022). PaDef (*Persea americana* var. *Drymifolia*), a plant antimicrobial peptide, triggers apoptosis, and induces global epigenetic modifications on histone 3 in an acute lymphoid leukemia cell line. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 801816. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.801816>
- Kang, H.-K., Kim, C., Seo, C. H., & Park, Y. (2017). The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 55(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6452-1>
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility *in vivo*. *Biomolecules*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/biom8010004>
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
- Lay, F. T., & Anderson, M. A. (2005). Defensins—components of the innate immune system in plants. *Current Protein & Peptide Science*, 6(1), 85-101. <https://doi.org/10.2174/1389203053027575>
- Lin, P., Wong, J. H., & Ng, T. B. (2009). A defensin with highly potent antipathogenic activities from the seeds of purple pole bean. *Bioscience Reports*, 30(2), 101-109. <https://doi.org/10.1042/BSR20090004>
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., & Scott, M. P. (2012). *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman.

- Mishra, A. K., Choi, J., Moon, E., & Baek, K.-H. (2018). Tryptophan-rich and proline-rich antimicrobial peptides. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/molecules23040815>
- Moore, A. J., Devine, D. A., & Bibby, M. C. (1994). Preliminary experimental anticancer activity of cecropins. *Peptide Research*, 7(5), 265-269.
- Nan, Y. H., Park, K. H., Park, Y., Jeon, Y. J., Kim, Y., Park, I.-S., Hahm, K.-S., & Shin, S. Y. (2009). Investigating the effects of positive charge and hydrophobicity on the cell selectivity, mechanism of action and anti-inflammatory activity of a Trp-rich antimicrobial peptide indolicidin. *FEMS Microbiology Letters*, 292(1), 134-140. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01484.x>
- Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W., & Goździcka-Józefiak, A. (2014). Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiologica*, 59(3), 181-196. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0280-4>
- Organización Mundial de la Salud. (2018, septiembre 12). *Cáncer*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Organización Mundial de la Salud. (2021). *Cáncer de mama*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- Orrapin, S., Intorasoot, A., Roytrakul, S., Dechsupa, N., Kantapan, J., Onphat, Y., Srimek, C., Sitthidet Tharinjaroen, C., Anukool, U., Butr-Indr, B., Phunpae, P., & Intorasoot, S. (2019). A novel recombinant javanicin with dual antifungal and anti-proliferative activities. *Scientific Reports*, 9, 18417. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55044-7>
- Parisi, K., Shafee, T. M. A., Quimbar, P., van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. A. (2019). The evolution, function and mechanisms of action for plant

- defensins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 88, 107-118.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.004>
- Parvy, J.-P., Yu, Y., Dostalova, A., Kondo, S., Kurjan, A., Bulet, P., Lemaître, B., Vidal, M., & Cordero, J. B. (2019). The antimicrobial peptide defensin cooperates with tumour necrosis factor to drive tumour cell death in *Drosophila*. *ELife*, 8.
<https://doi.org/10.7554/eLife.45061>
- Peters, B. M., Shirliff, M. E., & Jabra-Rizk, M. A. (2010). Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathogens*, 6(10), e1001067.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001067>
- Petkov, P., Lilkova, E., Ilieva, N., & Litov, L. (2019). Self-Association of Antimicrobial Peptides: A Molecular Dynamics Simulation Study on Bombinin. *International journal of molecular sciences*, 20(21), 5450. <https://doi.org/10.3390/ijms20215450>
- Pushpanathan, M., Gunasekaran, P., & Rajendhran, J. (2013). Antimicrobial peptides: versatile biological properties. *International Journal of Peptides*, 2013, 675391.
<https://doi.org/10.1155/2013/675391>
- Ren, S. X., Shen, J., Cheng, A. S. L., Lu, L., Chan, R. L. Y., Li, Z. J., Wang, X. J., Wong, C. C. M., Zhang, L., Ng, S. S. M., Chan, F. L., Chan, F. K. L., Yu, J., Sung, J. J. Y., Wu, W. K. K., & Cho, C. H. (2013). FK-16 derived from the anticancer peptide LL-37 induces caspase-independent apoptosis and autophagic cell death in colon cancer cells. *PloS One*, 8(5), e63641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063641>
- Sagaram, U. S., Pandurangi, R., Kaur, J., Smith, T. J., & Shah, D. M. (2011). Structure-activity determinants in antifungal plant defensins MsDef1 and MtDef4 with different modes of action against *Fusarium graminearum*. *PloS One*, 6(4), e18550.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018550>

- Shoombuatong, W., Schaduangrat, N., & Nantasenamat, C. (2018). Unraveling the bioactivity of anticancer peptides as deduced from machine learning. *EXCLI Journal*, 17, 734-752. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1447>
- Sierra, J. M., Fusté, E., Rabanal, F., Vinuesa, T., & Viñas, M. (2017). An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 17(6), 663-676. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1315402>
- Solarte, V. A., Rosas, J. E., Rivera, Z. J., Arango-Rodríguez, M. L., García, J. E., & Vernot, J.-P. (2015). A tetrameric peptide derived from bovine lactoferricin exhibits specific cytotoxic effects against oral squamous-cell carcinoma cell lines. *BioMed Research International*, 2015, 630179. <https://doi.org/10.1155/2015/630179>
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719. <https://doi.org/10.1038/nature07943>
- Vargas Casanova, Y., Rodríguez Guerra, J. A., Umaña Pérez, Y. A., Leal Castro, A. L., Almanzar Reina, G., García Castañeda, J. E., & Rivera Monroy, Z. J. (2017). Antibacterial synthetic peptides derived from bovine lactoferricin exhibit cytotoxic effect against MDA-MB-468 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(10). <https://doi.org/10.3390/molecules22101641>
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *JAMA*, 321(3), 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
- Wong, J. H., & Ng, T. B. (2005). Sesquin, a potent defensin-like antimicrobial peptide from ground beans with inhibitory activities toward tumor cells and HIV-1 reverse transcriptase. *Peptides*, 26(7), 1120-1126. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.01.003>

- Wong, J. H., & Ng, T. B. (2006). Limenin, a defensin-like peptide with multiple exploitable activities from shelf beans. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 12(5), 341-346. <https://doi.org/10.1002/psc.732>
- Wu, D., Gao, Y., Qi, Y., Chen, L., Ma, Y., & Li, Y. (2014). Peptide-based cancer therapy: Opportunity and challenge. *Cancer Letters*, 351(1), 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.05.002>
- Zahreddine, H., & Borden, K. L. B. (2013). Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00028>
- Zhang, D., He, Y., Ye, Y., Ma, Y., Zhang, P., Zhu, H., Xu, N., & Liang, S. (2019). Little antimicrobial peptides with big therapeutic roles. *Protein and Peptide Letters*, 26(8), 564-578. <https://doi.org/10.2174/1573406415666190222141905>