



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Estudio de la actividad anticancerígena de un fragmento peptídico derivado del insecto coleóptero *Tribolium castaneum*

Tesis Doctoral

Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Genética

Aida Robles Fort

Mayo 2023

Tesis doctoral dirigida por:

Dra. M^a Dolores Real García

Dra. Carolina Rausell Segarra



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Departamento de Genética



Dra. CAROLINA RAUSELL SEGARRA, profesora titular de Universidad, y Dra. MARÍA DOLORES REAL GARCÍA, Catedrática de Universidad, del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València,

Informan

Que Dña. AIDA ROBLES FORT, graduada en Biología por la Universitat de València, ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo de investigación original recogido en la presente memoria titulada “Estudio de la actividad anticancerígena de un fragmento peptídico derivado del insecto coleóptero *Tribolium castaneum*”.

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo en el Departamento de Genética de la Universitat de València, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometidos a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al Grado de Doctor por la Universitat de València dentro del Programa Oficial de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología.

En Valencia, a 4 de mayo de 2023

Las directoras:

RAUSELL
SEGARRA
CAROLINA -
33403185D
Firmado digitalmente por
RAUSELL SEGARRA
CAROLINA -
33403185D
Fecha: 2023.05.10
18:32:41 +02'00'

REAL
GARCIA
MARIA
DOLORES -
22533784V
Firmado digitalmente por
REAL GARCIA
MARIA DOLORES
- 22533784V
Fecha: 2023.05.10
18:28:29 +02'00'

Dra. Carolina Rausell Segarra

Dra. M. Dolores Real García

Agradecimientos

Echando la vista atrás recuerdo aquel día, hace casi siete años, en el que entré por primera vez en el despacho de las que en un futuro serían mis directoras de tesis, preguntando por un TFG. Ellas, que siempre están dispuestas, me hablaron de un péptido antimicrobiano con el que querían hacer unas “pruebecitas” y ahí empezó todo. Me gustaría agradecer a Loles y Carol toda la confianza que siempre han depositado en mí y todo el esfuerzo que han hecho a lo largo de estos años para sacar adelante la investigación. También quiero agradecerles todo el aprendizaje que me han aportado, tanto a nivel profesional como personal, son de esas personas que te enriquecen. Gracias por vuestra comprensión, empatía y generosidad, creo que no podría haber tenido mejores directoras de TFG, TFM y tesis (aunque esto seguro que lo dice casi todo el mundo, en mi caso es cierto).

Por su puesto, especial mención a Inma, gracias por toda tu ayuda y dedicación. Por estar a mi lado para todo lo que he necesitado y más, fuese cuando fuese. Aunque finalmente no hicimos el *crowdfunding* para el robot con IA.

Gracias:

A las personas que han pasado por BIOMOL y han compartido su tiempo conmigo, Edu, Ricardo, Isabel, Sara... pero sobre todo a M^a José que pasó de ser una compañera de laboratorio a ser una buena amiga. ¡Muchas gracias por todo tu apoyo xiqueta!

A las chicAs de GMD Cristina y Fran por el intercambio de reactivos e información cuando nos ha hecho falta y por amenizar los días interminables.

Gracias a las secciones de cultivo celular y citometría de flujo, genómica y microscopía del SCSIE por su profesionalidad y la ayuda técnica otorgada. Especialmente a las técnicas Sandra Norte y Sara Fernández.

Al laboratorio de polímeros terapéuticos del CIPF dirigido por la Dra. M^a Jesús Vicent, por permitirme llevar a cabo algunos de los experimentos requeridos para la realización de esta investigación.

Al laboratorio de infecciones graves del IIS La Fe dirigido por la Dra. M^a Ángeles Tormo por la acogida y por permitirme realizar una estancia en su laboratorio.

A mi madre y a mi padre por el apoyo que me han dado a todos los niveles durante todo este tiempo para que pudiese dedicarme a lo que realmente me gusta. Y por andar siempre conmigo el camino que eligiese, aunque no fuese el terreno más transitable.

A Javi, por estar ahí, confiar siempre en mí y aguantar todas mis peculiaridades. También a su familia que siempre me ha apoyado y se ha interesado por cómo me había ido el día, aunque luego no entendiesen nada de lo que les contaba.

A mi amiga Paula, que a pesar de la distancia siempre está ahí para apoyarme en todo y a sus padres que siempre me han hecho sentir parte de su familia y han sido un apoyo incondicional durante todos estos años.

A mi tía Ester y por encima de todo a mi persona favorita en el mundo que es mi abuela. Desde que nací me ha transmitido el ejemplo de trabajo, dedicación, esfuerzo, constancia y cariño, y me ha enseñado a seguir adelante pase lo que pase. Te dedico esta tesis yaya, porque gran parte de lo que soy es gracias a ti.

Índice

Índice de figuras	11
Abreviaturas	15
Resumen	19
Introducción	21
1. Cáncer	23
1.1. Características de las células cancerosas	24
1.2. Microambiente tumoral	25
1.2.1 Hipoxia y angiogénesis	27
1.2.2 Matriz extracelular	29
1.2.3 Transición epitelio-mesénquima (ETM)	34
1.3. Incidencia y mortalidad en cáncer	37
2. Cáncer de mama	38
2.1 Cáncer de mama triple negativo (TNBC)	40
3. Cáncer de pulmón	41
3.1 Carcinomas de pulmón de células no microcíticas (NSCLC)	42
4. Péptidos terapéuticos en el tratamiento del cáncer	43
5. Péptidos antimicrobianos (AMPs)	47
5.1 Características de los AMPs	47
5.2 Clasificación de los AMPs	49
5.2.1 Clasificación de los AMPs según su origen	49
5.2.2 Clasificación de los AMPs según su estructura	51
5.2.3 Clasificación de los AMPs según su mecanismo de acción	53
5.2.4 Clasificación de los AMPs según su actividad biológica	56
5.3 Aplicaciones terapéuticas basadas en AMPs y potencial clínico	59
6. Actividad antimicrobiana y antiproliferativa del péptido TcPaSK	61
Objetivos	65

Material y métodos	69
1. Líneas celulares y condiciones de cultivo	71
2. Péptidos y polímeros utilizados	71
3. Ensayos de viabilidad celular MTS	72
4. Ensayos de viabilidad celular LDH	72
5. Ensayos de proliferación celular Oregon Green 488	73
6. Ensayos de adhesión celular	73
7. Ensayos de cicatrización de herida	74
8. Ensayos <i>in vitro</i> de migración e invasión celular	74
9. Ensayos de angiogénesis	75
10. Microscopía confocal	75
11. Citometría de flujo	76
12. Extracción de ARN, síntesis de ADNc, RT-PCR y RT-qPCR	77
13. Extracción de proteínas y Western-blot	79
14. Análisis estadístico	80
Resultados y discusión	81
1. Caracterización de la actividad antitumoral del péptido TcPaSK en células MDA-MB-231	83
1.1 Ensayos de viabilidad celular <i>in vitro</i>	83
1.2 Efecto del péptido TcPaSK sobre la integridad de las células MDA-MB-231	85
1.3 Interacción del péptido TcPaSK con células MDA-MB-231	87
2. Efecto del péptido TcPaSK sobre factores que determinan la progresión del cáncer	90
2.1 Angiogénesis	90
2.2 Hipoxia	92
3. Análisis de la capacidad antimetastásica del péptido TcPaSK en células MDA-MB-231	93
3.1 Adhesión celular	93
3.2 Migración e invasión	94
3.3 Transición epitelio-mesénquima (EMT)	95
4. Reconocimiento celular del péptido TcPaSK en células MDA-MB-231	101
4.1 Estudio de la interacción del péptido TcPaSK con la integrina $\alpha v\beta 3$	101

4.2 Análisis de correlación entre la subunidad $\beta 3$ de las integrinas y la expresión génica de marcadores mesenquimales en distintos tipos de carcinomas	105
5. Acción antitumoral del péptido TcPaSK en células tumorales de pulmón	108
5.1 Actividad del péptido TcPaSK en células A549	108
5.2 Efecto del péptido TcPaSK sobre factores que determinan la progresión del cáncer y la metástasis en células A549	112
5.3 Reconocimiento celular del péptido TcPaSK vía integrina $\alpha v\beta 3$ /TGF- $\beta 1$, en células A549	118
6. Efecto citotóxico de tratamientos combinados del péptido TcPaSK con agentes quimioterapéuticos en líneas celulares de cáncer de mama y de pulmón	120
6.1 Evaluación de la actividad citotóxica de tratamientos combinados del péptido TcPaSK con diferentes compuestos quimioterapéuticos en células MDA-MB-231	120
6.2 Evaluación de la actividad citotóxica de tratamientos combinados del péptido TcPaSK con el compuesto quimioterapéutico doxorrubicina en células A549	124
7. Desarrollo de conjugados poliméricos terapéuticos del péptido TcPaSK para su uso en estrategias de sensibilización a la quimioterapia	126
7.1 Evaluación de la actividad citotóxica de distintos conjugados poliméricos del péptido TcPaSK en la línea celular MDA-MB-231	127
7.2 Tratamientos combinados de doxorrubicina y PGA-HydDox con conjugados del péptido TcPaSK en células MDA-MB-231	128
Conclusiones	131
Bibliografía	135

Índice de figuras

1. Características distintivas de las células tumorales	25
2. Representación esquemática del TME	27
3. Vía de señalización celular del factor inducible por hipoxia HIF-1 α , en presencia o ausencia de oxígeno	29
4. Composición de la matriz extracelular	30
5. Estructura básica de un heterodímero de integrina	31
6. Señalización intracelular mediada por integrinas con motivo de unión RGD	32
7. Vías de señalización de TGF- β	33
8. Espectro de fenotipos de EMT en cáncer	34
9. Vía canónica de la biogénesis de miARNs	36
10. Distribución de incidencia y mortalidad de los siete tipos de cáncer más comunes en 2020 a nivel mundial	38
11. Opciones de terapias antitumorales basadas en péptidos	44
12. Clasificación de AMPs	50
13. Estructura de los AMPs	52
14. Mecanismos de acción de los AMPs membranolíticos	55
15. Actividades biológicas de los AMPs	56
16. Estructura del péptido TcPaSK	62
17. Células de <i>S. aureus</i> tratadas con el péptido TcPaSK	63
18. Actividad antiproliferativa del péptido TcPaSK contra células tumorales MDA-MB-231	64
19. Efecto del péptido TcPaSK en la viabilidad de células tumorales y no tumorales de mamífero	83
20. Efecto antiproliferativo del péptido TcPaSK en células MDA-MB-231	84
21. Actividad citotóxica del péptido TcPaSK frente a células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231	85
22. Ensayos de apoptosis/necrosis en células MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK	86
23. Interacción del péptido TcPaSK con la membrana de células MDA-MB-231	88
24. Internalización del péptido TcPaSK en células MDA-MB-231	90
25. Efecto del péptido TcPaSK en la angiogénesis	91
26. Western-Blot de la proteína HIF-1 α en células MDA-MB-231 tratadas con TcPaSK en condiciones de hipoxia	92

27. Efecto del péptido TcPaSK sobre la adhesión de células MDA-MB-231	94
28. Efecto sobre la capacidad de migración e invasión de células MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK	95
29. Expresión diferencial de factores de transcripción y genes marcadores de EMT en células MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK	98
30. Análisis de la expresión de isoformas de CD44 tras el tratamiento de células MDA-MB-231 con el péptido TcPaSK	99
31. Expresión de la familia miR-200 en células MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK	100
32. Análisis mediante microscopia confocal de la interacción del péptido TcPaSK con células MDA-MB-231	103
33. Análisis de correlación entre la expresión génica de la integrina $\beta 3$ y de marcadores mesenquimales en distintos tipos de carcinomas	106 107
34. Efecto del péptido TcPaSK en la viabilidad de células tumorales de pulmón	109
35. Interacción del péptido TcPaSK con células A549	110
36. Internalización de TcPaSK en células A549	111
37. Western-Blot de la proteína HIF-1 α en células A549 tratadas con TcPaSK en condiciones de hipoxia	112
38. Efecto sobre la capacidad de migración e invasión de células A549 tratadas con el péptido TcPaSK	114
39. Expresión diferencial de factores de transcripción y genes marcadores de EMT en células A549 tratadas con el péptido TcPaSK	115
40. Expresión de la familia miR-200 en células A549 tratadas con el péptido TcPaSK	116
41. Análisis de la expresión de las isoformas de CD44 estándar y CD44 completa tras el tratamiento de células A549 con el péptido TcPaSK	117
42. Análisis de la interacción del péptido TcPaSK con células A549 mediante microscopia confocal	118
43. Efecto del péptido TcPaSK sobre la adhesión y la migración de células A549 inducidas por TFG- $\beta 1$	119
44. Efecto del tratamiento de células MDA-MB-231 con el péptido TcPaSK en la expresión de genes que sensibilizan a las células frente a quimioterapia	121
45. Evaluación de la actividad citotóxica en células MDA-MB-231 de tratamientos con diferentes compuestos quimioterapéuticos en combinación con el péptido TcPaSK	122

46. Análisis mediante microscopia confocal de células MDA-MB-231 tratadas con doxorubicina en presencia del péptido TcPaSK	124
47. Análisis de la expresión de genes biomarcadores de resistencia a quimioterapia en células A549 tratadas con el péptido TcPaSK	125
48. Evaluación de la actividad citotóxica del quimioterapéutico doxorubicina en combinación con el péptido TcPaSK en células A549	125
49. Actividad citotóxica de diferentes conjugados poliméricos del péptido TcPaSK en células MDA-MB-231	127
50. Evaluación de la actividad citotóxica de Psar-NHS-TcPaSK en combinación con doxorubicina o PGA-HydDox en células MDA-MB-231	129

Abreviaturas

ACPs	(<i>Anticancer Peptides</i>) Péptidos anticancerígenos
ADNc	ADN complementario
AK2	(<i>Adenylate kinase 2</i>) Adenilato quinasa 2
AKT	(<i>Protein Kinase B</i>) Proteína quinasa B
AMPs	(<i>Antimicrobial Peptides</i>) Péptidos antimicrobianos
ARNm	ARN mensajero
ASNA	(<i>Arsenical Pump-Driving ATPase</i>) ATPasa conductora de la bomba de arsénico
BCSC	(<i>Breast Cancer Stem Cells</i>) Células madre cancerosas de mama
BRCA	(<i>Breast Cancer Susceptibility Protein</i>) Proteína de susceptibilidad al cáncer de mama
BSA	(<i>Bovine Serum Albumin</i>) Albúmina de suero bovino
CAFs	(<i>Cancer-associated fibroblasts</i>) Fibroblastos asociados al cáncer
CPPs	(<i>Cell Penetrating Peptides</i>) Péptidos de penetración celular
CSC	(<i>Cancer Stem Cells</i>) Células madre cancerosas
DENR	(<i>Density-regulated protein</i>) Factor de reinicio y liberación regulado por densidad
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
E-cad	E-cadherina
ECGM2	<i>Endothelial Cell Growth Medium 2</i>
ECM	(<i>Extracellular Matrix</i>) Matriz extracelular
EDTA	(<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>) Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	(<i>Epithermal Growth Factor Receptor</i>) Receptor de crecimiento epidérmico
EMA	(<i>European Medicine Agency</i>) Agencia europea de medicamentos
EMT	(<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>) Transición epitelio-mesénquima
EMT-TFs	(<i>EMT Transcription Factors</i>) Factores de transcripción EMT
ER	(<i>Estrogen Receptor</i>) Receptor de estrógenos
ERK	(<i>Serine/Threonine Protein Kinase</i>) Proteína quinasa serina/treonina
ESRP1	(<i>Epithelial Splicing Regulatory Protein 1</i>) Proteína epitelial reguladora de splicing 1
FAK	(<i>Focal Adhesion Kinase</i>) Quinasa de adhesión focal
FBS	(<i>Fetal Bovine Serum</i>) Serum fetal bovino
FDA	(<i>Food and Drug Administration</i>) Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos
FGF	(<i>Fibroblast Growth Factor</i>) Factor de crecimiento de fibroblastos
FGFR1	(<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>) Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato

FN	Fibronectina
FRPL1	(<i>Formyl Peptide Receptor</i>) Receptor 1 de péptido N-formilado
FSH	(<i>Follicle Stimulating Hormone</i>) Hormona foliculoestimulante
GATA	(<i>GATA Binding Protein</i>) Proteína de unión GATA
hBD-3	(<i>Human Beta Defensin 3</i>) Beta defensina humana 3
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HER2	(<i>Epidermal Growth Factor 2</i>) Factor de crecimiento epidérmico humano 2
HIF	(<i>Hypoxia-Inducible Factors</i>) Factores inducibles por hipoxia
HRE	(<i>Hypoxia-Response Element</i>) Elementos de respuesta a hipoxia
HRP	(<i>Horseradish peroxidase</i>) Peroxidasa de rábano
HUVEC	(<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i>) Células endoteliales de venas umbilicales humanas
IASLC	(<i>International Association for the Study of Lung Cancer</i>) Asociación internacional para el estudio del cáncer de pulmón
IARC	(<i>International Agency for Research on Cancer</i>) Agencia internacional para la investigación sobre el cáncer
ICB	(<i>Immune Checkpoint Blockers</i>) Inhibidores de puntos de control inmunitarios
IBC	(<i>Inflammatory Breast Cancer</i>) Cáncer de mama inflamatorio
IFN	Interferón
IL-8	Interleucina 8
ILK	(<i>Integrin-Linked Kinase</i>) Quinasa ligada a integrina
IP	Yoduro de propidio
JNK	(<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>) Quinasa c-Jun N-terminal
KRAS	(<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene</i>) Oncogén viral del sarcoma de rata de Kirsten
LAP	(<i>Latency-Associated Peptide</i>) Péptido asociado a latencia
LARP1	(<i>La Ribonucleoprotein 1, Translational Regulator</i>) Regulador traslacional ribonucleoproteína 1 La
LDH	Lactato deshidrogenasa
LH	(<i>Luteinizing Hormone</i>) Hormona luteinizante
LHRH	(<i>Luteinizing Hormone-Releasing Hormone</i>) Hormona liberadora de la hormona luteinizante
LPS	Lipopolisacárido
LTA	(<i>Lipoteichoic Acid</i>) Ácido lipoteicoico
MAPK	(<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>) Proteína quinasa activada por mitógenos
MET	(<i>Mesenchymal-Epithelial Transition</i>) Transición mesénquima-epitelio
miARN	MicroARN
MMPs	(<i>Matrix Metalloproteinases</i>) Metaloproteinasas de matriz

mTORC1	(<i>Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1</i>) Diana del complejo de rapamicina 1 de mamífero
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
MYC	(<i>MYC Proto-Oncogene, bHLH Transcription Factor</i>) Protooncogén MYC factor de transcripción bHLH
N-cad	N-cadherina
NGR	Tripeptido Asn-Gly-Arg
NHS	N-hidroxisuccinimida
NSCLC	(<i>Non Small Cell Lung Cancer</i>) Cáncer de pulmón de células no microcítico
PARP	Poli ADP-ribosa polimerasa
PBS	(<i>Phosphate Buffered Saline</i>) Tampón fosfato salino
PCNA	(<i>Nuclear Cell Proliferation Antigen</i>) Antígeno de proliferación celular nuclear
PD	(S)-2-piridiltio cisteamina
PDGF	(<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>) Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEG	Polietilenglicol
PGA	(<i>Polyglutamic Acid</i>) Ácido poliglutámico
PI3K	(<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>) Fosfatidilinositol 3-quinasa
PMS	Metosulfato de feniazina
POLD1	Polimerasa delta 1
PR	(<i>Progesterone Receptor</i>) Receptor de progesterona
Pri-miARN	miARN primario
PRRT	(<i>Peptide Receptor Radionuclide Therapy</i>) Terapia de radionúclidos con receptor de péptidos
PS	(<i>Phosphatidilserine</i>) Fosfatidilserina
Psar	Polisarcosina
PTEN	(<i>Phosphatase And Tensin Homolog</i>) Homólogo de fosfatasa y tensina
PYK-2	(<i>Proline-Rich Tyrosine Kinase</i>) Tirosina quinasa rica en prolina
RGD	Tripeptido Arg-Gly-Asp
ROS	(<i>Reactive Oxygen Species</i>) Especies reactivas de oxígeno
RTK	(<i>Tyrosin-Kinase Receptors</i>) Receptores tirosina quinasa
RT-qPCR	(<i>Reverse Transcriptase Quantitative PCR</i>) PCR cuantitativa en tiempo real
SCLC	(<i>Small Cell Lung Cancer</i>) Cáncer de pulmón de células microcíticas
SDS	Docecilsulfato sódico
SEM	(<i>Scanning Electron Microscopy</i>) Microscopía electrónica de barrido
siARN	(<i>Small Interference RNA</i>) ARN pequeño de interferencia
Slug	(<i>Snail Family Transcriptional Repressor 2</i>) Represor transcripcional 2 de la familia Snail

Snail	(<i>Snail Family Transcriptional Repressor 1</i>) Represor transcripcional 1 de la familia Snail
Src	(<i>Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase</i>) Protooncogén Tirosina-Proteína Quinasa
SWATH	(<i>Sequential Window Acquisition of All Theoretical Fragment Ion Mass Spectra</i>)
TAMs	(<i>Tumor-Associated Macrophages</i>) Macrófagos asociados a tumor
TBS	(<i>Tris Buffered Saline</i>) Tampón Tris salino
TEM	(<i>Transmission Electron Microscopy</i>) Microscopía electrónica de transmisión
TGF- β	(<i>Transforming Growth Factor Beta</i>) Factor de crecimiento transformante beta
TLR	(<i>Toll-Like Receptor</i>) Receptor de tipo Toll
TME	(<i>Tumoral Microenvironment</i>) Microambiente tumoral
TM9SF4	(<i>Transmembrane 9 superfamily member 4</i>) Miembro 4 de la superfamilia Transmembrana 9
TNBC	(<i>Triple Negative Breast Cancer</i>) Cáncer de mama triple negativo
TNF α	(<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>) Factor de necrosis tumoral alfa
TP53	(<i>Tumoral Protein 53</i>) Proteína tumoral 53
TTP	(<i>Targeted Therapeutic Peptides</i>) Péptidos terapéuticos dirigidos
TRXR1	Tioredoxina reductasa 1
Twist	(<i>Twist Family BHLH Transcription Factor</i>) Factor de transcripción de la familia BHLH
U2AF2	(<i>U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 2</i>) Factor auxiliar 2 de ARN nuclear pequeño U2
UROD	(<i>Uroporphyrinogen Decarboxylase</i>) Uroporfirinógeno descarboxilasa
VEGF	(<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>) Factor de crecimiento endotelial vascular
VIM	Vimentina
ZEB	(<i>Zinc Finger E-Box-Binding Homebox</i>) Proteína dedo de zinc de unión a E-Box

Resumen

Los péptidos antimicrobianos (AMPs, *antimicrobial peptides*) son parte de la inmunidad innata de muchos organismos y se ha estudiado su uso fundamentalmente como alternativa a los antibióticos para controlar infecciones causadas por microorganismos patógenos. Algunos AMPs catiónicos, además de actividad antibacteriana, poseen actividad antivírica, antifúngica y potencial anticancerígeno, mostrando efectos sinérgicos con otras estrategias terapéuticas dirigidas a contrarrestar la aparición de resistencias en células tumorales.

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han permitido demostrar que el péptido TcPaSK, derivado del insecto coleóptero *Tribolium castaneum*, posee actividad antimicrobiana frente al patógeno humano *Staphylococcus aureus* y actividad antiproliferativa en células MDA-MB-231 de cáncer de mama triple negativo (TNBC). El tratamiento de dichas células mamarias tumorales con una dosis subcitotóxica del péptido TcPaSK bloqueó la progresión del ciclo celular en fase G1-S y, mediante análisis proteómico, se confirmó la alteración de los niveles de proteínas implicadas en el crecimiento celular y la progresión tumoral, así como también de proteínas que sensibilizan a las células cancerosas a la radioterapia y/o fármacos quimioterapéuticos convencionales.

En la presente tesis, se han caracterizado los efectos del péptido TcPaSK sobre la viabilidad y la función celular en dos líneas celulares metastásicas, MDA-MB-231 (de cáncer de mama TNBC) y A549 (de cáncer de pulmón no microcítico NSCLC). El péptido TcPaSK presenta capacidad antiproliferativa en células tumorales mamarias de ratón y humanas, así como en células no tumorales de epitelio mamario de ratón. A concentraciones subcitotóxicas, el péptido TcPaSK altera el metabolismo celular y posee efecto citolítico en células MDA-MB-231 y A549. En ambas líneas celulares demostramos que el péptido TcPaSK también actúa modificando el microentorno tumoral, puesto que tiene propiedades antiangiogénicas y disminuye la cantidad relativa del factor de respuesta a hipoxia HIF-1 α . La alteración de estos procesos se puede explicar por el efecto inhibitorio que ejerce el péptido en el programa de la transición epitelio-mesénquima (EMT) en células MDA-MB-231 y A549, reprimiendo la expresión de factores de transcripción reguladores de EMT y marcadores mesenquimales, pero sin producirse la reversión a un fenotipo epitelial. La represión de la expresión del gen que codifica para la glicoproteína de membrana CD44 y algunas de sus isoformas generadas por *splicing* alternativo, junto con la inducción de la expresión de los miARNs reguladores de la EMT de la familia miR-200, confirman el efecto del péptido TcPaSK sobre la EMT.

El primer contacto de los AMPs catiónicos con las células cancerosas es la interacción electrostática a través de las cargas negativas de sus membranas plasmáticas. Los resultados obtenidos muestran que el péptido TcPaSK se une a la membrana de las células tumorales MDA-

MB-231 y A549, interacciona con integrinas $\alpha\beta3$ y posteriormente se internaliza vía endocitosis mediante vesículas cuyo destino son los lisosomas. Se propone que la interacción del péptido TcPaSK con la integrina $\alpha\beta3$ se produciría a través un motivo RGD-*like* ($_{17}\text{RGG}_{19}$) contenido en su secuencia aminoacídica.

La resistencia adquirida a los agentes quimioterapéuticos por parte de las células tumorales pone de manifiesto la necesidad de disponer de nuevos fármacos que minimicen el desarrollo de resistencia y a su vez aumenten la eficacia de los tratamientos. El péptido TcPaSK sensibiliza a las células MDA-MB-231 frente a compuestos quimioterapéuticos con diferente modo de acción (cisplatino, doxorubicina y un conjugado polimérico de doxorubicina, PGA-HydDox) y a las células A549 frente a doxorubicina. Esto evidencia el gran interés terapéutico del péptido TcPaSK en terapias de combinación contra el cáncer.

La conjugación de AMPs con polímeros mejora su utilidad terapéutica de estos, ya que aumenta su solubilidad y los protege de la degradación proteolítica. En colaboración con la Dra. Vicent, jefa del Laboratorio de Polímeros Terapéuticos del CIPF, se sintetizaron varios conjugados del péptido TcPaSK, utilizando como portadores poliméricos polisarcosina (Psar) y ácido poliglutámico (PGA). El conjugado Psar-NHS-TcPaSK muestra una actividad antiproliferativa superior a la del péptido TcPaSK en células MDA-MB-231 y disminuye significativamente la viabilidad celular en combinación con el polímero de doxorubicina PGA-HydDox (polímero sintetizado en el laboratorio de la Dra. Vicent).

En conjunto, los resultados de esta tesis demuestran el potencial del péptido TcPaSK para el tratamiento eficaz del cáncer en terapias de combinación con agentes quimioterapéuticos y para su uso en formulaciones de conjugados con biopolímeros. La traslación de estas investigaciones *in vitro* al ámbito clínico requerirá la validación en modelos animales del alcance terapéutico del péptido TcPaSK en el tratamiento del cáncer metastásico.

Introducción

1. Cáncer

El cáncer es una enfermedad genética, producida por mutaciones hereditarias o esporádicas, en la que a partir de la transformación de una sola célula se origina un crecimiento descontrolado en cualquier tejido del organismo (*National Cancer Institute*, NIH). Todas las células derivadas por división de esta primera célula ancestral y su progenie también muestran una proliferación desregulada. El término "tumor" se utiliza para describir la proliferación anormal de células y se distingue entre tumor benigno o maligno. Las características que diferencian las lesiones malignas de las benignas están bien establecidas y comprenden una rápida tasa de crecimiento, aumento del recambio celular, crecimiento invasivo, metástasis e invasión de los canales linfáticos y/o vasculares. Los tumores benignos permanecen confinados en su ubicación original, sin invasión de los tejidos sanos próximos al tumor, ni propagación ni diseminación a distancia (Alzahrani *et al.*, 2021). Sin embargo, los tumores malignos a menudo invaden el tejido circundante e incluso algunas células tumorales pueden diseminarse llegando a tejidos u órganos distantes causando así metástasis. Solo los tumores malignos se denominan cánceres, y la capacidad invasiva de estos frecuentemente conlleva un peor pronóstico para el paciente que sufre cáncer.

El modelo clásico de desarrollo de cáncer contempla tres etapas bien definidas a nivel celular: iniciación, promoción y progresión. La iniciación se produce cuando factores genéticos, metabólicos o cancerígenos actúan dañando la molécula de ADN e induciendo mutaciones, a través de un proceso denominado carcinogénesis (Alzahrani *et al.*, 2021). Los agentes externos que aumentan la probabilidad de mutación pueden ser carcinógenos físicos, como la radiación ionizante o la ultravioleta, carcinógenos químicos, como los componentes del humo del tabaco, el alcohol o la contaminación, y carcinógenos biológicos como las infecciones por ciertos virus, bacterias o parásitos (Wild *et al.*, 2020). La segunda etapa del desarrollo del cáncer es la promoción. Esta es una etapa prolongada, que comienza con la proliferación de las células cuyo material genético se ha alterado en el paso previo de iniciación, perdiendo el control del ciclo celular. La progresión es la tercera y última etapa y se distingue por la metástasis de las células tumorales que se desarrollan durante el paso de proliferación (Alzahrani *et al.*, 2021).

Una característica central de la visión molecular actual del cáncer es que se produce como resultado de la acumulación secuencial a lo largo del tiempo de muchos cambios genéticos, cada uno de los cuales contribuye con algunas de las características que finalmente conducen a la malignización. Esta hipótesis fue inicialmente propuesta por Nordling (1953) y posteriormente por Knudson (1971).

En este proceso de múltiples pasos hay dos categorías de genes que desempeñan un importante papel en el desencadenamiento del cáncer: los protooncogenes y los genes supresores de tumores. En un tejido sano, los productos de estos genes intervienen en la regulación coordinada de los mecanismos básicos encargados de mantener en equilibrio el número de células:

el control del ciclo celular y la muerte celular programada o apoptosis. En las células cancerosas estos mecanismos de regulación están alterados, debido a que la acumulación de mutaciones en el material genético conlleva la activación de oncogenes y/o la desactivación de genes supresores de tumores (Evan y Vousden, 2001). Las mutaciones en estas dos categorías de genes son responsables de la pérdida de control del ciclo celular que se produce en la mayoría de cánceres humanos. Además, mutaciones en genes implicados en los sistemas de reparación del ADN (reversión directa del daño, reparación por escisión o reparación posterior a la replicación), pueden conducir a una reparación ineficiente, incrementando la frecuencia de mutaciones en la célula que promueven la progresión y la evolución del cáncer (Alhmoud *et al.*, 2020).

Otros factores que contribuyen al desarrollo de cánceres esporádicos están relacionados con los mecanismos celulares que limitan el número de veces que una célula puede dividirse. Uno de ellos es el acortamiento progresivo del ADN telomérico a medida que las células se dividen a lo largo de la vida, para finalmente entrar en proceso de senescencia. Las células sanas maduras prácticamente carecen de telomerasa, mientras que las células tumorales son capaces de adquirir inmortalidad activando la telomerasa, la cual es capaz de restaurar y mantener la longitud del ADN telomérico (Wild *et al.*, 2020).

Recientemente, se ha identificado el papel de las alteraciones epigenéticas en el desarrollo de carcinomas esporádicos. Estas causan cambios en la expresión génica sin afectar a la secuencia del ADN, y están asociados con patrones de metilación e hidroximetilación del ADN y modificación de histonas que a su vez sirven para modular la expresión de protooncogenes y genes supresores de tumores. Los eventos epigenéticos son estocásticos y heredables, pueden conferir propensión a desarrollar crecimientos aberrantes y están influidos por agentes oncogénicos ambientales (Sarkar *et al.*, 2013).

1.1 Características de las células cancerosas

Las células tumorales poseen tanta heterogeneidad genotípica como tipos de tumores existen. La acumulación de mutaciones y la inestabilidad genómica promueve una serie de alteraciones comunes a nivel celular, las cuales facilitan la proliferación, la supervivencia y la diseminación de estas, y van apareciendo a medida que las células sanas van progresando hacia células tumorales. Dichas alteraciones proporcionan a las células capacidades para evadir las señales inhibitoras del crecimiento, mantener la autoseñalización de proliferación y replicarse ilimitadamente, inducir angiogénesis, evadir la apoptosis y activar la invasión y la metástasis (Hanahan, 2022) (Figura 1). Otras características importantes que poseen las células neoplásicas son la reprogramación epigenética y del metabolismo energético, el desbloqueo de la plasticidad fenotípica y la evasión de la detección y destrucción por parte del sistema inmunitario (Hanahan, 2022) (Figura 1).

La metástasis es la diseminación de células cancerosas desde el lugar donde se formó el tumor inicial hasta otra parte del cuerpo (*National Cancer Institute*, NIH). Es el proceso responsable de alrededor del 90% de las muertes por cáncer, y se desarrolla en una serie de etapas secuenciales interrelacionadas. Para poder completar el proceso de metástasis, las células tumorales deben desprenderse del tumor primario, intravasarse en el sistema circulatorio y el sistema linfático, evadir el ataque inmunológico, extravasarse en lechos capilares distantes y proliferar e invadir los nuevos órganos. Las células con capacidad metastásica establecen un microambiente que facilita la angiogénesis y la proliferación celular, lo que resulta en la formación de tumores secundarios en sitios distantes (Seyfried y Huysentruyt, 2013). Uno de los procesos mediante el cual las células tumorales adquieren capacidades metastásicas es la transición epitelio-mesénquima (EMT; *Epithelial-Mesenchymal Transition*) en la cual profundizaremos más adelante. El avance de carcinogénesis y metástasis también puede derivarse de procesos epigenéticos reversibles como la metilación del ADN, las modificaciones de histonas y cambios en la expresión de microARN (miARN). Los miARN son moléculas pequeñas de ARN no codificante que actúan regulando la expresión del ARNm, ya sea activando o bloqueando la traducción o promoviendo la degradación de estos (Grose y Senga, 2021; Santos Ramos *et al.*, 2017).



Figura 1. Características distintivas de las células tumorales. Adaptada de Hanahan (2022).

1.2 Microambiente tumoral

Actualmente la biología de un tumor no puede entenderse únicamente como un conjunto de células cancerosas individuales, sino más bien como un órgano formado por células heterogéneas, tumorales y no tumorales, implicadas en la regulación de la señalización celular y que contribuyen a la formación de un microambiente tumoral (TME, *tumoral microenvironment*) (Xiao y Yu, 2021). El entorno del TME engloba moléculas de señalización, la matriz extracelular (ECM, *extracellular matrix*) y distintos tipos celulares como células endoteliales, pericitos, macrófagos asociados a tumor (TAMs, *tumor-associated macrophages*), células inmunitarias inflamatorias, fibroblastos asociados al tumor (CAFs; *cancer-associated fibroblasts*), células cancerígenas que inician el tumor y células madre cancerosas (CSC, *cancer stem cells*) (Wang *et al.*, 2018). Los TAMs desempeñan un papel importante en la regulación de la tumorigénesis al facilitar la migración celular, la invasión y la metástasis. Las células tumorales conducen al reclutamiento de neutrófilos en los sitios de tumorigénesis mediante la secreción de quimiocinas e interleucina (IL-8), lo que suele ir acompañado de un mal pronóstico. Los CAFs pueden ser fibroblastos residentes y también pueden provenir de las células del músculo liso, de los pericitos o de las células mesenquimales derivadas de la médula ósea, lo que da lugar a una población celular heterogénea. Los factores de crecimiento, secretados por las células tumorales y las células inmunitarias infiltrantes, gobiernan en gran medida el reclutamiento de fibroblastos del estroma. El factor de crecimiento transformante (TGF- β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) son mediadores clave de la activación de los fibroblastos. Además, los CAFs alteran la estructura de la ECM y la reprogramación metabólica e inmunológica de TME y secretan factores de crecimiento y algunas quimiocinas que, junto con varios miARN, en un contexto de desequilibrio entre los factores activadores e inhibidores de la angiogénesis estimulan las células endoteliales y sus pericitos asociados para desarrollar angiogénesis tumoral (Brassart-Pasco *et al.*, 2020). La Figura 2 ilustra el microambiente tumoral y procesos celulares interrelacionados que tienen lugar en el mismo.

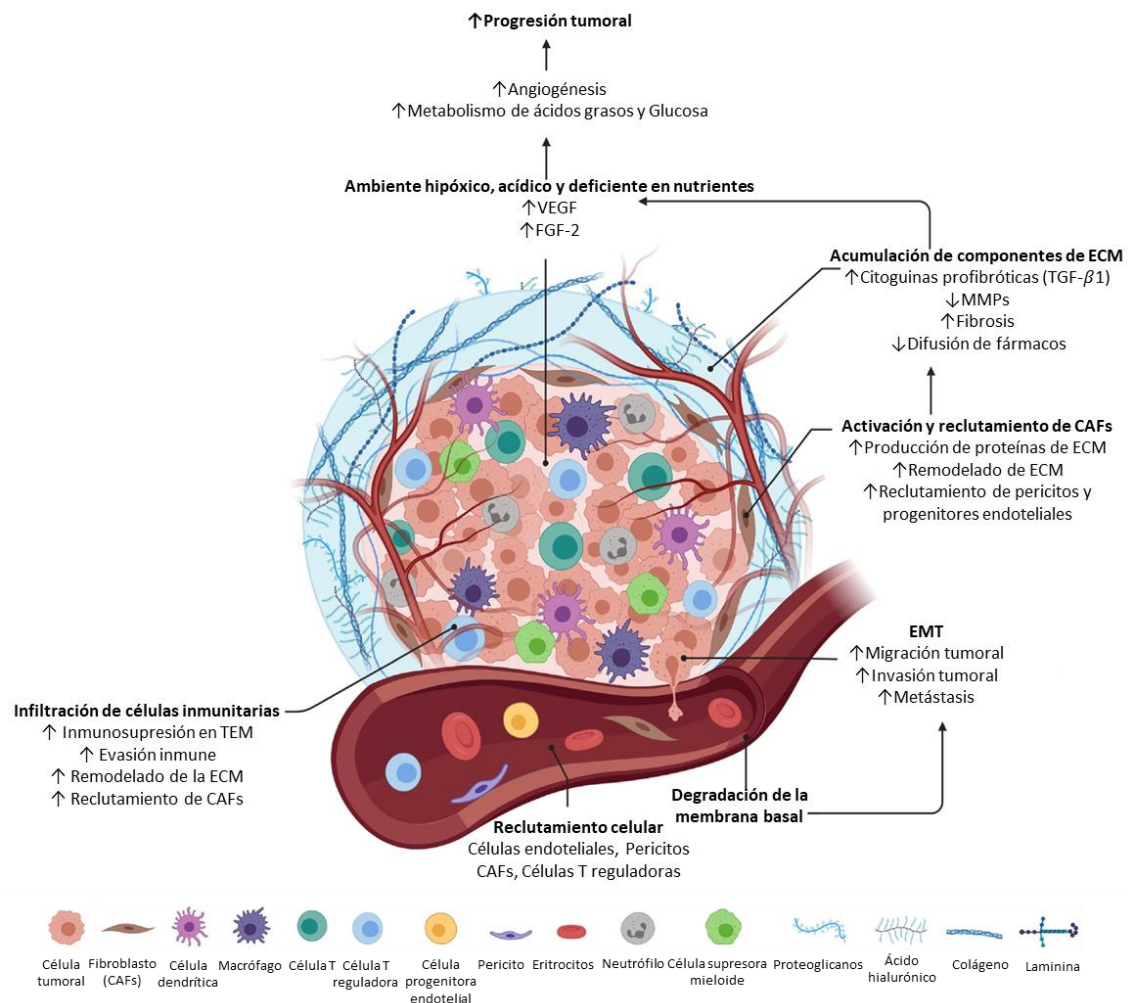


Figura 2. Representación esquemática del TME. Se muestran componentes de la matriz extracelular y células estromales e inmunes implicadas en la remodelación metabólica, celular y tisular. Adaptada de Mendes *et al.* (2021).

1.2.1 Hipoxia y angiogénesis

El endotelio vascular se encarga de numerosas funciones como el suministro de agua y nutrientes, el mantenimiento de la homeostasis metabólica, el tráfico de células inmunitarias y la formación de nuevos vasos sanguíneos (Sobierajska *et al.*, 2020). En el TME se induce la angiogénesis en respuesta a una creciente necesidad de oxígeno y nutrientes, sin los cuales los tumores no podrían prosperar cuando se produce una proliferación celular descontrolada. Dicha neovascularización del tumor requiere de la cooperación de múltiples tipos de células del TME, cuya orquestación a menudo está regulada por hipoxia (Quail y Joyce, 2013). Los tumores sólidos normalmente se ven afectados por la hipoxia cuando el tumor supera un diámetro de aproximadamente 1 mm (Emami *et al.*, 2021).

Las respuestas inducidas por hipoxia en los tumores incluyen: expresión génica alterada, supresión de la apoptosis o promoción de la autofagia, estimulación de la EMT y metástasis, aumento de la angiogénesis y cambios en el fenotipo anabólico del metabolismo celular. Además,

la hipoxia también está implicada en la inestabilidad genómica debido al aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y alteraciones en las vías de reparación del daño del ADN (Emami *et al.*, 2021).

A nivel transcripcional, se logra mantener la homeostasis de oxígeno en los tejidos mediante la acción de factores inducibles por hipoxia (HIF; *hypoxia-inducible factors*), que median la reprogramación del transcriptoma de cada célula en respuesta a la disminución de la disponibilidad de O₂. La transcripción inducida por HIF promueve la expresión de más de 150 genes que codifican, entre otros, para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), eritropoyetina, transferrina y receptores de transferrina, enzimas necesarias para la glucólisis, factores antiapoptóticos, múltiples factores de crecimiento, como el TGF- β , y otras proteínas involucradas en la homeostasis de oxígeno en células sanas. Aunque estos factores son parte de la respuesta adaptativa de las células que les permite compensar la reducción de oxígeno y de nutrientes, las células cancerosas hipóxicas sobreexpresan dichos factores para aumentar la supervivencia, la angiogénesis aberrante, el crecimiento celular extremo y la metástasis (Emami *et al.*, 2021).

Las HIF son proteínas heterodiméricas que consisten en una subunidad sensible a oxígeno (HIF-1 α , HIF-2 α o HIF-3 α) y una subunidad de expresión constitutiva HIF-1 β . En condiciones de normoxia, las subunidades HIF- α hidroxiladas se ubiquitinan y son dirigidas al proteasoma para su degradación mientras que, en condiciones de hipoxia, dichas subunidades no hidroxiladas se acumulan y dimerizan con la subunidad HIF-1 β , se unen a HRE (*hypoxia-response element*) en genes diana y activan la transcripción de genes relacionados con angiogénesis y factores de supervivencia celular (Wicks y Semenza, 2022) (Figura 3). Aunque en los tejidos tumorales la densidad de capilares sanguíneos suele ser alta, encontramos con frecuencia hipoxia aguda y crónica, mediadas principalmente por HIF-1 α y HIF-2 α respectivamente, que conducen a una necrosis tumoral central rodeada de áreas hipóxicas. La presión intersticial en los tumores, junto con una formación anómala de los capilares provocan un suministro sanguíneo deficiente. La hipoxia y la angiogénesis en los tumores son características relacionadas con la malignidad (Sebestyén *et al.*, 2021). Dado que las proteínas HIF son los principales reguladores de la homeostasis del oxígeno en hipoxia, las estrategias dirigidas a HIF constituyen una atractiva alternativa para el tratamiento de tumores (Emami *et al.*, 2021; Sebestyén *et al.*, 2021).

Los factores proangiogénicos y sus receptores son diana de los factores de transcripción HIF y están implicados en el mecanismo molecular por el cual la hipoxia regula la angiogénesis (Emami *et al.*, 2021). En las células endoteliales, la eliminación del gen *HIF-1 α* reduce la neovascularización y el crecimiento tumoral interrumpiendo la retroalimentación autocrina mediada por VEGF (Tang *et al.*, 2004). Los nuevos vasos sanguíneos que se desarrollan en condiciones hipóxicas muestran malformaciones, adoptando formas inusualmente alargadas y

tortuosas, a veces con extremos ciegos que conducen a una interrupción en el flujo sanguíneo. Debido al aumento de permeabilidad en las paredes de los vasos sanguíneos causada por las malformaciones, la hipoxia favorece la extravasación de las células tumorales en un entorno hostil y aumenta la invasividad y la diseminación metastásica (Emami *et al.*, 2021).

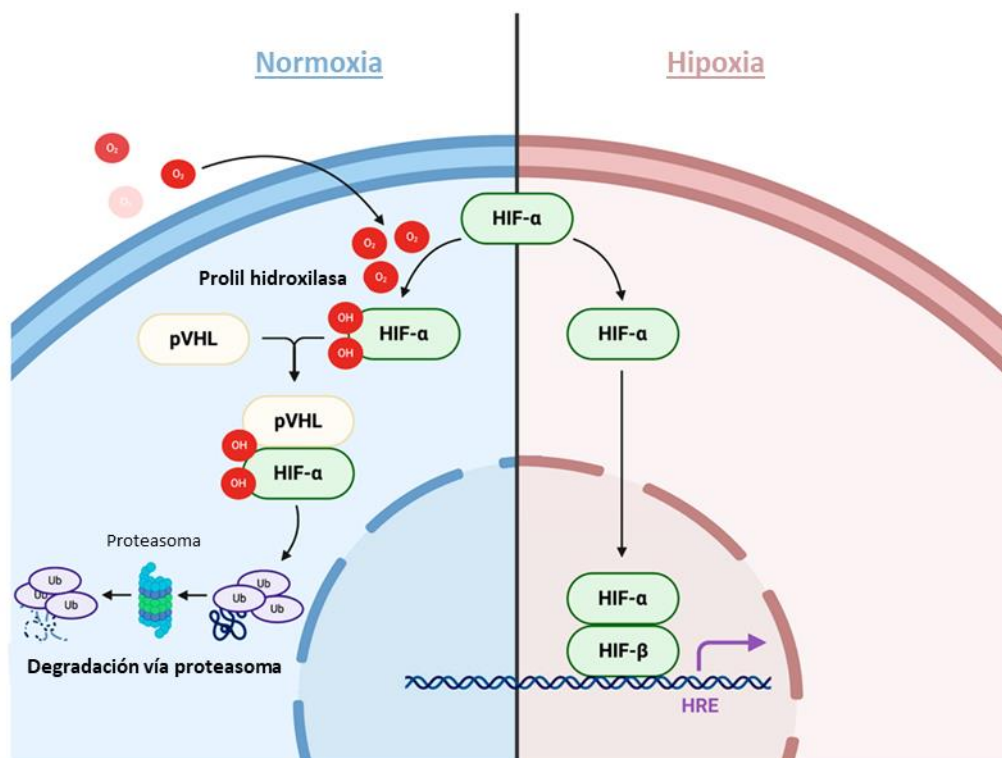


Figura 3. Vía de señalización celular del factor inducible por hipoxia HIF-1α, en presencia o ausencia de oxígeno. Adaptada de Vito *et al.* (2020).

1.2.2 Matriz extracelular (ECM)

La ECM es una red tridimensional dinámica de macromoléculas que, además de proporcionar soporte estructural a células y tejidos, proporciona señales bioquímicas y biomecánicas que influyen en la comunicación celular y dirigen el crecimiento, la supervivencia, la migración y la diferenciación celular. Está compuesta por proteínas y glucoproteínas, como colágenos, fibronectina, lamininas, tenascinas, proteoglicanos, y glicosaminoglicanos, como el hialuronano y el heparán sulfato que se unen a receptores celulares, como CD44 e integrinas, responsables de la adhesión celular (Arneth, 2019; Karamanos *et al.*, 2021) (Figura 4). Las diferentes matriquinas derivadas de macromoléculas de ECM, colágenos, glicoproteínas o proteoglicanos pueden ejercer propiedades pro o antitumorales en varios modelos de cáncer. Se ha demostrado que las matriquinas derivadas del colágeno IV y del colágeno XIX actúan a través de la unión a las integrinas $\alpha\beta1$, $\alpha5\beta1$ o $\alpha v\beta3$. Dicha unión provoca una inhibición de la vía FAK/PI3K/Akt/mTORC1, una de las principales vías intracelulares involucradas en las

alteraciones metabólicas de TME, y conducen a una disminución de las propiedades proliferativas e invasivas de las células tumorales en algunos tipos de cáncer (Brassart-Pasco *et al.*, 2020).

La ECM limita el avance del cáncer en etapas tempranas, pero promueve la progresión de la enfermedad hacia la malignidad en etapas más avanzadas. En el cáncer de mama se ha demostrado que la composición de la ECM en el entorno del TME es un indicador del pronóstico clínico. Los tumores con alta expresión de inhibidores de proteasas en su ECM se asocian con un buen pronóstico, mientras que los tumores con alta expresión de integrinas y metaloproteasas se correlacionan con un mal pronóstico y un mayor riesgo de recurrencia (Quail y Joyce, 2014).

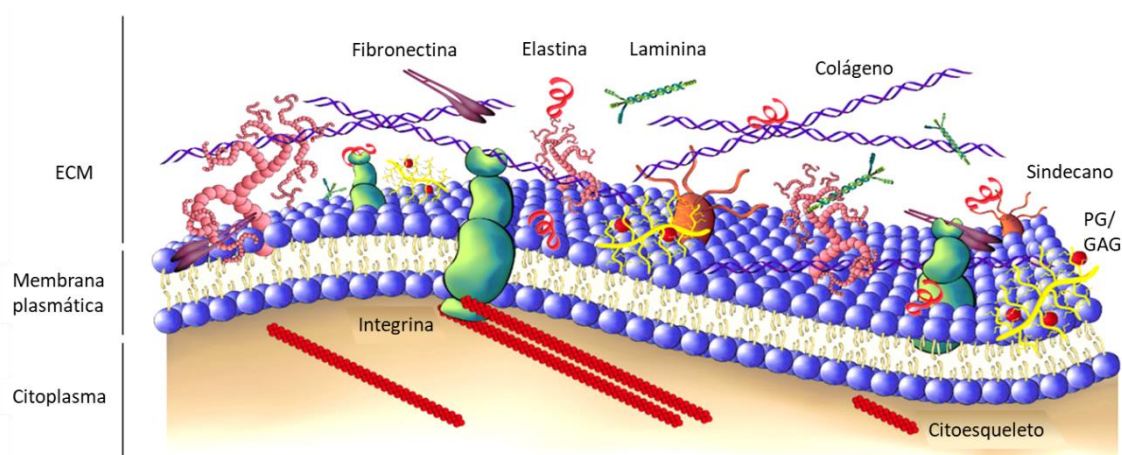


Figura 4. Composición de la matriz extracelular. Adaptada de Morales *et al.* (2021).

- **Integrinas**

Las integrinas son proteínas transmembrana heterodiméricas con subunidades, α y β , que actúan como moléculas de adhesión a componentes específicos de la ECM y transmiten señalización entre el entorno extracelular y vías de señalización intracelulares implicadas en procesos reguladores de crecimiento, angiogénesis, migración, invasión y adaptación a nuevos entornos durante la metástasis (Sani *et al.*, 2021). Las subunidades α y β están constituidas por un gran dominio extracelular, una hélice transmembrana y un dominio citoplasmático corto (Figura 5), y se combinan formando al menos veinticuatro integrinas distintas. El dominio extracelular proporciona especificidad de ligando con varias macromoléculas de la ECM o con superficies celulares adyacentes. Las integrinas se suelen agrupar en cuatro categorías, en función de las secuencias diana que reconocen: los motivos de unión a RGD (Arg-Gly-Asp); los receptores de laminina; los receptores específicos de leucocitos; y receptores de colágeno (Kechagia *et al.*, 2019). El motivo peptídico RGD se encuentra en algunas proteínas de la ECM como la fibronectina, la vitronectina, la osteopontina y la trombospodina entre otras y representa un sitio de unión selectivo para integrinas a la ECM. De las veinticuatro integrinas conocidas solo ocho, $\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha v \beta 6$, $\alpha v \beta 8$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 8 \beta 1$ y $\alpha IIb \beta 3$ se unen a ligandos con motivos RGD. De

ellas, las integrinas más estudiadas en oncología en las últimas dos décadas son $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ y $\alpha5\beta1$ (Nieberler *et al.*, 2017; Sani *et al.*, 2021). Las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha5\beta1$ se encuentran sobreexpresadas en los vasos sanguíneos del TME y en las células tumorales y tienen capacidad de internalizarse en las células a través de endosomas. Por ello, se están desarrollando estrategias basadas en estas integrinas para conseguir un transporte más específico de los fármacos antitumorales. Los ligandos RGD acoplados a fármacos citotóxicos pueden servir como portadores para aumentar la biodisponibilidad y la eficacia de dichos fármacos (Sani *et al.*, 2021). Varios estudios han implicado a las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha6\beta4$ como reguladores positivos de la tumorigénesis, ya que ambas son capaces de cooperar con receptores tirosina quinasa (RTKs) oncogénicos (Cheng *et al.*, 2021). Por ejemplo, la integrina $\alpha6\beta4$ interacciona con el receptor de EGF y c-Met RTK para amplificar la señalización oncogénica en varios carcinomas. De manera similar, la integrina $\alpha\beta3$ se une al receptor PDGF, activando la señalización mediada por este receptor en los glioblastomas que sobreexpresan PDGF (Cooper y Giancotti, 2019).

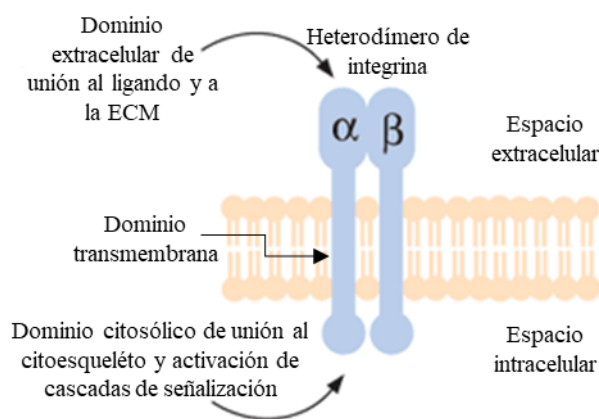


Figura 5. Estructura básica de un heterodímero de integrina. Adaptada de Ameneheslami (2006). <https://www.scq.ubc.ca/the-role-of-integrins-in-wound-healing/>

Tras la unión a sus ligandos, las integrinas se concentran en la superficie celular en las adhesiones focales que actúan, no solo como conectores estructurales entre la EMC y el citoesqueleto de actina, sino también como sitios de transducción de señales desde la EMC a las vías de señalización intracelular, como la quinasa de adhesión focal (FAK), quinasa Src, quinasa ligada a integrina (ILK), tirosina quinasa rica en prolina (PYK-2), proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), incluida la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), c-Jun N-terminal quinasa (JNK) y p38, así como fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y proteína quinasa B (AKT) (Naci *et al.*, 2015) (Figura 6).

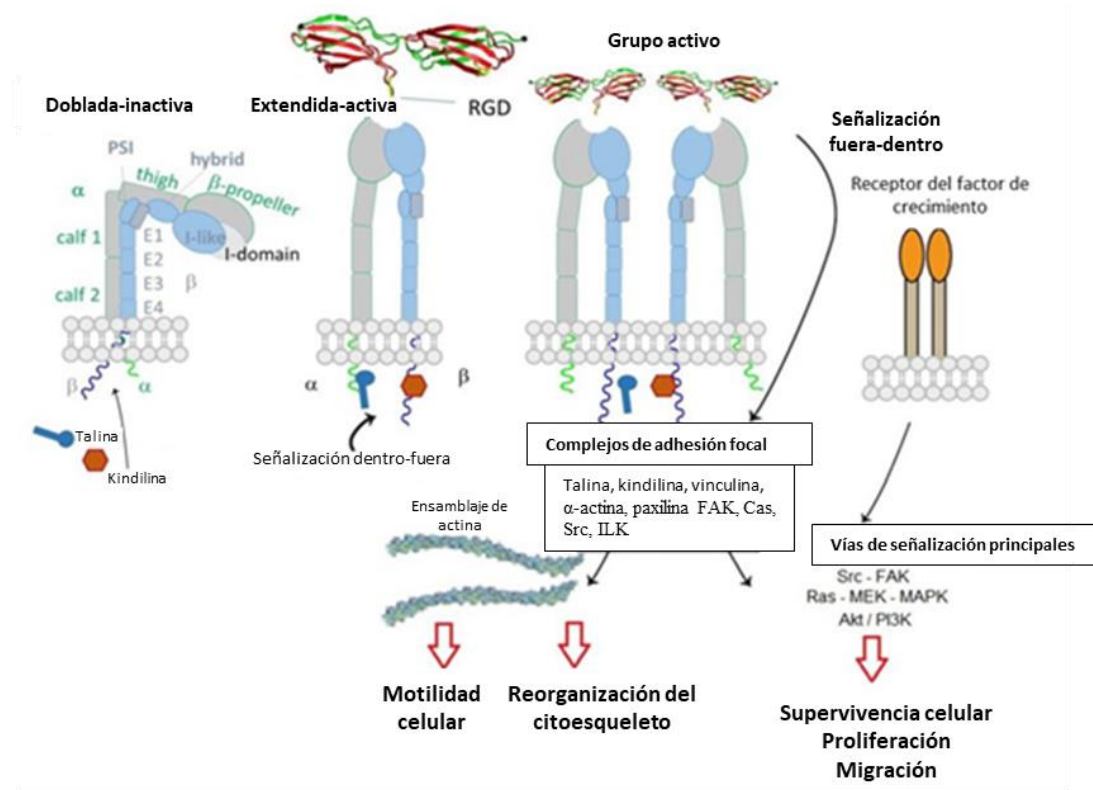


Figura 6. Señalización intracelular mediada por integrinas con motivo de unión RGD. Adaptada de Zhao *et al.* (2020).

Otra vía de señalización específica de integrinas es la activación del TGF- β . La familia TGF- β incluye las isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, las cuales poseen actividades de señalización similares, pero expresión variable en diferentes células y tejidos. De las tres, TGF- β 1 es la isoforma más abundante y desregulada en cáncer (Brown y Marshall, 2019). TGF- β 1 se traduce inicialmente como un propéptido que comprende el factor de crecimiento y el péptido asociado a latencia (LAP). Dicho péptido LAP posee un motivo de unión RGD, el cual es reconocido por integrinas α v, en concreto α v β 1, α v β 3, α v β 5, α v β 6 y α v β 8. La unión de LAP con las integrinas libera el homodímero de TGF- β 1, lo que resulta en la activación de este y su unión al receptor de TGF β RII, iniciando la señalización vía TGF- β -Smad que promueve la transición epitelio-mesénquima EMT (Mamuya y Duncan, 2012; Brown y Marshall, 2019). La señalización mediante TGF- β tiene dos vías posibles, la canónica mediada por proteínas Smad y la no canónica que incluye las rutas PI3K/AKT, y Ras/ERK, entre otras (Figura 7). Tanto la vía canónica como la no canónica pueden inducir la expresión de genes implicados en EMT (Mamuya y Duncan, 2012; Brown y Marshall, 2019).

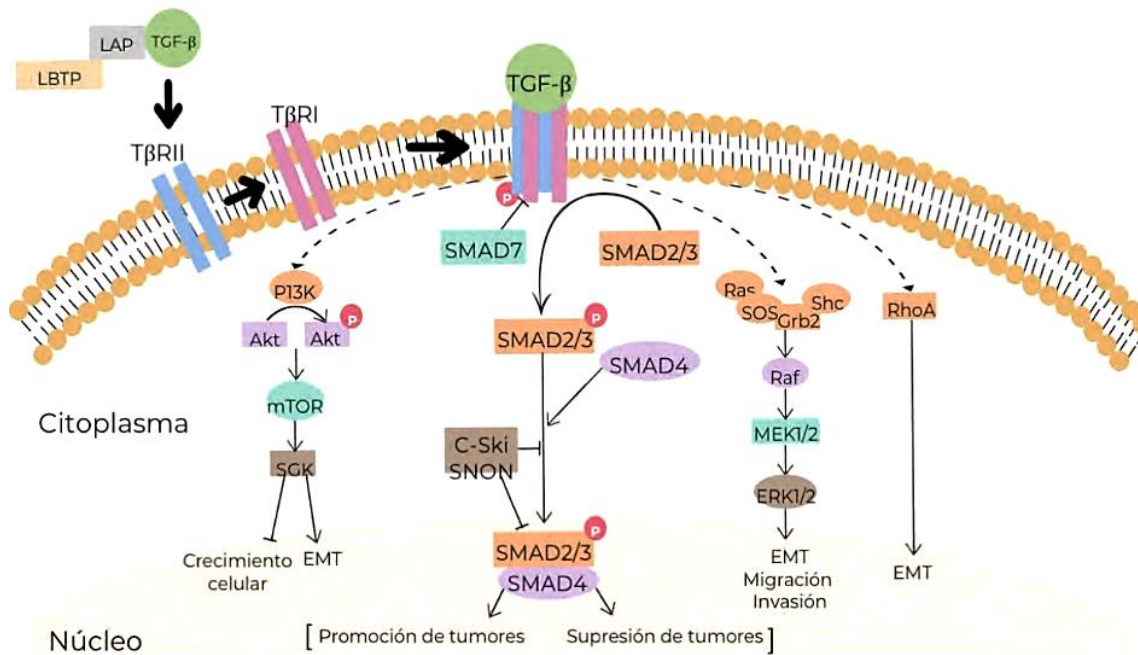


Figura 7. Vías de señalización de TGF-β. Adaptada de Pérez-Calixto *et al.* (2022).

• CD44

La proteína transmembrana CD44 es una molécula de adhesión celular que media la comunicación entre células adyacentes y la ECM, sirviendo como receptor de hialuronato. Interviene en varios procesos como la linfopoyesis y la angiogénesis y dirige la señalización intracelular de proliferación y migración. Además, en células que experimentan EMT su expresión se ve aumentada, estando implicada en procesos que permiten a las células tumorales comportarse como células CSC (Hassn *et al.*, 2021). El pre-ARNm de CD44 en humanos incluye 19 exones, que codifican una gran cantidad de isoformas mediante *splicing* alternativo. Los exones 1-5 y 15-19 son exones constantes que codifican para la isoforma estándar (CD44s) que posee los dominios N-terminal y C-terminal de la proteína y cuya expresión está regulada por ESRP1 (*Epithelial Splicing Regulatory Protein 1*). Los exones 6-14 son exones variables que se escinden o no alternativamente y codifican para las distintas isoformas variables (CD44v). Estas isoformas CD44v pueden contener un solo exón variable o una combinación de varios exones variables lo que resulta en muchas combinaciones posibles, generando una gran diversidad (Chen *et al.*, 2018; Hassn *et al.*, 2021). Se ha demostrado que la disminución y el aumento de expresión de ESRP1 y CD44s respectivamente, están estrechamente relacionados con la EMT y la invasividad en tumores de ovario y de mama (Brown *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2017).

1.2.3 Transición Epitelio-Mesénquima (EMT)

La EMT se describió por primera vez en el desarrollo embrionario y se observa en algunos procesos fisiológicos como la cicatrización de tejidos, la homeostasis y la fibrosis. Recientemente, se ha demostrado que la EMT posee un papel importante en la tumorigénesis de diferentes tipos de cáncer, incluidos los de próstata, pulmón, hígado, páncreas y mama (Ribatti *et al.*, 2020). La EMT es un proceso por el cual las células epiteliales, que poseen uniones célula-célula, una polaridad apico-basal y un potencial migratorio limitado, adquieren características de células mesenquimales, es decir, una polaridad anteroposterior y un fenotipo migratorio e invasivo. Los marcadores de superficie celular típicos de células epiteliales son la E-cadherina, las citoqueratinas, la ocludina y las claudinas, entre otras. Por otra parte, entre los marcadores de superficie celular de las células mesenquimales se encuentran la N-cadherina, la fibronectina y la vimentina, entre otros.

El proceso inverso a la EMT se conoce como transición mesénquima-epitelio (MET; *Mesenchymal- Epithelial Transition*) y posibilita la colonización de sitios distantes por parte de las células tumorales y la formación de tumores secundarios (Brabletz *et al.*, 2018). El proceso EMT-MET no es binario, las células sometidas a EMT atraviesan una serie de estados intermedios denominados EMT parciales (pEMT; *partial EMT*) en los que expresan tanto marcadores epiteliales como mesenquimales (Lüönd *et al.*, 2021). La progresión a través de la EMT se asocia con la adquisición de potencial para iniciar tumores, el cual alcanza su máximo en algún punto a lo largo del espectro de la EMT parcial (Figura 8). En las células tumorales rara vez se completa la transición a célula mesenquimal, ya que esta activación parcial incrementa la motilidad de las células y permite una reversión a MET más rápida potenciando el asentamiento, favoreciendo la diseminación y la invasión (Brabletz *et al.*, 2018; Chaffer *et al.*, 2016).

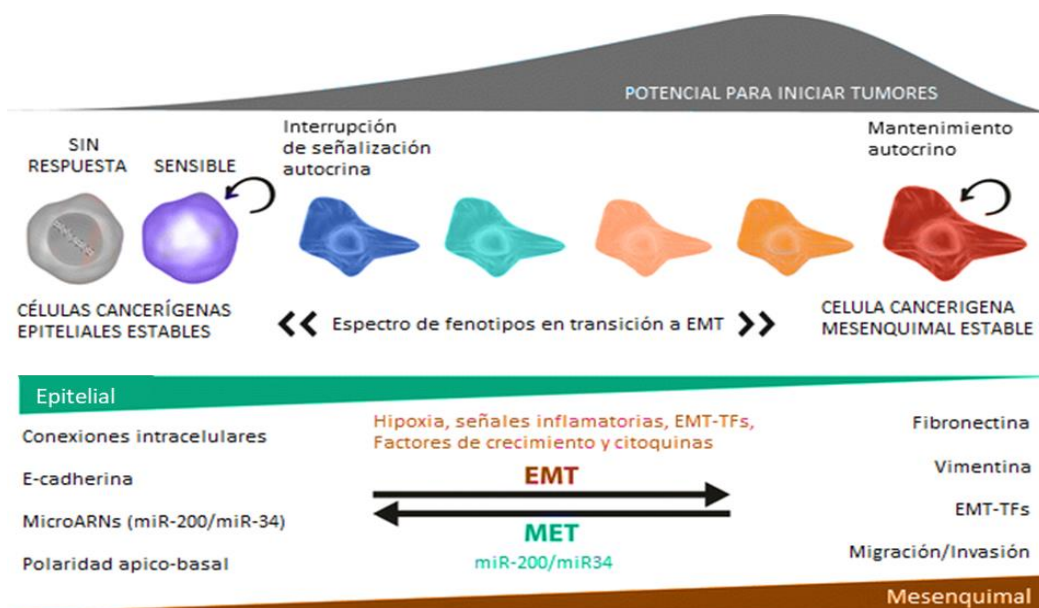


Figura 8. Espectro de fenotipos de EMT en cáncer. Adaptada de Chaffer *et al.* (2016).

- **Factores de transcripción de EMT (EMT-TFs)**

Los cambios que experimentan las células en la EMT están mediados por EMT-TFs que activan o reprimen genes relacionados con los marcadores moleculares típicos de células epiteliales o mesenquimales. Los EMT-TFs son Snail (Snai1), Slug (Snai2), Zeb1, Zeb2, Twist1 y Twist2. Juntos, suprimen la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina, claudina y ocludina, entre otros, y activan marcadores mesenquimales como N-cadherina, vimentina y fibronectina, entre otros. En los carcinomas humanos, Snai1 tiene un papel principal como inductor de EMT, mientras que Twist y Zeb 1/2 están principalmente involucrados en retener el fenotipo mesenquimal. La vimentina se expresa a altos niveles en muchos tumores epiteliales, incluidos el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el melanoma y el cáncer de pulmón, y su expresión es determinante para el crecimiento tumoral, la invasión y el mal pronóstico (Debnath *et al.*, 2022; Ribatti *et al.*, 2020).

Los EMT-TFs, además de aumentar la motilidad de las células tumorales, promueven la progresión de la malignidad ya que están implicados en la reparación del ADN, evasión de la senescencia e inducción de un fenotipo anti-apoptótico, favoreciendo su mantenimiento como CSCs. También desencadenan efectos protumorales en la composición del TME, aumentando la expresión de citocinas proinflamatorias en las células tumorales. En conjunto, estos procesos favorecen la quimioresistencia de las células tumorales lo que los convierte en excelentes dianas en nuevos tratamientos contra el cáncer (Brabletz *et al.*, 2018).

- **miARNs**

En los últimos años, se están estudiando los miARNs como reguladores de la EMT en el cáncer, debido a que se ha observado que son capaces de influir en los fenotipos mesenquimal y epitelial de las células. Los miARNs son ARNs pequeños (de 19 a 25 nucleótidos de longitud) no codificantes, de cadena sencilla, que controlan la expresión génica dirigiéndose a los transcritos de ARNm y provocando su represión o degradación traduccional, según el nivel de complementariedad con ellos. Los miARNs se expresan específicamente en tejidos concretos y en distintos momentos del desarrollo, y se utilizan como biomarcadores para diagnóstico y pronóstico en cáncer (Zaravinos, 2015). Los genes de miARNs suelen ser intrónicos, se agrupan en *clusters* y son transcritos por la ARN polimerasa II produciendo un miARN primario (pri-miARN). Los pri-miARN se escinden en sitios específicos del núcleo por la RNasa Drosha, generando un pre-miARN que se transloca al citoplasma donde la RNasa Dicer lo vuelve a cortar para producir el miARN maduro. Finalmente, el miARN maduro se une a la secuencia complementaria dentro de las regiones UTR de sus ARNm diana. La complementariedad perfecta entre el miRNA y su mRNA diana a menudo conduce a la degradación del mRNA, mientras que la complementariedad imperfecta conduce a la inhibición de la traducción (Zaravinos, 2015) (Figura 9).

Existen varios miARNs que tienen como dianas EMT-TFs. Los miARNs miR-205, miR-29b, miR-30a, miR-148a, miR-34, miR-203 y la familia miR-200 regulan la EMT en cánceres de mama, de próstata y de pulmón, entre otros, y a menudo participan en circuitos de retroalimentación con los EMT-TFs, controlando la plasticidad de las células epiteliales durante su diferenciación y la progresión del cáncer (Santos Ramos *et al.*, 2017; Zaravinos, 2015).

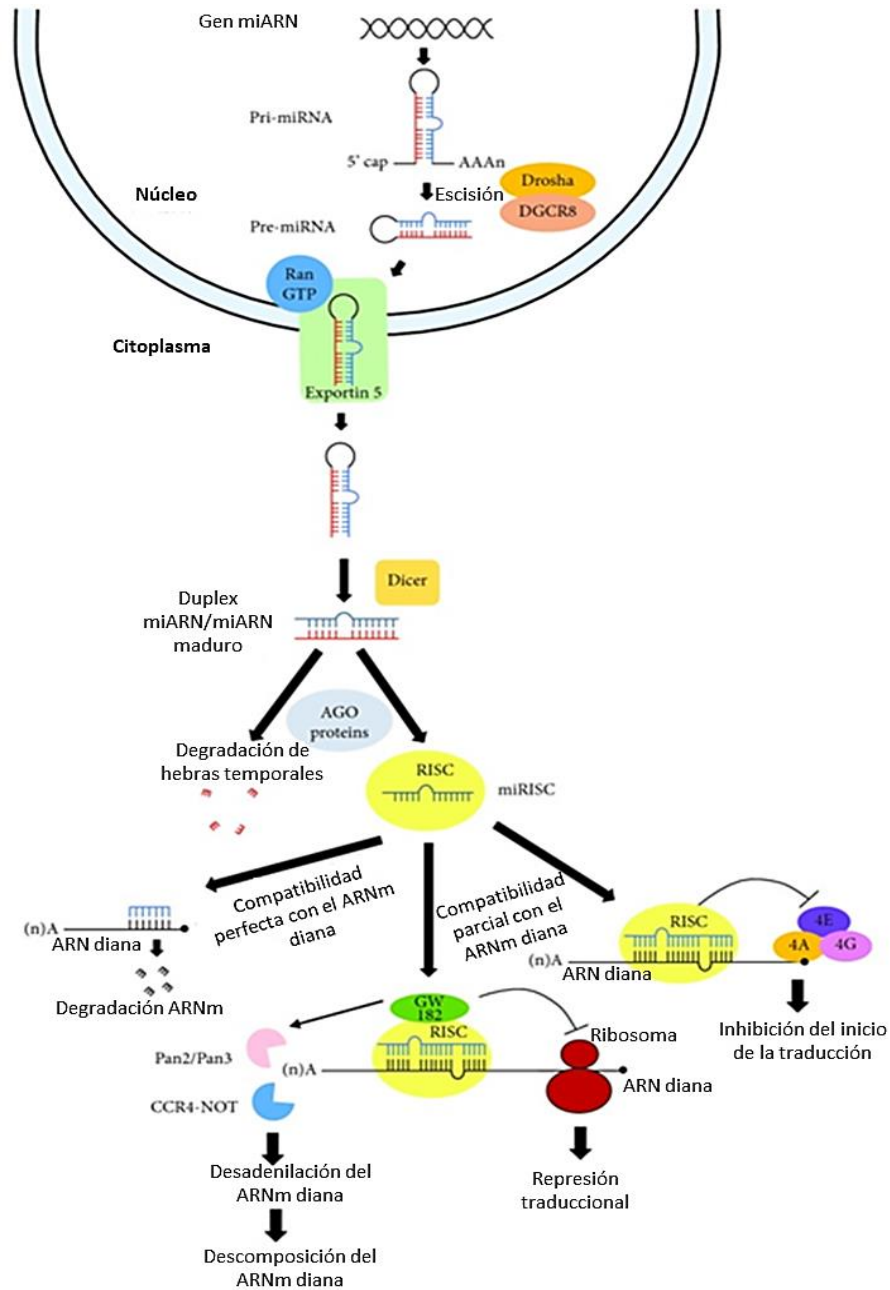


Figura 9. Vía canónica de la biogénesis de miARNs. Adaptada de Lee y Cheah (2019).

En particular, los miARNs de la familia miR-200 se han descrito como marcadores epiteliales con una función importante en el proceso de EMT, ya que suprimen el cambio de células epiteliales a mesenquimales uniéndose directamente a los ARNm de Zeb1 y Zeb2 (Santos Ramos *et al.*, 2017). La familia miR-200 incluye cinco miARNs conservados evolutivamente que están codificados en dos grupos. En humanos, un grupo se localiza en el cromosoma 1 y se produce a partir de un pri-miRNA que codifica miR-200b, miR-200a y miR-429 y otro grupo que incluye miR-200c y miR-141, está ubicado en el cromosoma 12 y se produce a partir de un pri-miRNA con dos sitios de inicio de la transcripción. Se ha observado que aguas arriba del inicio de transcripción de los pri-miRNA de ambos grupos hay elementos de unión E-box tipo Zeb y se demostró que Zeb1 y Zeb2 reprimen la expresión del grupo miR200-b/miR-200a/miR-429. Por tanto, Zeb1/2 y miR-200, que ejercen funciones opuestas sobre EMT, se regulan recíprocamente en un doble circuito de retroalimentación negativa (Cavallari *et al.*, 2021). Por una parte, la represión de *Zeb* conduce a un patrón de expresión génica epitelial a través de la inducción de los miembros de la familia miR-200. Por el contrario, la inducción de la expresión de *Zeb* promueve un patrón de expresión génica mesenquimal a través de la supresión de miR-200. Se ha demostrado que este circuito de retroalimentación desempeña un papel importante en la estabilización de la diferenciación celular en respuesta a señales extracelulares prevalentes (Cavallari *et al.*, 2021; Zaravinos, 2015).

1.3 Incidencia y mortalidad en cáncer

La carga sanitaria de morbilidad por cáncer sigue aumentando a nivel mundial. En 2020 uno de cada seis fallecimientos fue debido a esta enfermedad, la cual ocasionó cerca de 10 millones de defunciones. Actualmente, el cáncer constituye la segunda causa de muerte en el mundo (*World Health Organization*, WHO).

Según los datos de la IARC (*International Agency for Research on Cancer*), el cáncer de mama es el más comúnmente diagnosticado y la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres, seguido por el cáncer colorrectal y de pulmón para incidencia y viceversa para la mortalidad (Figura 10A). En los varones, el cáncer de pulmón es el más frecuente y la causa principal de muerte por cáncer, seguida por el cáncer de próstata y colorrectal en cuanto a incidencia, y el cáncer de hígado y colorrectal en cuanto a mortalidad (Figura 10B).

Teniendo en cuenta ambos sexos, el cáncer de mama femenino es el más comúnmente diagnosticado (11,7% del total de casos), mientras que el cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer (18 % del total) (Figura 10C).

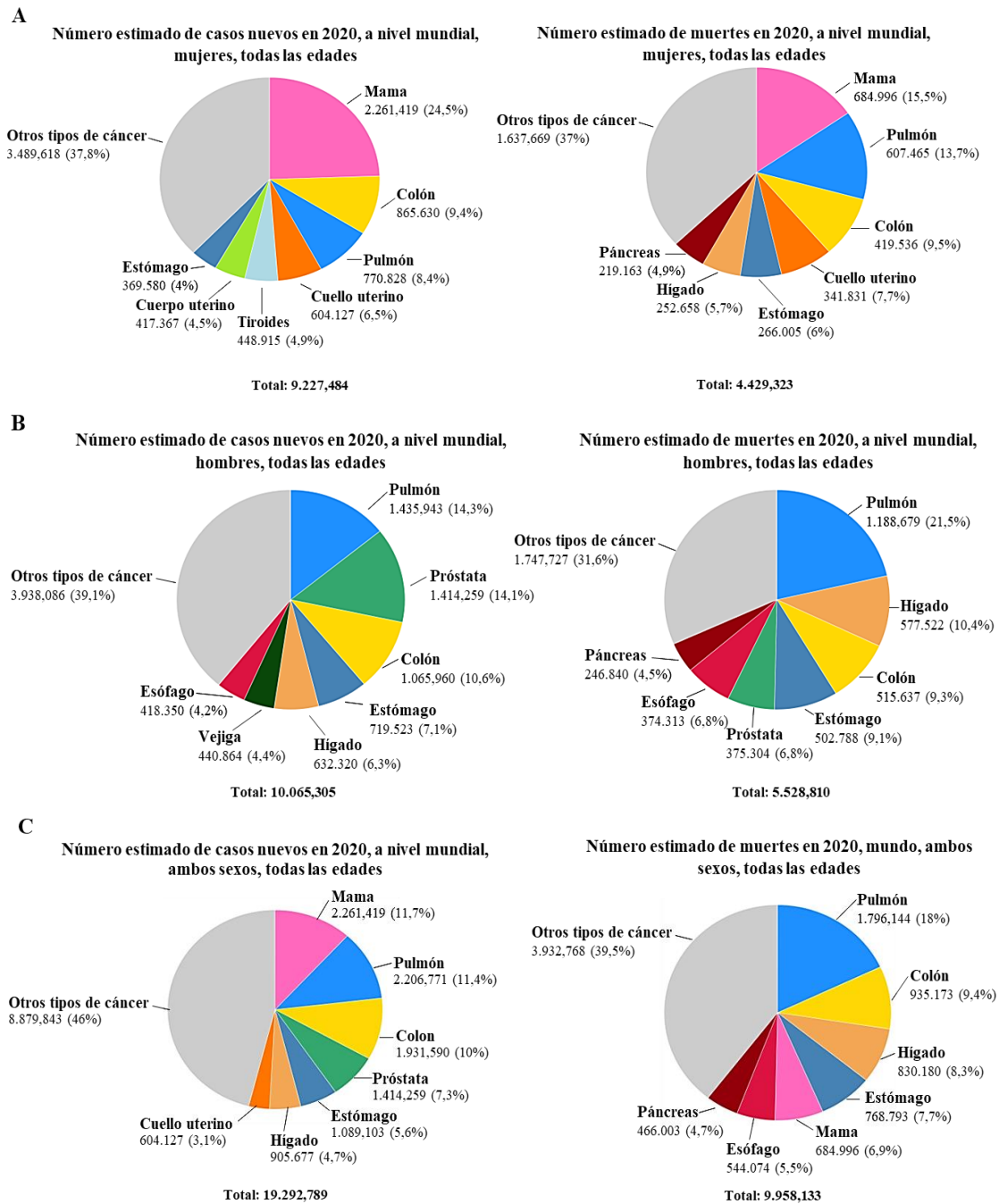


Figura 10. Distribución de incidencia y mortalidad de los siete tipos de cáncer más comunes en 2020 a nivel mundial. A) Mujeres. B) Varones. C) Ambos sexos. Global Cancer Observatory (GCO) 2020.

2. Cáncer de mama

El cáncer de mama fue el tipo de cáncer más diagnosticado en el mundo en 2020, siendo la causa de muerte más frecuente en mujeres y la quinta causa de muerte más común por cáncer en general. Concretamente, hubo más de 2,26 millones de nuevos casos y casi 685.000 muertes debidas a este tipo de cáncer (Sung *et al.*, 2021) (Figura 10A).

El cáncer de mama es muy heterogéneo en cuanto a su etiología y características patológicas, en algunos casos presenta un crecimiento lento y con buen pronóstico, mientras que en otros casos el curso clínico es muy agresivo y de fatal pronóstico (Tao *et al.*, 2015). El cáncer de mama temprano, es decir, el cáncer contenido en la mama o que solo se ha propagado a los ganglios linfáticos axilares, se considera curable. Las mejoras en la terapia combinatoria han llevado a aumentar las posibilidades de curación en alrededor del 70 a 80% de pacientes. Por el contrario, el cáncer de mama avanzado o metastásico no se considera curable con las opciones terapéuticas actualmente disponibles. Es una enfermedad tratable, para la cual los objetivos principales de la terapia son prolongar la supervivencia y controlar los síntomas de toxicidad asociada al tratamiento (Harbeck *et al.*, 2019).

La clasificación de los tipos de tumores mamarios según su morfología incluye el carcinoma ductal infiltrante, el carcinoma lobulillar infiltrante, tubular, mucinoso, medular y carcinoma adenoide quístico. El grado histológico, el cual incluye el grado de diferenciación celular, el pleomorfismo nuclear y el recuento mitótico, se utiliza en la subclasificación adicional de los tumores de mama, para planificar el tratamiento y determinar el pronóstico (Tao *et al.*, 2015).

Aproximadamente el 10% de los cánceres de mama son hereditarios y están asociados con antecedentes familiares, siendo las mutaciones más comunes las que se encuentran en los dos genes supresores de tumores *BRCA1* (17q21) y *BRCA2* (13q13), cuyas proteínas están involucradas en la reparación del ADN, y muestran un patrón de herencia autosómico dominante. Otros genes que se han encontrado con elevadas tasas de mutación en las células tumorales son *TP53*, *PIK3CA*, *MYC*, *PTEN*, *CCND1*, *ERBB2*, *FGFR1* y *GATA3* (Harbeck *et al.*, 2019).

En base a las evidencias moleculares, el cáncer de mama generalmente se clasifica en tres grupos: los que expresan receptores hormonales, ya sean de estrógenos (ER+) o progesterona (PR+); los que expresan receptores para el factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2+); y el cáncer de mama triple negativo, TNBC (por sus siglas en inglés, *triple negative breast cancer*), el cual no presenta receptores hormonales, ni del factor de crecimiento epidérmico 2 (ER-, PR- y HER2-) (Barzaman *et al.*, 2020). En general, los tumores ER+ son más pequeños y más comunes que los tumores ER- y también tienen menor propagación a los ganglios linfáticos. El grupo ER/PR+ se clasifica, a su vez, en dos subgrupos el luminal A y el luminal B. Por otro lado, el grupo ER- se clasifica en tres subgrupos: el subtipo HER2+ que se caracteriza por tener una expresión elevada de *HER2*; el subtipo basal que está asociado con una alta expresión de genes que normalmente se identifican en células mioepiteliales; y el subtipo normal el cual muestra un perfil de expresión génica variado. Tanto el subtipo HER2+ como el subtipo basal de ER- presentan peor pronóstico que los de los subtipos luminales de ER+ y el de tipo normal de ER-. Aproximadamente el 15% de los cánceres de mama son TNBC y suelen ser tumores más grandes con un fenotipo muy agresivo (Barzaman *et al.*, 2020; Tao *et al.*, 2015).

Además de los subtipos anteriores, existe otro tipo de tumor mamario conocido como cáncer de mama inflamatorio (IBC) que es clínica y biológicamente distinto. El IBC bloquea los vasos linfáticos dérmicos, cursa con una inflamación mamaria generalizada y se suele presentar en una etapa avanzada. Casi el 50 % de los IBC tienen un nivel elevado de HER2, en comparación con el 20% en los cánceres de mama de otros tipos y esto probablemente contribuye al alto grado de metástasis tempranas observado en IBC, que también presenta una alta actividad angiogénica y angioinvasiva debida a los altos niveles de expresión de factores proangiogénicos (Lim *et al.*, 2018; Tao *et al.*, 2015).

2.1 Cáncer de mama triple negativo (TNBC)

Los datos epidemiológicos muestran que el TNBC es más prevalente en mujeres jóvenes premenopáusicas menores de 40 años, que representan aproximadamente el 15-20% de todos los pacientes con cáncer de mama. En comparación con otros subtipos, el tiempo de supervivencia del paciente con este tipo de cáncer es más corto y la tasa de mortalidad es del 40% en los 5 años siguientes al diagnóstico. El TNBC es altamente invasivo y alrededor del 46% de pacientes presentan metástasis, principalmente en el cerebro y los pulmones, dado que este tipo de tumor se disemina preferentemente por vía hematogena. El tiempo medio de supervivencia después de la metástasis es de solo 13,3 meses y la tasa de recurrencia llega al 25%. Mientras que el tiempo promedio de recaída en pacientes con otros tipos de cáncer de mama es de 35 a 67 meses, en pacientes con TNBC es solo de 19 a 40 meses y la tasa de mortalidad en los 3 meses posteriores a la recurrencia es de hasta el 75% (Kumar y Aggarwal, 2016; Yin *et al.*, 2020). El TNBC incluye tumores con deficiencia del gen *BRCA1* y un subtipo de tumores denominados bajos en claudina que se definen por una baja expresión de genes de adhesión celular, una alta expresión de genes de EMT y patrones de expresión génica similares a los de células madre. Además, los tumores bajos en claudina son genómicamente estables, posiblemente debido a un estado menos diferenciado y a un efecto protector mediado por el factor de transcripción relacionado con EMT ZEB1 (Fougner *et al.*, 2020; Kumar y Aggarwal, 2016).

En comparación con otros tipos de cáncer de mama, el TNBC tiene opciones de tratamiento limitadas, es propenso a la recurrencia y la metástasis y tiene un mal pronóstico. Como es un tipo de cáncer de mama en el que no se expresa ER, PR y HER2, los tumores no son sensibles a la terapia endocrina, ni a la terapia molecular dirigida, por lo que la quimioterapia es el tratamiento sistémico principal (Yin *et al.*, 2020). No hay evidencia de que ningún agente quimioterapéutico particular sea más activo contra un fenotipo de cáncer de mama TNBC en el tratamiento neoadyuvante o adyuvante. Las terapias más comunes incluyen antraciclinas (doxorrubicina o epirubicina) y taxanos (paclitaxel o docetaxel) y constituyen el tratamiento estándar actual para pacientes con cáncer de mama en general, incluido el TNBC. En tumores con mutaciones en el gen *BRCA1* se utilizan agentes quimioterapéuticos de platino (cisplatino o

carboplatino) que impiden la reparación defectuosa del ADN que conduce al daño en el ADN y subsecuentemente induce apoptosis en este tipo de células cancerosas (Kumar y Aggarwal, 2016).

Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente VEGF, se ha utilizado en combinación con fármacos quimioterapéuticos como tratamiento antiangiogénico del TNBC en algunos países, pero el tiempo de supervivencia de los pacientes no aumentó significativamente (Yin *et al.*, 2020). Por lo tanto, es urgente desarrollar tratamientos alternativos dirigidos a nuevas dianas, pero debido a la alta heterogeneidad del TNBC, es particularmente difícil descubrir nuevas dianas terapéuticas y realizar una terapia dirigida. Actualmente, hay una gran cantidad de ensayos clínicos en curso dirigidos a receptores específicos para tratamiento del TNBC, como los inhibidores de la proteína PARP, la inmunoterapia y los tratamientos dirigidos a receptores de andrógenos, entre otros (Yin *et al.*, 2020).

3. Cáncer de pulmón

Con 2,2 millones de nuevos casos estimados y 1,8 millones de muertes (Figura 10C), el cáncer de pulmón fue el segundo cáncer más comúnmente diagnosticado a nivel mundial y la principal causa de muerte por cáncer en 2020, lo que representa aproximadamente uno de cada 10 cánceres diagnosticados y uno de cada 5 fallecimientos por cáncer (Sung *et al.*, 2021). En la gran mayoría de los casos (85-90%), el cáncer de pulmón está asociado con el tabaquismo, incluido el tabaquismo pasivo. Además, en un gran porcentaje de casos, el cáncer de pulmón se diagnostica en exfumadores, ya que el riesgo sigue aumentando años después de dejar de fumar (Romaszko y Doboszyńska, 2018). En base al isotipo principal, los carcinomas de pulmón se dividen en dos grandes grupos: los carcinomas microcíticos o de células pequeñas (SCLC; *Small Cell Lung Cancer*) que corresponden al 15% de los casos; y los carcinomas de células no pequeñas (NSCLC; *Non Small Cell Lung Cancer*) que corresponden al 83% de los casos (Rodríguez-Canales *et al.*, 2016). A pesar de los avances recientes en el diagnóstico, la clasificación y el tratamiento, la supervivencia general sigue siendo baja. Se necesita una mejor comprensión de la patología de estos tumores a nivel molecular con el objetivo implementar terapias personalizadas (De Sousa y Carvalho, 2018).

El cáncer de pulmón constituye un grupo de tumores heterogéneos, con varios grados de diferenciación. Teniendo en cuenta la heterogeneidad histológica, la clasificación diferencia entre carcinomas epidermoides, adenocarcinomas, carcinomas de pulmón de células pequeñas, carcinomas de células grandes, carcinomas neuroendocrinos de células grandes, carcinomas adenoescamosos, carcinomas sarcomatoides y pleomórficos, entre otros. Esta heterogeneidad tumoral se explica tanto por la propia heterogeneidad genética del tumor como por la presión selectiva relacionada con el TME, el sistema inmunológico y células de la ECM (De Sousa y Carvalho, 2018). El gen *Tp53* es uno de los genes mutados con mayor frecuencia en los cánceres

de pulmón, presente en un 50% de los tumores NSCLC y en casi todos los tumores SCLC. Entre otros de los genes mutados más importantes responsables de la heterogeneidad genética se encuentran *EGFR*, *KRAS*, *MET*, *LKB1*, *BRAF*, *PIK3CA*, *ALK*, *RET* y *ROS*. De ellos, los más comunes en adenocarcinomas son *KRAS*, *EGFR*, *MLL3* y *STK11*; en los carcinomas de células escamosas son *PI3KCA*, *SOX2*, *CDK2*, *P63* y *FGFR1*; y en el cáncer de pulmón de células pequeñas son *RB1*, *MLL2*, *SMO* y *PI3KCA* (De Sousa y Carvalho, 2018; Romaszko y Doboszyńska, 2018).

Los mecanismos de resistencia a los fármacos por parte de las células tumorales de pulmón están relacionados con la activación redundante de la transducción de señales, nuevas mutaciones, interacciones sinérgicas con el gen diana, adquisición del fenotipo EMT, hipermetilación del ADN y la aparición de nuevos subclones de células tumorales con mutaciones secundarias resistentes a la terapia previa. La recurrencia tras la resistencia terapéutica es una de las causas más importantes de muerte relacionada con el cáncer de pulmón (De Sousa y Carvalho, 2018).

3.1 Carcinomas de pulmón células no pequeñas (NSCLC)

Más del 80% de los cánceres de pulmón son NSCLC y la tasa de supervivencia a 5 años para los pacientes con este tipo de cáncer es solo del 21% a nivel mundial (American Cancer Society, 2023). La WHO y la IASLC (*International Association for the Study of Lung Cancer*) clasifican el NSCLC en tres subtipos principales: el carcinoma de células escamosas (25%), el adenocarcinoma (40%) y el carcinoma de células grandes (10%).

Las alteraciones genéticas más comunes en NSCLS, además de en *Tp53* comentado anteriormente, ocurren en los genes *EGFR* y *KRAS*. Generalmente están presentes en los clones fundadores, lo que indica un papel principal de estos genes en la iniciación del tumor, y constituyen dianas interesantes para objetivos terapéuticos. Las mutaciones de *KRAS* y *EGFR* suelen ser mutuamente excluyentes, pero cuando coexisten, las mutaciones de *KRAS* pueden conferir resistencia a los inhibidores de EGFR (Herbst *et al.*, 2018). Algunas mutaciones crean neoantígenos que son reconocidos por las células T citotóxicas infiltrantes en tumores, adquiriendo mayor sensibilidad a los tratamientos con inhibidores de puntos de control inmunitarios (ICBs, por sus siglas en inglés *Immune Checkpoint Blockers*). Las alteraciones genéticas afectan al TME en el NSCLC de varias formas, como por ejemplo la inactivación del gen supresor de tumores *STK11* (que ocurre en un tercio de los tumores con mutaciones en el gen *KRAS*) que conlleva una acumulación de neutrófilos en el TME. Se requieren estudios a gran escala para correlacionar los genomas de los tumores NSCLC con los constituyentes celulares del TME con la finalidad de comprender cómo los diferentes genotipos determinan la composición celular del TME (Herbst *et al.*, 2018).

La alta mortalidad por cáncer de pulmón se debe a la presencia de metástasis ya en el momento del diagnóstico en la mayoría de los pacientes, por lo que para mejorar la supervivencia a largo plazo se precisan terapias sistémicas más eficaces (Alexander *et al.*, 2020). Dependiendo del estadio, la histología, las alteraciones genéticas y la condición del paciente, los enfoques de tratamiento en NSCLC suelen incluir cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y terapia dirigida, ya sea sola o combinada. La quimioterapia adyuvante para pacientes con cáncer de pulmón en etapa temprana consiste en una combinación a base de cisplatino, mientras que el tratamiento quimioterapéutico en pacientes con cáncer metastásico combina el cisplatino con gemcitabina, vinorelbina, o taxanos como paclitaxel o docetaxel. La inmunoterapia combinada con la quimioterapia ha cambiado significativamente el panorama del tratamiento del NSCLC, ya que ha demostrado mejorar la eficacia de los agentes quimioterapéuticos en comparación con el tratamiento con solo quimioterapia para pacientes con NSCLC metastásico (Duma *et al.*, 2019). Por otra parte, la terapia dirigida ha mejorado los resultados clínicos significativamente en pacientes con NSCLC avanzado. En este sentido, ya están aprobados inhibidores de la tirosina quinasa dirigidos a las alteraciones genéticas de EGFR, para el tratamiento de pacientes con varios subtipos de NSCLC, y se han asociado con una mayor supervivencia en comparación con pacientes tratados con terapias no dirigidas (Alexander *et al.*, 2020; Herbst *et al.*, 2018).

4. Péptidos terapéuticos en el tratamiento del cáncer

La principal limitación de la quimioterapia convencional en el tratamiento del cáncer radica en la dificultad para administrar selectivamente a las células cancerosas la dosis terapéutica efectiva del agente citotóxico sin afectar a las células sanas. El denominado tratamiento “biológico” del cáncer incluye el uso de anticuerpos monoclonales, proteínas y péptidos. La utilización de moléculas de gran tamaño, como los anticuerpos monoclonales y las proteínas, se ha restringido a dianas vasculares presentes en el endotelio de vasos tumorales o neoplasias hematológicas malignas. Aunque no exentos de limitaciones, los péptidos poseen muchas ventajas, como son el tamaño pequeño, la facilidad de síntesis y modificación, la capacidad de penetración en el tumor, y una mejor farmacocinética y biocompatibilidad. Maximizar la eficacia terapéutica y reducir la toxicidad son dos de los objetivos más importantes que persigue la quimioterapia dirigida basada en el uso de una nueva generación de péptidos relacionados con tumores (Thayer, 2011).

Hasta la fecha, se han utilizado más de 600 péptidos en investigaciones clínicas y preclínicas, de los cuales 60 han sido aprobados como fármacos para distintas aplicaciones terapéuticas entre las que se incluye el tratamiento del cáncer (Ghaly *et al.*, 2023).

Los péptidos se utilizan de diferentes formas en el tratamiento del cáncer: directamente como fármacos (por ejemplo, como inhibidores de la angiogénesis); como agentes dirigidos

contra tumores transportando fármacos citotóxicos y radionúclidos (quimioterapia y radioterapia dirigidas); en hormonoterapia; y como vacunas peptídicas. En la Figura 11 se esquematizan distintas alternativas de utilización de péptidos en el tratamiento del cáncer. Además de su uso terapéutico, los péptidos constituyen una valiosa herramienta como biomarcadores para el diagnóstico y progresión del cáncer (Li *et al.*, 2023).

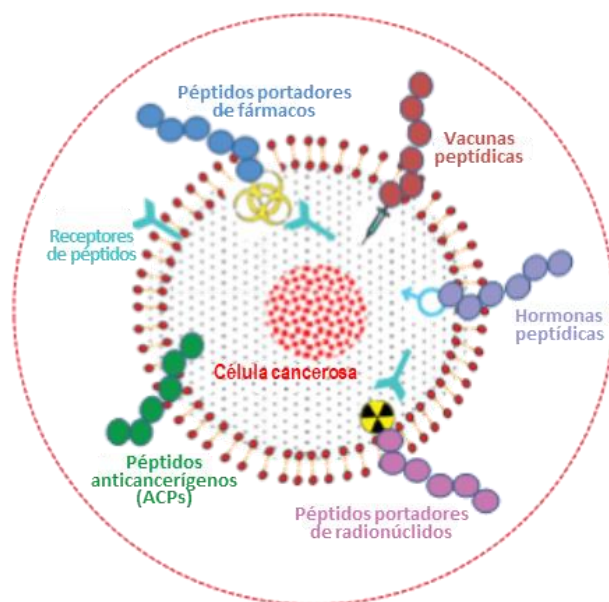


Figura 11. Opciones de terapias antitumorales basadas en péptidos. Adaptada de Thundimadathil (2012).

- **Hormonas peptídicas**

El paradigma de la aplicación de péptidos en el tratamiento del cáncer es el uso de agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), introducida por Schally *et al.*, (2017) en la terapia del cáncer de próstata. La administración de agonistas de LHRH (como buserelina, leuprolida, goserelina, y triptorelina) causa la represión de la expresión del receptor de LHRH en la pituitaria, conduciendo a la inhibición de la liberación de LH y en menor medida de FSH (hormona foliculoestimulante) con el consiguiente descenso en la producción de testosterona. Por el contrario, los antagonistas de LHRH bloquean directamente el efecto de LHRH en la pituitaria causando una inhibición rápida y mantenida de testosterona, LH y FSH. Cetorelix fue el primer antagonista de LHRH aprobado para su comercialización y utilizado en clínica. Con posterioridad, se ha aprobado una nueva generación de antagonistas de LHRH, tales como abarelix y degarelix. Los efectos antiproliferativos que subyacen a estos tratamientos incluyen inducción de apoptosis, inhibición de rutas de factores de crecimiento y disminución del potencial metastático (Tolkach *et al.*, 2013).

- **Péptidos como portadores de fármacos quimioterapéuticos y radionúclidos**

Hay dos tipos principales de péptidos que pueden ser conjugados a un fármaco citotóxico para dirigirlo selectivamente a las células cancerosas: péptidos dirigidos a dianas celulares y péptidos que penetran en las células (CPPs) (Samec *et al.*, 2022).

Los péptidos dirigidos a dianas celulares se conjugan con fármacos citotóxicos o con sistemas de nanopartículas, con la finalidad de incrementar la selectividad hacia las células tumorales, disminuir los efectos secundarios, reducir la dosis de fármaco administrado y concentrar el fármaco en el sitio de acción. Los péptidos RGD (Arg-Gly-Asp) y NGR (Asn-Gly-Arg) representan la primera generación de este tipo de péptidos dirigidos a tumores, independientemente de la naturaleza del tumor porque unen receptores celulares sobreexpresados durante la angiogénesis en células tumorales. Los péptidos RGD tienen una alta afinidad hacia integrinas α_v en la vasculatura angiogénica, mientras que los péptidos NGR tienen como receptor la aminopeptidasa N, sobreexpresada en los vasos sanguíneos angiogénicos.

Los CPPs son péptidos pequeños, generalmente de menos de 40 aminoácidos, que tienen la capacidad de penetrar en las células de manera muy eficiente. Se pueden utilizar para liberar fármacos y otras moléculas terapéuticas como siARN, debido a que son internalizados en la célula por endocitosis. A diferencia del anterior tipo de péptidos transportadores, se trata de péptidos específicos de tipos celulares. Ejemplos de este tipo de péptidos utilizados en tratamiento de cáncer son la clásica proteína Tat del HIV-1, el péptido R9 conjugado al péptido citotóxico caPeptide (del antígeno de proliferación celular nuclear, PCNA) en tratamiento del cáncer de mama y neuroblastoma, o F3 y LyP-1 capaces de internalizarse en las células tumorales y células endoteliales de la sangre (F3) y linfáticas (LyP-1) (Smith *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2013).

La terapia radionuclídica de receptores peptídicos (PRRT, *Peptide receptor radionuclide therapy*) es un tipo de tratamiento antitumoral para pacientes con tumores neuroendocrinos metastásicos no operables. Los péptidos portan radionúclidos que causan daño al ADN y se dirigen a células cancerosas que tienen sobreexpresados los receptores diana de dichos péptidos. El péptido radionuclídico Lutathera ($[^{177}\text{Lu}]\text{Lu-DOTA-TATE}$) fue aprobado a finales de 2017 por la EMA (*European Medicines Agency*) y a principios de 2018 por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos SST2-positivos. Actualmente, se está trabajando en el aumento de eficacia y en terapias de combinación para incrementar la radiosensibilidad con agentes que inducen estrés de replicación, daño directo en el ADN, inhibición de la reparación del ADN, incremento de la expresión del receptor diana, e interferencia con la proteostasis o el metabolismo celular (Feijtel *et al.*, 2020).

- **Vacunas peptídicas**

Las vacunas de péptidos sintéticos se encuadran en las estrategias de inmunoterapia del cáncer y tienen por objetivo elicitar y expandir células T específicas de tumor capaces de controlar o erradicar el tumor. Las vacunas peptídicas son sencillas de sintetizar, relativamente económicas, de fácil aplicación en la práctica clínica, versátiles en cuanto al antígeno diana y de bajo riesgo de anafilaxis inducida por antígeno. Las dos principales limitaciones son que su éxito depende de la apropiada selección del epítipo inmunogénico y que, en general, presentan una débil inmunogenicidad (Kumai *et al.*, 2017). Desde 1996, cuando se llevó a cabo el primer ensayo clínico con una vacuna peptídica basada en MAGE-1, antígeno tumoral humano capaz de desencadenar una respuesta inmune autóloga específica, hasta la actualidad, se han desarrollado numerosas vacunas, algunas ya comercializadas y otras en distintas fases de ensayos clínicos. Liu *et al.*, (2022a) han realizado una reciente revisión que incluye una selección de la aplicación clínica de vacunas peptídicas en distintas fases de ensayo en los últimos 5 años.

- **Péptidos anticancerígenos (ACPs)**

Los péptidos anticancerígenos (ACPs, *Anticancer peptides*) son un tipo de pequeños péptidos compuestos por 10–60 aminoácidos que pueden inhibir la proliferación celular o la migración, o suprimir la formación de vasos sanguíneos tumorales. La actividad anticancerígena de diferentes ACPs se atribuye a una variedad de mecanismos, principalmente: destrucción de la estructura de la membrana celular, apoptosis, antiangiogénesis y regulación inmune (Ghaly *et al.*, 2023).

Los ACPs se pueden clasificar en tres categorías principales según su origen: naturales (obtenidos a partir de animales, plantas, bacterias y hongos); modificados artificialmente (mediante proteólisis); y sintéticos (mediante síntesis química o con aproximaciones biotecnológicas a partir de ADN recombinante).

Los ACPs naturales mayoritariamente son péptidos antimicrobianos (AMPs; *Antimicrobial peptides*) que además poseen actividad antitumoral. Los AMPs son las moléculas efectoras del sistema inmune innato que actúan mediante la interacción con patógenos directamente a través de sus membranas o sobre dianas internas de las células. Utilizados en terapia contra el cáncer, el rápido modo de acción de los AMPs antitumorales les confiere la ventaja de una menor probabilidad de desarrollo de resistencia por parte de las células diana.

Las dos limitaciones más importantes de las terapias basadas en ACPs son la estabilidad *in vivo* comprometida por la degradación por proteasas, y su toxicidad para las células sanas a altas concentraciones de péptido. Para incrementar la actividad anticancerígena al tiempo que se reduce su citotoxicidad, las investigaciones se han centrado principalmente en la modificación química de la cadena polipeptídica de los ACPs o en la adición de secuencias que dirigen los péptidos al tumor. Las estrategias basadas en el uso de peptidomiméticos y de liberación de

péptidos en nanopartículas han logrado incrementar la estabilidad, la eficacia y la selectividad, y disminuir la toxicidad.

Un interesante ejemplo de ACPs sintéticos es el desarrollo de una serie de péptidos sintetizados utilizando una estrategia minimalista de diseño *de novo* basada en las características estructurales requeridas para un ACP α -helicoidal. La fórmula general para esta serie de ACPs es C(XXY)₃, en la que C representa el aminoácido cisteína, X representa aminoácidos hidrofóbicos (isoleucina o leucina), e Y representa aminoácidos catiónicos (arginina o lisina). Estos ACPs sintéticos mostraron selectividad hacia células de cáncer colorectal y cervical con mínima toxicidad hacia fibroblastos dérmicos (Hadianamrei *et al.*, 2022).

Recientemente, se han empleado métodos computacionales basados en inteligencia artificial, tanto para el diseño de péptidos como para reducir los posibles efectos adversos derivados de su inmunogenicidad o de la acción de peptidasas (Liscano *et al.*, 2020).

5. Péptidos antimicrobianos (AMPs)

Los péptidos antimicrobianos son una clase de pequeños péptidos que constituyen parte importante de la inmunidad innata de numerosos organismos (Huan *et al.*, 2020) y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, desde bacterias, hongos y plantas hasta animales vertebrados e invertebrados (Kumar *et al.*, 2018). En insectos, se observó por primera vez actividad antibacteriana en pupas de las polillas de seda gigantes *Samia Cynthia* y *Hyalophora cecropia*, las cuales presentaban inmunidad contra distintos microorganismos (Faye *et al.*, 1975). Steiner y colaboradores (1981) purificaron dos proteínas de pequeño tamaño con carácter catiónico y anfipático, aisladas de la hemolinfa de *H. cecropia* y responsables de dicha actividad, denominadas cecropinas. Durante esa década se descubrieron diversas proteínas pequeñas con actividad antibacteriana, pero fue en 1987 cuando Zasloff asentó el término de péptidos antimicrobianos con el descubrimiento de las magaininas, dos péptidos de 23 aminoácidos con actividad antibacteriana de amplio espectro, aislados de la piel de la rana *Xenopus laevis* (Zasloff, 1987).

5.1 Características de los AMPs

Los AMPs son péptidos de pequeño tamaño (entre 15 y 150 aminoácidos) con actividad de amplio espectro antibacteriana, antivírica, antifúngica y antitumoral que poseen una serie de características comunes (Lazzaro *et al.*, 2020). La mayoría de AMPs presentan cargas positivas que van desde +2 a +9, lo que les permiten interaccionar electrostáticamente con las cargas negativas de las membranas de diversos microorganismos y de las células tumorales (Liscano *et al.*, 2020; Tornesello *et al.*, 2020) y se expresan de manera constitutiva o inducible por diferentes tipos celulares, dependiendo del organismo y del tejido infectado (Téllez y Castaño, 2010). La

hidrofobicidad es otra característica clave de los AMPs que se define como el porcentaje de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos presentes en la secuencia peptídica. Esta hidrofobicidad determinará su solubilidad en agua y su capacidad para permeabilizar la membrana celular (Kumar *et al.*, 2018; Lazzaro *et al.*, 2020). Por último, es común a todos los AMPs la anfipaticidad, que se mide por el momento hidrofóbico y se refiere a la abundancia relativa de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos. En conjunto, estas características facilitan las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas del péptido con las cabezas aniónicas y la cadena hidrofóbica de los fosfolípidos de las membranas (Kumar *et al.*, 2018; Liscano *et al.*, 2020).

Se dispone de diversas bases de datos de péptidos antimicrobianos que contienen información acerca de diferentes tipos de AMPs en más de 3000 organismos y constituyen herramientas de gran utilidad (Ramazi *et al.*, 2022). En la Tabla 1 se recogen las principales bases de datos, clasificadas en dos categorías: bases de datos generales que contienen secuencias de AMPs de cualquier tipo; bases de datos especializadas, creadas a partir de características específicas como origen, organismo, estructura, etc.

Tabla 1. Bases de datos de AMPs generales y especializadas. Adaptada de Ramazi *et al.* (2022).

Bases de datos generales				
Base de datos	Clases de AMPs	Tamaño	Tipo de AMP	Año
dbAMP	26 clases principales de actividad funcional en 3044 organismos	~26 440	Natural y sintético	2022
DBAASP	Antibacteriano, antifúngico, antivírico y antitumoral en 7 organismos y células cancerosas y de mamíferos	~15 700	Natural, sintético y patentado	2021
LAMP	8 clases funcionales principales y 38 actividades funcionales	~ 23 250	Natural, sintético y patentado	2020
DRAMP	Antimicrobiano, antifúngico, antivírico, antitumoral, antiprotozoos e insectida	~ 22 250	Natural, sintético, patentado y fármacos AMP en desarrollo	2019
dbAMP	26 clases funcionales en 3044 organismos	~26 440	Natural y sintético	2018
InverPep	Péptidos antimicrobianos de invertebrados	~770	Natural	2017
CAMP	Antibacteriano, antifúngico y/o antivírico	~8160 secuencias 757 estructuras	Natural Predicho y patentado	2016
MEGARes	Compuestos antimicrobianos (fármacos, biocidas, metales, etc.)	~8000	Natural	2016
ADAM	Archaea, bacterias, plantas y animales	~7000	Natural	2015
APD	Antibacteriano	~1230	Natural y patentado	2008
Defensins Knowledgebase	Defensinas, antimicrobiano	~360	Natural	2007
Bases de datos especializadas				
Base de datos	Clase de AMPs	Tamaño	Tipo de AMP	Año
BaAMPs	Péptidos anti-biofilm	~237	BaAMPs naturales	2015
CancerPPD	Péptidos anticancerígenos	~3490	ACPs naturales y predichos	2015
ParaPep	Péptidos antiparasíticos	~860	APPs naturales y predichos	2014
YADAMP	Péptidos antibacterianos	~2525	ABPs naturales y predichos	2012
DADP	Péptidos de anfibios	~2570	Péptidos naturales	2012
THIOBASE	Tiopéptidos naturales	~100	Tiopéptidos naturales y predichos	2012
BACTIBASE	Bacteriocinas	~177	ABPs naturales y predichos	2010
Cybase	Cyclótidos	~1270	AMPs naturales y predichos	2008
Defensins Knowledgebase	Defensinas	~300	AMPs naturales	2007
Peptaibol database	Peptaiboles	~317	AMPs naturales	2004

5.2 Clasificación de los AMPs

Los AMPs constituyen un grupo muy heterogéneo por su diversidad en cuanto a estructura primaria y secundaria, características fisicoquímicas, actividad biológica, mecanismo de acción y regulación de su expresión génica. Por ello, se suelen clasificar atendiendo a los siguientes criterios: origen, estructura, mecanismo de acción y actividad biológica (Figura 12).

5.2.1 Clasificación de los AMPs según su origen

Atendiendo al origen, los AMPs más estudiados provienen de microorganismos, plantas, insectos y animales vertebrados (Tabla 2).

En bacterias y hongos la producción de AMPs no tiene una finalidad de protección frente a infecciones, sino como una estrategia de supervivencia para eliminar a otros microorganismos con los que compiten por nutrientes en un mismo nicho (Jenssen *et al.*, 2006). Los AMPs bacterianos se conocen también como bacteriocinas y constituyen una familia heterogénea con una potente actividad antimicrobiana. Entre las más conocidas se encuentran la Nisina y la Gramicidina de *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus brevis* (Cao *et al.*, 2018).

Los péptidos bioactivos son componentes esenciales de los mecanismos de defensa de las plantas y no solo exhiben actividades microcidas, sino que también están implicados en señalización celular (Salas *et al.*, 2015). Se han aislado de raíces, tallos, hojas, semillas y flores. Se han descrito 10 familias de AMPs de plantas, siendo las mejor estudiadas las defensinas, tioninas y snakinas (Moretta *et al.*, 2021).

En insectos, los AMPs se sintetizan en los cuerpos grasos y en la hemolinfa, y desempeñan una importante función en la protección frente a ataques microbianos (Vilcinskis, 2013). Se han aislado más de 200 AMPs procedentes de insectos que, en base a sus secuencias aminoacídicas y actividades antimicrobianas, se dividen en varios grupos: cecropinas, defensinas, péptidos ricos en prolina y ricos en glicina (Manniello *et al.*, 2021).

Entre los animales vertebrados, los anfibios, particularmente las ranas, son una importante fuente de AMPs secretados por las glándulas cutáneas. El paradigma de los AMPs en estos organismos es la magainina, activa contra levaduras, hongos, bacterias y virus (Borah *et al.*, 2020) y algunos de los mejor caracterizados son esculentinas, nigrocinas, brevininas y temporinas (Patocka *et al.*, 2019).

Por otra parte, catelicidinas y defensinas son los principales AMPs encontrados en mamíferos y se producen en los lugares constantemente expuestos a microbios, como son la piel y mucosas. Algunos AMPs de mamíferos tienen una función adicional relevante en la activación de la inmunidad innata (Moretta *et al.*, 2021). La catelicidina LL-37 es el único AMP que se produce en humanos, mientras que se han identificados seis α -defensinas y más de 30 genes que codifican β -defensinas en el genoma humano (Xu y Lu, 2020).

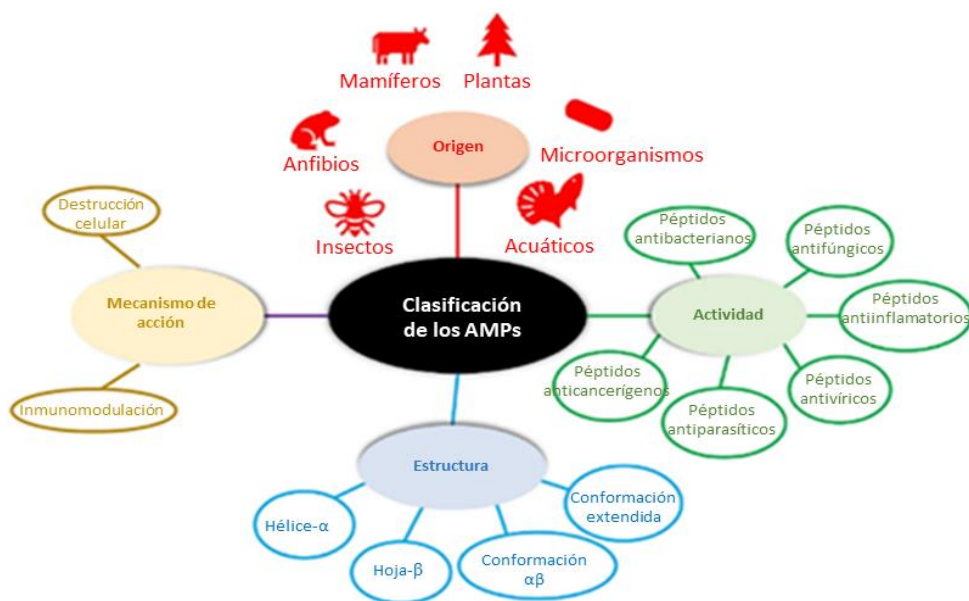


Figura 12. Clasificación de AMPs. Adaptada de Huan *et al.*, (2020).

Tabla 2. AMPs naturales de diferentes orígenes. Tomada de Koehbach y Craik (2019)

Clase	Fuente	Nombre péptido	Actividad biológica	Estudios
AMPs procedentes de microorganismos				
Bacteriocina	Bacterias <i>Bacillus</i> spp.	Mersacidina	Antibacteriana	<i>In vivo</i>
Bacteriocina	Bacterias <i>Lactobacillus gasseri</i>	Lactocillina	Antibacteriana	<i>In vitro</i>
Bacteriocina	Bacterias <i>Lactococcus lactis</i>	Nisina	Antibacteriana	Uso clínico
Bacteriocina	Bacterias <i>Bacillus subtilis</i>	Ericina	Antibacteriana	<i>In vitro</i>
Defensina	Hongos <i>Penicillium chrysogenum</i>	PAF	Antifúngica	<i>In vivo</i>
Defensina	Hongos <i>Aspergillus giganteus</i>	AFP	Antifúngica	<i>In vitro</i>
AMPs procedentes de plantas				
Defensina	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PvD1	Antifúngica	<i>In vitro</i>
Defensina	<i>Persea americana</i>	PaDef	Antibacteriana	<i>In vitro</i>
Tionina	<i>Triticum aestivum</i>	α 1-purothionina	Antibacteriana	<i>In vitro</i>
Snakina	<i>Ziziphus jujuba</i>	Snakina-Z	Antifúngica	<i>In vitro</i>
AMPs procedentes de insectos				
Cecropina	<i>Hyalophora cecropia</i>	CecA	Antibacteriana	<i>In vitro</i>
Cecropina	<i>Spodoptera litura</i>	Spodopsina Ia	Antibacteriana	En estudio
Defensina	<i>Drosophila melanogaster</i>	Drosomicina	Antifúngica	<i>In vitro</i>
AMPs ricos en prolina	<i>Apis mellifera</i>	Abaecina	Antibacteriana	<i>In vitro</i>
Atacina	<i>Hyphantria cunea</i>	Atacina-B	Antibacteriana	<i>In vitro</i>
AMPs ricos en glicina	<i>Drosophila melanogaster</i>	Diptericina	Antibacteriana	<i>In vitro</i>
AMPs procedentes de animales				
Catelicidina	Bovina	BMAP-28	Antibacteriana	<i>In vivo</i>
Brevinina	<i>Rana boylei</i>	Brevinina-1BYa	Antifúngica	<i>In vivo</i>
Catelicidina	Porcina	Protegrina-1	Antibacteriana	<i>In vitro</i>
AMPs procedentes de humanos				
Catelicidina	Granulocitos humanos	hCAP18/LL-37	Antibacteriana	Ensayo clínico
Defensina	Monocitos humanos	hBD, hBD2, hBD3	Antibacteriana	<i>In vivo</i>
Histatina	Saliva humana	Histatina-1	Antibacteriana Antifúngica	Uso clínico

5.2.2 Clasificación de los AMPs según su estructura

En función de la estructura secundaria que adoptan los AMPs, se clasifican en cuatro clases: α -helicoidal lineal, hoja- β , conformación $\alpha\beta$ (con estructuras α -hélice y hoja- β), péptidos “extendidos” lineales (sin α -hélices ni hojas β) y péptidos cíclicos (Figura 13) (Koehbach y Craik, 2019). En la Tabla 3 se muestran las características fundamentales de algunos de los AMPs más representativos de las 5 clases estructurales principales de AMPs.

• α -Helicoidal lineal

Los péptidos lineales α -helicoidales son la clase más estudiada. Por la distribución de los aminoácidos apolares y polares que presentan, suelen poseer una alta hidrofobicidad. Adoptan conformaciones aleatorias en soluciones acuosas y adquieren su conformación helicoidal al interactuar con las membranas. Esta clase comprende las magaininas, las cecropinas, la LL-37, las temporinas y la melitina, entre otros.

Los AMPs α -helicoidales suelen ser ricos en lisina y arginina y poseen amplio espectro microbida, siendo activos contra bacterias Gram + y Gram -, hongos y protozoos. Algunos también poseen gran actividad hemolítica (Auvynet y Rosenstein, 2009).

En insectos, este tipo de AMPs se producen en el cuerpo graso, un órgano de función equivalente al hígado de los mamíferos, y seguidamente son secretados a la hemolinfa. En vertebrados, se localizan en la piel de los anfibios, las secreciones, la mucosa gástrica, en el epitelio intestinal y en algunas células pertenecientes al sistema inmunitario (Auvynet y Rosenstein, 2009).

• Hoja- β

Los péptidos con hojas- β contienen de tres a cinco residuos de cisteína que les permite estabilizar su conformación formando puentes disulfuro. Generalmente exhiben un carácter anfipático, con los dominios polares y apolares distribuidos en las diferentes hojas. Estos AMPs poseen una estructura muy estable que no se ve alterada en su interacción con la membrana fosfolipídica de las células (Büyükkiraz y Kesmen, 2022).

Este es el segundo grupo de AMPs más abundantes y en él se incluyen péptidos como la taquiplésina, las protegerinas y la familia de las defensinas (Tornesello *et al.*, 2020).

• Conformación $\alpha\beta$

También se conocen AMPs con conformación mixta de α -hélices y hojas- β en su estructura que está estabilizada por 3 o 4 puentes disulfuro. Poseen una estructura anfipática en la que los residuos cargados positivamente se encuentran localizados en la α -hélice, mientras que la hoja- β contiene los residuos aminoácidos hidrofóbicos (Büyükkiraz y Kesmen, 2022).

Un ejemplo de AMPs de este tipo son las β -defensinas humanas. Concretamente, a la hBD-3 se le atribuye una actividad antibacteriana mayor que a las otras dos defensinas (hBD-1 y hBD-2), gracias a su estructura dimérica y a una mayor densidad de carga en la superficie de la proteína (Wang., 2014).

- **“Extendidos” lineales (no $\alpha\beta$)**

Los péptidos extendidos, como las histatinas y la indolicina, no presentan ninguna de las tres conformaciones anteriores, son generalmente lineales y suelen ser ricos en triptófano, prolina y glicina (Koehbach y Craik., 2019).

- **Cíclicos**

Por último, en la clase de los péptidos cíclicos encontramos principalmente algunas bacteriocinas que adquieren su conformación uniendo los aminoácidos en posición N-terminal y C-terminal, estabilizando las estructuras a través de enlaces tioéter y disulfuro (Bin Hafeez *et al.*, 2021).

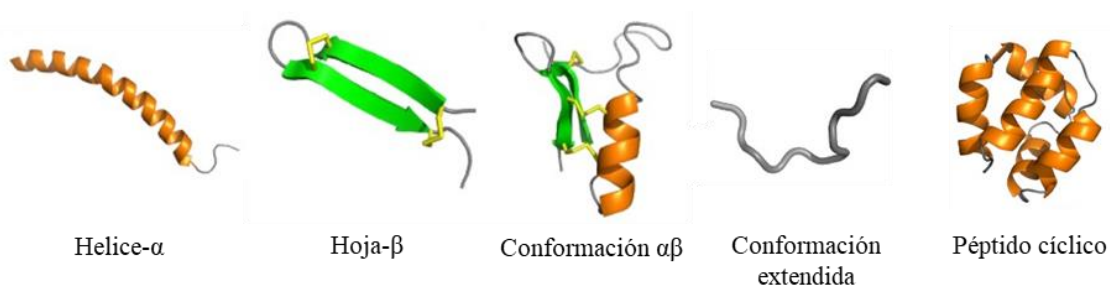


Figura 13. Estructura de los AMPs. Hélices- α representadas en naranja, hojas- β representadas en verde y versiones extendidas y giros representadas en gris. Adaptada de Koehbach y Craik, (2019).

Tabla 3. Péptidos representativos de las 5 clases estructurales principales de AMPs. Tomada de Koebach y Craik (2019).

Péptido (origen)	Tamaño (Nº AA)	Carga neta	Comentarios
Péptidos α-helicoidales lineales			
LL-37 (humano)	37	+6	Prototipo de catelicina humana, HDP
Magainina-2 (anfibio)	23	+3	Prototipo de AMP α -helicoidal
Péptidos 'extendidos' lineales			
Indolicidina (bovina)	13	+4	Rica en Trp, estructura unida a micelas de DPC y SDS
Drosocina (Drosophila)	19	+5	Rico en Pro/Ser/Thr, <i>o</i> -glicosilado, fragmento de drosocina unido a DnaK
Pirrocoricina (insecto)	20	+3	Rico en Pro, Thr, <i>o</i> -glicosilado, no estructurado, con vueltas
PR-39 (porcina)	39	+10	Rico en Pro y Arg, adopta hélice PP-II
Péptidos hoja-β			
Protegrina-1 (porcina)	18	+7	Péptido con 2 hojas- β estabilizadas por 2 puentes disulfuro
HD-5 dímero (humano)	64	+8	Dímero de defensina C ₂ -Simétrico
Ratusina (roedores)	62	+16	Dímero de defensina C ₂ -Simétrico
Péptidos con elementos estructurales α-hélice y hoja-β			
Phormicina (insecto)	40	+3	Prototipo CS $\alpha\beta$ de defensina de insectos
HBD-1 (humano)	36	+4	β -defensina 1 humana
Péptidos cíclicos y otras topologías complejas			
Bacteriocina AS-48 (bacteria)	70	+6	Péptido con 5 α -hélices con esqueleto cíclico, sin otras características comunes a otros AMPs
Kalata B1 (planta)	29	0	Prototipo cíclico con motivo nodal de cisteínas ICK
RTD-1 (mamífero)	18	+5	Tres enlaces disulfuro organizados en una estructura en escalera
Subtilosina A (bacteria)	35	-1	Sactibiotico cíclico con 3 puentes azufre- α -carbono
Microcina J25 (bacteria)	21	-1	Péptido con cadena cíclica cabeza-cadena lateral enroscado por la cola C-terminal
Nisina-A (bacteria)	34	+3	Lantibiótico altamente modificado post-traduccionalmente
Sublancina 168f (bacteria)	37	+3	Péptido con residuo S-Glycosylado vía cisteína

5.2.3 Clasificación de AMPs según su mecanismo de acción

Los mecanismos de acción de los AMPs se pueden dividir en dos clases principales, los AMPs que directamente destruyen las células y los AMPs que modulan la inmunidad mediante señalización proinflamatoria y antiinflamatoria o en procesos de cicatrización. A su vez, los AMPs que destruyen las células pueden ser membranolíticos o no membranolíticos (Kumar *et al.*, 2018).

Los AMPs catiónicos membranolíticos interactúan inicialmente con la superficie de las membranas de las células cargadas negativamente a través de interacciones electrostáticas. Las interacciones hidrofóbicas posteriores entre el dominio anfipático y los fosfolípidos de membrana provocan la formación de poros.

La selectividad preferencial de los AMPs por las membranas bacterianas frente a las de las células eucariotas se debe a su mayor carga negativa, por la presencia de fosfolípidos cargados

negativamente (como cardiolipina y fostatidilglicerol), LPS, LTA, etc. Las membranas de células eucariotas, por el contrario, se caracterizan por tener una mayor cantidad de lípidos zwitteriónicos o neutros, como colesterol en animales y ergosterol en el caso de los hongos (Malanovic y Lohner, 2016).

Actualmente se proponen tres mecanismos de acción mediante los cuales los AMPs son capaces de desestabilizar y permeabilizar la membrana de las células: el modelo de barril, el modelo de alfombra y el modelo de poro toroidal (Boparai y Sharma, 2020).

- **Modelo de barril**

El modelo de barril (Figura 14A) se caracteriza por la acumulación de monómeros de péptido en la superficie de la célula, los cuales se van agregando y fuerzan la exposición de la parte hidrofóbica del péptido a la parte hidrofóbica de la membrana. De este modo, generando cambios conformacionales, se va formando un poro con forma de barril en la membrana de la célula. Finalmente, estos poros provocan muerte celular debido a la pérdida del equilibrio osmótico y del potencial de membrana. Este mecanismo parece ser el más compatible con péptidos altamente hidrófobos (Kumar *et al.*, 2018; Tornesello *et al.*, 2020).

- **Modelo de alfombra**

En el modelo de alfombra (Figura 14B) los AMPs permanecen paralelos a la superficie celular sin insertarse en la bicapa lipídica, hasta alcanzar una densidad umbral en la que la concentración de péptido se vuelve crítica y provoca un aumento en la fluidez de la membrana. Esta se curva formando micelas que finalmente destruyen la bicapa lipídica y provocan la muerte celular por pérdida del contenido citoplasmático (Kumar *et al.*, 2018; Tornesello *et al.*, 2020). Algunos ejemplos de péptidos antimicrobianos con este tipo de mecanismo son las cecropinas, la dermaseptina y algunas magaininas (Teixeira *et al.*, 2012).

- **Modelo de poro toroidal**

En el modelo de poro toroidal (Figura 14C) los péptidos permanecen dispuestos de forma paralela a la membrana e inactivos a bajas concentraciones. Al alcanzar una concentración límite se disponen de forma perpendicular a la membrana, forzando a la bicapa a plegarse sobre sí misma formando un poro, pero conservando la integridad de esta. La constitución de un poro toroidal implica que los residuos polares de los péptidos se asocian con las cabezas de los grupos lipídicos, y debido a esto, la membrana se curva permitiendo conectar las dos partes de esta, la externa y la citoplásmica. Con ello se crea una tensión elástica desfavorable que puede provocar la desintegración del poro, mecanismo mediante el cual algunos péptidos se translocan penetrando en el interior de la célula y actuando sobre dianas intracelulares (Kumar *et al.*, 2018; Tornesello *et al.*, 2020).

El modelo de poro toroidal se diferencia del modelo de barril en la composición del canal que en el poro toroidal es mixto y está formado por lípidos de membrana y péptidos, mientras que en el poro del modelo de barril está formado únicamente por péptidos (Téllez y Castaño, 2010).

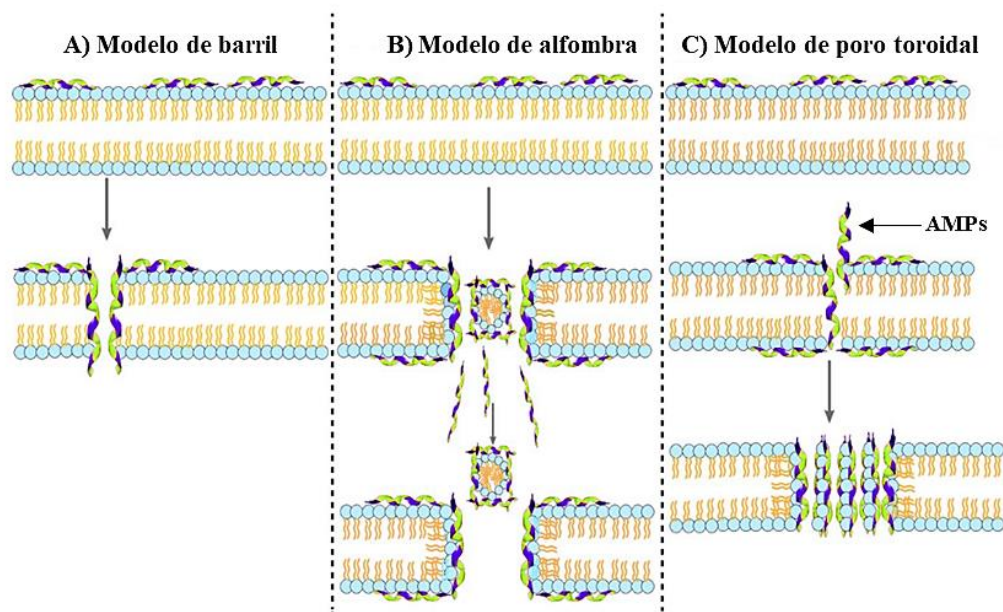


Figura 14. Mecanismos de acción de los AMPs membranólíticos. La membrana lipídica está representada en azul (cabezas polares de los lípidos) y amarillo (colas alifáticas apolares de los lípidos). Las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas de los AMPs están representadas en verde y morado respectivamente. A) Modelo de barril B) Modelo de alfombra C) Modelo de poro toroidal. Adaptada de Bin Hafeez *et al.* (2021).

Por otra parte, los AMPs con mecanismos de acción no membranólíticos ejercen su actividad antimicrobiana sin afectar a la estabilidad de la membrana. Estos AMPs penetran directamente en las células e interfieren con actividades celulares esenciales, como la replicación del ADN, la transcripción, la traducción, el plegamiento de proteínas y la división celular. Algunos ejemplos de péptidos con este mecanismo de acción son las buforinas, la indolicidina, la defensina humana $\alpha 5$ y algunos AMPs ricos en residuos de prolina derivados de insectos (Bin Hafeez *et al.*, 2021).

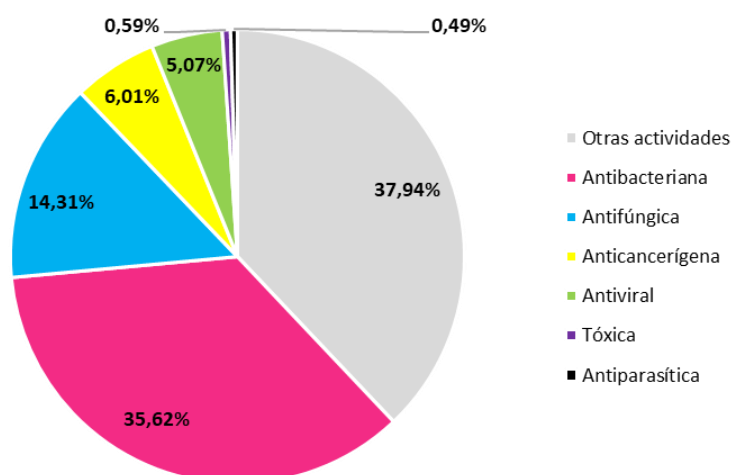
En la Tabla 4 se muestran algunos AMPs representativos de los distintos mecanismos.

Tabla 4. AMPs representativos de los distintos mecanismos de acción y sus dianas. Tomada de Koehbach y Craik (2019).

Péptido		Mecanismo/diana
Péptidos α-helicoidales lineales		
LL-37	α -hélice	Permeabilización de la membrana vía poro toroidal, diversas actividades inmunomoduladoras y de defensa
Magainina-2	α -hélice	Permeabilización de la membrana vía poro toroidal
Buforina	α -hélice	Unión e inhibición de ARN y ADN
Péptidos 'extendidos' lineales		
Drosocina	Rica en Pro	Inhibición de la traducción de proteínas vía unión a la subunidad ribosómica 50S o 70S
Pirrocoricina	Rica en Pro	Unión e inhibición de la chaperona bacteriana DnaK
Péptidos hoja-β		
Taquiplesina	Hoja- β	Unión e inhibición del ADN
HNP-1	α -defensina	Inhibición de la biosíntesis de la pared celular vía unión a lípido II
Péptidos con elementos estructurales α-hélice y hoja-β		
Plectasina	Defensina (hongos)	Inhibición de la biosíntesis de la pared celular vía unión a lípido II
NaD-1	Defensina (plantas)	Unión al ácido fosfatídico y permeabilización de la membrana vía estructuras semejantes al modelo de alfombra
Péptidos cíclicos y otras topologías complejas		
Nisina-A	Lantibiótico	Inhibición de la biosíntesis de la pared celular vía unión a lípido II
Microcina J25	Péptido lasso	Inhibición de la ARN polimerasa, membranólítico
Kalata B1	Ciclótido	Unión a lípidos fosfatidiletanolamina

5.2.4 Clasificación de AMPs según su actividad biológica

Los AMPs no poseen únicamente la capacidad antimicrobiana de la inmunidad innata. En animales vertebrados actúan también en la inmunidad adaptativa con funciones moduladoras en quimiotactismo, señalización en procesos inflamatorios y cicatrización de heridas. Además, algunos AMPs exhiben actividad antitumoral. En la Figura 15 se muestran los porcentajes de AMPs descritos con distintos tipos de actividades biológicas (Jhong *et al.*, 2022).

**Figura 15.** Actividades biológicas de los AMPs. Adaptada de Jhong *et al.* (2022).

- **Actividad antimicrobiana**

Como se ha mencionado anteriormente, los AMPs poseen actividad antibacteriana (tanto en Gram⁺ como en Gram⁻), antivírica, antifúngica y antiparasitaria (Kumar *et al.*, 2018; Tornesello *et al.*, 2020).

Los AMPs antibacterianos ejercen su actividad alterando la permeabilidad de la membrana perforándola o penetrando en el interior de ella para llevar a cabo acciones intracelulares. Los AMPs catiónicos tienen una afinidad mayor por patógenos bacterianos debido a la presencia de componentes aniónicos particulares en las membranas bacterianas, tales como el LPS de las bacterias Gram⁻ y el LTA de las Gram⁺.

La rapidez con la que los AMPs destruyen las bacterias y sus efectos genéricos a nivel de membrana e intracelulares, no dirigidos a moléculas o rutas específicas, previenen el desarrollo de resistencia a AMPs por parte de las bacterias. Por esta razón, los AMPs son moléculas especialmente atractivas para su aplicación, solos o en combinación con otros agentes, en el manejo de la resistencia bacteriana.

De acuerdo con el mecanismo de síntesis de las bacteriocinas se clasifican en dos grupos: péptidos sintetizados por ribosomas, activos contra un reducido número de bacterias y hongos; y péptidos de síntesis no ribosomal con una amplia actividad antibacteriana (Zhang *et al.*, 2021).

Entre las bacteriocinas más usadas destacan la Nisina (producida por *Lactococcus lactis*), la Gramicidina (producida por *Bacillus brevis*) y la Daptomicina (producida por *Streptomyces roseosporus*), la última de cuales con la particularidad de ser aniónica (Moretta *et al.*, 2021).

Se ha propuesto que la actividad antivírica de los AMPs tiene lugar durante la adsorción viral y el proceso de entrada, como resultado de una interacción entre el péptido y la envoltura vírica. No se ha establecido una relación directa entre la estructura secundaria del péptido y la actividad antivírica de los AMPs. Por ejemplo, algunos péptidos con estructura hélice- α , como las cecropinas o las catelicidinas, carecen de efecto sobre el virus herpes simplex (VHS), mientras que las magaininas y los péptidos con estructura de hojas β , como las defensinas y las protegerinas, sí poseen una fuerte actividad contra dicho virus (Wang *et al.*, 2016).

El número de AMPs con actividad antifúngica identificados es cada vez mayor. Entre los mecanismos de acción antifúngica descritos hasta el momento se encuentran la lisis celular y la inhibición de la síntesis de pared celular. Muchos de los péptidos con actividad antifúngica poseen aminoácidos polares y neutros, lo cual sugiere una relación entre la actividad y la estructura. Sin embargo, en algunos estudios se ha observado actividad antifúngica en péptidos muy variables en cuanto a estructura y secuencia aminoacídica (Wang *et al.*, 2016).

La actividad de los AMPs antiparasitarios parece depender de características peptídicas distintas a las requeridas para las actividades antibacterianas, antifúngicas o antivíricas, aunque los modos de acción sí que muestran cierto paralelismo (revisado en Huan *et al.*, 2020). La magainina 2 fue uno de los primeros AMPs en mostrar actividad antiparasitaria, provocando la

lisis osmótica del paramecio *Paramecium caudatum*. La catelicidina porcina PMAP-23 actúa contra huevos de *Caenorhabditis elegans*, mediante la formación de poros y la interacción directa con la bicapa lipídica. En péptidos análogos de defensinas del mejillón, se ha observado actividad contra *Leishmania brucei* y *Trypanosoma sp.*

- **Actividad quimiotáctica**

Los péptidos antimicrobianos favorecen indirectamente la quimiotaxis mediante la inducción y el aumento de la secreción de quimioquinas. Las familias de las defensinas y las catelicidinas son las más importantes en cuanto a actividad quimiotáctica. Las α y β defensinas atraen neutrófilos, linfocitos B y macrófagos, y promueven la activación y desgranulación de mastocitos, que a su vez reclutan a más neutrófilos y activan la transcripción de interleuquinas (Auvynet y Rosenstein, 2009). La catelicidina humana LL-37, recluta monocitos, neutrófilos, mastocitos y linfocitos T CD4 y su actividad quimiotáctica está mediada por el receptor acoplado a proteínas G FRPL1 (*Formyl Peptide Receptor*) (Wang, 2014).

- **Actividad proinflamatoria y antiinflamatoria**

La actividad de algunos AMPs es principalmente proinflamatoria, aunque en determinados contextos, pueden inducir un efecto antiinflamatorio promoviendo la secreción de citoquinas antiinflamatorias. Tanto las defensinas como las catelicidinas presentan actividad antiinflamatoria, induciendo la liberación de IL-10 en el sitio de la inflamación y suprimiendo las respuestas de la vía de señalización de los TLR, disminuyendo la expresión de TNF α y evitando el choque séptico (Téllez y Castaño, 2010).

- **Actividad cicatrizante**

Algunos AMPs, o fragmentos de estos con actividad inmunomoduladora, actúan sobre el proceso de cicatrización de heridas, ya que inducen la expresión de interleuquinas, estimulan la proliferación de queratinocitos, inhiben la actividad oxidasa de los neutrófilos y promueven la formación de moléculas de la matriz extracelular responsables del proceso cicatrización, como sindecanos, proteoglucanos y heparansulfato (Téllez y Castaño, 2010).

La regeneración de un tejido lesionado implica la liberación de factores de crecimiento que promuevan la migración y proliferación de fibroblastos, los cuales segregarán matriz extracelular para que se puedan depositar las nuevas células epiteliales. Estos factores de crecimiento junto con la IL-1 inducen la secreción en los queratinocitos de LL-37, hBD-3 y otros AMPs. Las actividades y funciones de los péptidos antimicrobianos secretados son complementarias y ayudan a regular la homeostasis en los tejidos, a través de bucles de regulación complejos que responden a distintas vías de señalización (Moretta *et al.*, 2021).

- **Actividad antitumoral**

Algunos de los AMPs mencionados anteriormente, como las cecropinas, las magaininas, la melitina y la buforina, también poseen actividad antitumoral (revisado en Felício *et al.*, 2017). La forma en la que los AMPs interactúan con las células tumorales es similar a la de las membranas bacterianas ya que, a diferencia de las células sanas, las células tumorales presentan en la cara externa de la membrana moléculas aniónicas como la fosfatidilserina (PS), el heparán sulfato, mucinas, glicolípidos y glicoproteínas y una mayor proporción de proteínas asociadas a la membrana que les proporcionan una carga neta negativa y las hace susceptibles a los AMPs catiónicos (Felício *et al.*, 2017; Liscano *et al.*, 2020). Otras de las características que diferencian la superficie de las células sanas y las tumorales son que las segundas presentan un menor contenido de colesterol y un mayor número de filopodios y microvellosidades. Estas microvellosidades aumentan la superficie de la membrana y el área de interacción y, como consecuencia, mejoran la atracción de los AMPs por las células tumorales (Tornesello *et al.*, 2020).

Además de las actividades líticas observadas en AMPs antitumorales, tanto en la membrana celular (necrosis) como en la membrana mitocondrial (apoptosis), algunos también presentan actividades no membranolíticas después de interactuar con las membranas, ya sea reclutando células del sistema inmune o dirigidas a proteínas celulares esenciales, por ejemplo, inhibiendo la angiogénesis (Felício *et al.*, 2017). Otros AMPs también tienen capacidad de penetrar en las células, bien de manera directa con el modelo de alfombra o de poro toroidal explicados en el apartado anterior (Figura 14B y C), o bien de manera indirecta mediante endocitosis (Norouzi *et al.*, 2022). Por último, un tercer tipo de interacción de los AMPs con las células la presentan los péptidos dirigidos a tumores que se unen a receptores de superficie de células tumorales para llevar a cabo su internalización (Norouzi *et al.*, 2022; Vale *et al.*, 2020).

Los aminoácidos más abundantes en péptidos dirigidos a tumores son cisteína, arginina, glicina, leucina y serina, siendo generalmente la cisteína el que más contribuye a su composición. Además, estos péptidos tienen algunos motivos comunes como los RGD y NGR, los cuales son ligandos para las integrinas $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$ y la aminopeptidasa N, sobreexpresadas en células tumorales metastásicas y células endoteliales, respectivamente (Norouzi *et al.*, 2022; Vale *et al.*, 2020).

5.3 Aplicaciones terapéuticas basadas en AMPs y potencial clínico

Debido a las numerosas ventajas que ofrecen los AMPs, entre las que se encuentran su alta eficacia, el amplio espectro de acción, la baja citotoxicidad y la escasa acumulación en los tejidos, existen diversas terapias basadas en AMPs que se encuentran en el mercado, como la daptomicina que tiene como diana las bacterias Gram+, o en estudios clínicos y preclínicos, como MX-226 y HB-107 entre otros muchos, para el tratamiento de infecciones dermatológicas y

cicatrización de heridas (Boparai y Sharma, 2020). Dado que poseen un mecanismo de acción diferente a los antibióticos convencionales, los AMPs se convierten en buenos candidatos para contrarrestar el desarrollo de resistencias por parte de los patógenos. Además, pueden tener un efecto sinérgico cuando se administran junto con antibióticos de uso común (Kang *et al.*, 2017).

El reciente desarrollo de nuevos agentes terapéuticos dirigidos a vías moleculares específicas involucradas en la iniciación y la progresión del cáncer ha puesto a los AMPs en el foco del diseño de nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer, debido a su eficacia y selectividad contra las células tumorales a bajas concentraciones (Boparai y Sharma, 2020). Los péptidos antimicrobianos bombinina H2 y temporina A han demostrado características antineoplásicas en estudios preclínicos para el tratamiento del cáncer de pulmón (Swithenbank *et al.*, 2020). Muchos estudios sugieren que los AMPs pueden mostrar propiedades quimiosensibilizantes y que, por lo tanto, el uso de AMPs combinados con terapias convencionales, como la radioterapia y la quimioterapia, puede aumentar la eficacia de estas, siendo necesaria para el tratamiento una menor concentración y mejorando así la calidad de vida de los pacientes (Jafari *et al.*, 2022).

Sin embargo, existen algunas limitaciones para el uso clínico de los AMPs como la poca estabilidad fisicoquímica, la susceptibilidad a la degradación proteolítica y una vida media corta en circulación por el torrente sanguíneo. Para aumentar la biodisponibilidad y la estabilidad de los fármacos basados en AMPs, se están desarrollando formulaciones con distintos materiales como polímeros, nanopartículas, liposomas e hidrogeles, entre otros (Wang *et al.*, 2021a). La conjugación de AMPs con polímeros ofrece la oportunidad de mejorar la utilidad terapéutica de estos, ya que se pueden diseñar de manera que se optimice la tasa de liberación y se modulen las respuestas inmunitarias del huésped (Cui *et al.*, 2021).

En la actualidad hay algunos AMPs en distintas fases de ensayos clínicos, como la Bacitracina, Pexiganan, Omiganan, LL-37, LTX-109 y Brilacidina (Moretta *et al.*, 2021). En la Tabla 5 se encuentra un listado de AMPs naturales empleados en clínica.

Tabla 5. AMPs naturales de uso clínico. Tomada de Moretta *et al.* (2021)

Péptido	Origen	Mecanismo de acción	Indicaciones
Nisina	Bacteria (<i>Lactococcus lactis</i>)	Despolarización de la membrana	Infecciones bacterianas
Gramicidina	Bacteria (<i>Brevibacillus brevis</i>)	Despolarización de la membrana/Lisis	Conjuntivitis bacteriana
Melitina	Insecto (<i>Apis mellifera</i>)	Disrupción de la membrana	Aplicaciones antiinflamatorias
Daptomicina	Bacteria (<i>Streptomyces roseosporus</i>)	Despolarización de la membrana/Lisis	Infecciones de la piel
Lactoferricina	Mamíferos	Despolarización de la membrana	Aplicaciones antiinflamatorias
Histatina	Humanos	Inhibición de la respiración	Infecciones víricas

6. Actividad antimicrobiana y antiproliferativa del péptido TcPaSK

En trabajos previos del grupo de investigación, estudiando la respuesta inmune del insecto coleóptero *Tribolium castaneum* tras intoxicación con la toxina Cry3Aa de *Bacillus thuringiensis*, se identificó un fragmento peptídico de la defensina 3 de este insecto (TcPaSK) con actividad antimicrobiana contra la bacteria *Staphylococcus aureus* (Robles-Fort *et al.*, 2021).

En la Tabla 6 se muestra la secuencia de los 31 aminoácidos del péptido TcPaSK y las predicciones teóricas de las propiedades fisicoquímicas y estructurales del mismo. La estructura primaria del péptido comparte similitud con secuencias de AMPs de estructura $\alpha\beta$, conteniendo los motivos típicos de estos péptidos, confirmados en la predicción de estructura secundaria de la molécula: secuencia N-terminal, seguida de una secuencia α -hélice y dos hebras β antiparalelas estabilizadas por puentes disulfuro entre cisteínas (Figura 16).

Tabla 6. Predicciones teóricas de los parámetros fisicoquímicos del péptido TcPaSK. Tomada de Robles-Fort *et al.* (2021).

TcPaSK	
Secuencia	KVNHAAACAHLKRLRGYCNKRRICVCRN 31 residuos: residuos hidrofóbicos en rojo; G en azul; residuos cargados positivamente en magenta
MW (Daltons)	3543,30
Carga neta (pH=7)	+9
Punto isoelectrico (PI)	10,6
Ratio Hidrofóbico (HR)	45%
Hidrofobicidad (H)	0,225
GRAVY	-0,545

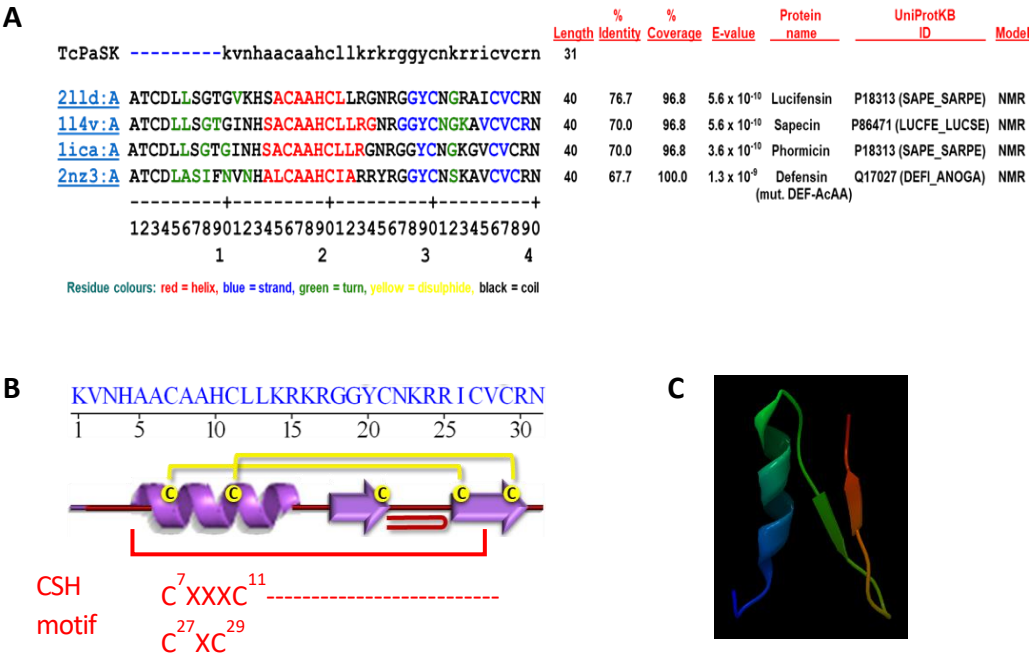


Figura 16. Estructura del péptido TcPaSK. (A) Alineamiento FASTA por homología de secuencia de AMPs tipo $\alpha\beta$ con el péptido TcPaSK. (B) Representación esquemática de la estructura secundaria del péptido. La hélice α está representada por una cinta espiral morada y las hebras β por flechas moradas. Se indican los diferentes motivos estructurales, incluida una horquilla β (representada por $\rhd$) y un motivo CHS. Los puentes disulfuro se representan como líneas de conexión amarillas. (C) Predicción de la estructura 3D del péptido, utilizando como modelo molecular la cadena A de Lucifensina (código PDB 2LLD). Detalles en Robles-Fort *et al.* (2021).

El péptido TcPaSK muestra actividad antibacteriana contra *S. aureus* en un rango de MIC de 16 a 32 $\mu\text{g/mL}$, y a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ su actividad es un 33% mayor que la de la defensina humana hBD-3 (Robles-Fort *et al.*, 2021). Esta actividad antimicrobiana se correlaciona con la capacidad del péptido para disrumpir la membrana celular bacteriana (Figura 17).

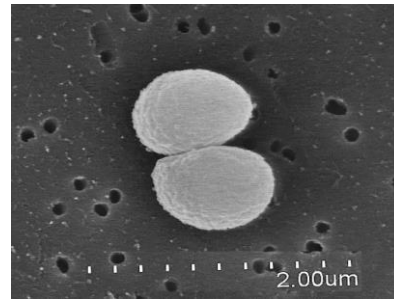
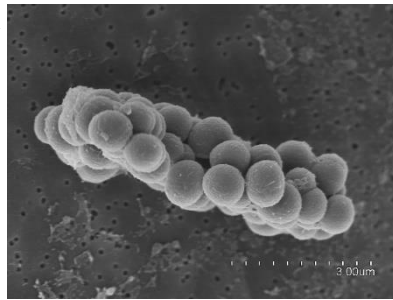
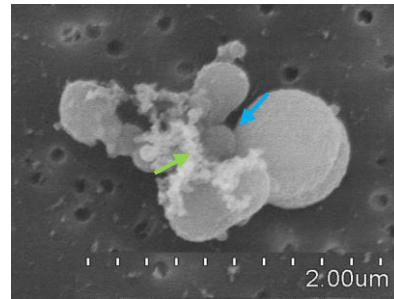
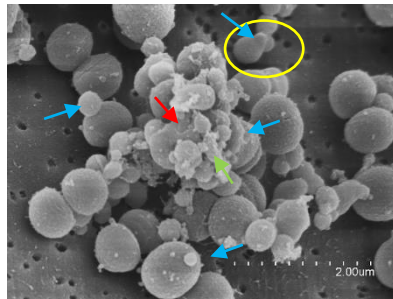
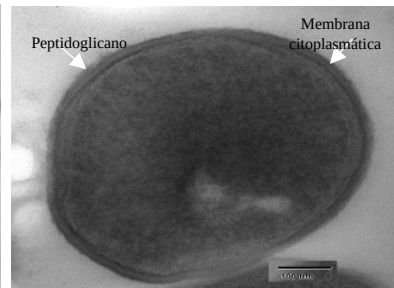
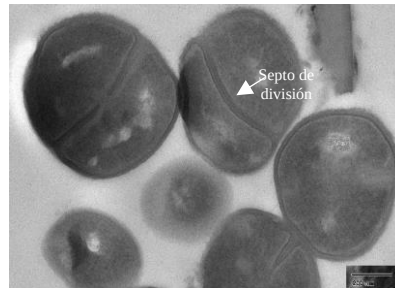
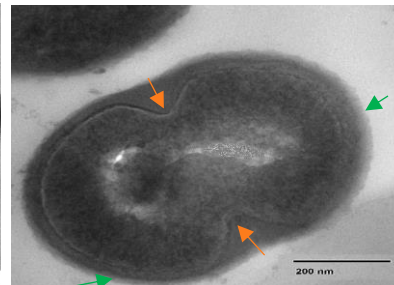
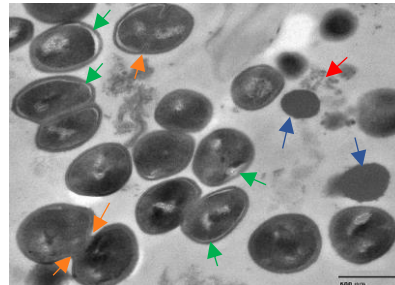
A*S. aureus* sin
tratamiento*S. aureus*
tratada con
TcPaSK**B***S. aureus* sin
tratamiento*S. aureus*
tratada con
TcPaSK

Figura 17. Células de *S. aureus* tratadas con el péptido TcPaSK. (A) Imágenes de análisis SEM. Las flechas rojas indican rupturas y protuberancias en la membrana, las flechas verdes detritos citoplásmicos y las flechas azules ampollas y células fantasma. El círculo amarillo resalta una célula en división. **(B) Imágenes de análisis TEM.** Las flechas rojas indican restos citoplásmicos y de la pared celular; las flechas verdes distorsiones celulares, desprendimiento de membranas y adelgazamiento de peptidoglicano; las flechas azul claro indican lisis celular; las flechas amarillas indican vacuolización citoplasmática; las flechas naranjas indican inhibición del tabique de división; y las flechas azul oscuro indican estructuras altamente electrodensas que solo aparecen en células tratadas con el péptido TcPaSK. Detalles en Robles-Fort *et al.* (2021).

En células de *S. aureus* uno de los efectos del péptido es la inhibición de la división del septo, impidiendo la división celular y en células tumorales de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 también es capaz de bloquear la progresión del ciclo celular, deteniéndolo en fase G1-S (Figura 18) (Robles-Fort *et al.*, 2021).

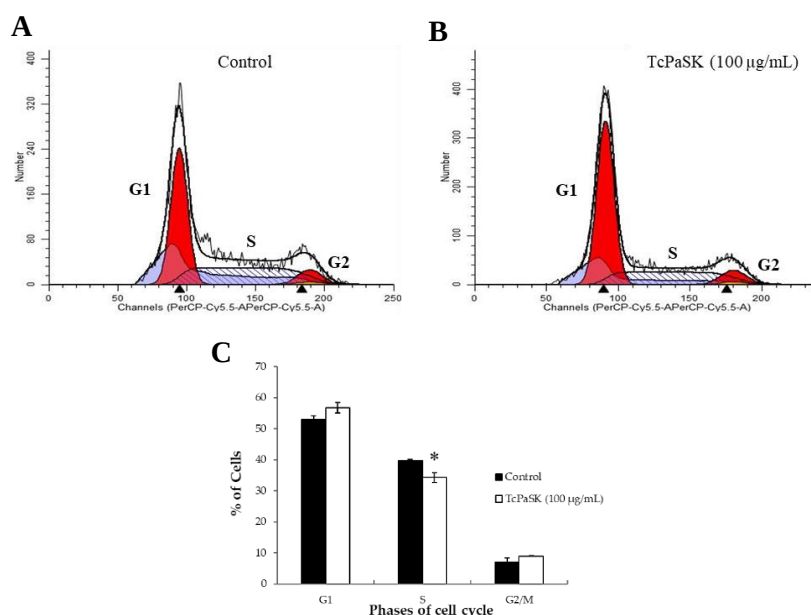


Figura 18. Actividad antiproliferativa del péptido TcPaSK contra células tumorales MDA-MB-231. A) Control (H₂O). B) TcPaSK (100 µg/mL). C) Gráfica del porcentaje de células observado en cada fase del ciclo celular. Detalles en Robles-Fort *et al.* (2021).

El análisis proteómico mediante SWATH en células MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK confirmó la alteración de los niveles de proteínas implicadas en el crecimiento celular y la progresión tumoral. Se encontraron catorce proteínas reguladas negativamente y tres proteínas reguladas positivamente en las células MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK, en comparación con las células de control. Varias de las proteínas cuyos niveles están alterados se han correlacionado específicamente con la progresión de la enfermedad y el pronóstico adverso, como ocurre con: *La-related protein 1* (LARP1) en los cánceres de cuello uterino y de pulmón de células no pequeñas; *density-regulated protein* (DENR) en carcinoma hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de riñón, cáncer de laringe y cáncer de pulmón; factor de *splicing* U2AF2 en cáncer de próstata; proteína adenilato quinasa 2 (AK2) en adenocarcinoma pulmonar; subunidad catalítica delta de la polimerasa de ADN (POLD1) en cáncer de mama; endofilina A en cánceres de mama de tipo basal; tiorredoxina reductasa (TRXR1) en carcinoma hepatocelular; *matrix metalloproteinase 14* (MMP14) en cáncer colorrectal; y glutatión peroxidasa 1 (GPX1) en carcinoma oral de células escamosas. En once de las proteínas cuyos niveles se redujeron tras el tratamiento con el péptido se ha descrito que su disminución provoca inhibición del crecimiento celular y/o invasión tumoral, bloqueo del ciclo celular o inducción de apoptosis. Las proteínas ASNA1 ATPasa, UROD, LARP1 y TM9SF4, cuyos niveles se redujeron en células tratadas con el péptido TcPaSK, se ha demostrado que sensibilizan a las células cancerosas a la radioterapia y/o fármacos quimioterapéuticos convencionales cuando su expresión se encuentra disminuida (revisado en Robles-Fort *et al.*, 2021).

Objetivos

En estudios previos de nuestro grupo de investigación hemos demostrado que el péptido TcPaSK, derivado del insecto coleóptero *T. castaneum*, posee actividad antimicrobiana frente al patógeno humano *S. aureus* y actividad antiproliferativa en células MDA-MB-231 de cáncer de mama triple negativo (TNBC). Los resultados del análisis proteómico masivo de células TNBC, tras el tratamiento con una dosis subcitotóxica de dicho péptido, permitió identificar niveles reducidos de las proteínas ASNA1, Uroporfirinógeno descarboxilasa, LARP1 y TM9SF4, de las que se ha descrito en la literatura que la disminución de su expresión incrementa la sensibilidad de diferentes tipos de células tumorales a agentes quimioterapéuticos convencionales. Actualmente, la quimioterapia es la única opción de tratamiento sistémico contra TNBC y el procedimiento clínico más empleado en tumores NSCLC en estado metastásico. Sin embargo, la alta toxicidad de los compuestos empleados, también para las células sanas, y la adquisición de resistencia por parte de las células tumorales limitan la eficacia del tratamiento y esto ha impulsado el desarrollo de nuevos fármacos, que ellos mismos o en combinación con los ya existentes puedan ser eficaces para el tratamiento de este tipo de tumores metastásicos. Los péptidos antimicrobianos han mostrado un gran potencial en este campo, ya que pueden penetrar eficientemente en las células tumorales, lo que les permite ejercer su actividad intrínseca anticancerígena o en sinergia con otros agentes terapéuticos.

El objetivo de la presente Tesis Doctoral es caracterizar los efectos del péptido TcPaSK sobre la viabilidad y la función celular en líneas celulares de cáncer metastásico y explorar el potencial del péptido para el tratamiento eficaz del cáncer en terapias de combinación con agentes quimioterapéuticos y para su uso en formulaciones de conjugados con biopolímeros. Para ello, planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización de la actividad anticancerígena del péptido TcPaSK en líneas celulares tumorales de cáncer de mama TNBC (MDA-MB-231) y de cáncer de pulmón NSCLC (A549).
- Análisis del reconocimiento celular, patrón de internalización y destino celular del péptido TcPaSK en las líneas celulares MDA-MB-231 y A549.
- Estudio del efecto del péptido TcPaSK en la expresión de factores de transcripción y marcadores moleculares implicados en la transición epitelio-mesénquima en las líneas celulares MDA-MB-231 y A549.
- Evaluación en las líneas celulares MDA-MB-231 y A549 del efecto citotóxico de tratamientos combinados del péptido TcPaSK con agentes quimioterapéuticos que presentan diferente modo de acción.
- Formulación de polímeros terapéuticos del péptido TcPaSK y validación de su eficacia, solo y en combinación con doxorrubicina, en la línea celular MDA-MB-231.

Material y métodos

1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Las células de cáncer de mama triple negativo humano MDA-MB-231 fueron cedidas por el Dr. S. Drover (Memorial University of Newfoundland) o adquiridas en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), y las células de carcinoma mamario de ratón 4T1 fueron proporcionadas por el Dr. D. Waisman (Dalhousie University). Las células se cultivaron en medio DMEM complementado con 10 % de FBS, 100 U/mL de penicilina, 100 g/mL estreptomicina, L-glutamina 2 mM y HEPES 5 mM (pH 7,4), y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con 5-10% CO₂.

Las células epiteliales mamarias de ratón HC11 fueron suministradas por el Dr. H.S. Ro (Dalhousie University), se cultivaron en medio DMEM complementado con 10 % de FBS 100 U/mL de penicilina y 100 g/mL estreptomicina y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de 10% CO₂.

Las células MDA-MB-231 transfectadas con luciferasa, utilizadas para ensayos de viabilidad celular con los diferentes compuestos quimioterapéuticos y conjugados del péptido TcPaSK realizados en colaboración con el grupo de la Dr. Vicent (CIPF), se cultivaron en medio DMEM/F-12 suplementado con 10% FBS y 20% puromicina, y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con 5% CO₂.

Las células HUVEC, cedidas por el Dr. Ortega (Universitat de València), se cultivaron en medio ECGM2 suplementado con 2% FCS, EGF (5 ng/mL), BFGF (10 ng/mL), IGF (20 ng/mL), VEGF (0,5 ng/mL), ácido ascórbico (1 µg/mL), heparina (22,5 µg/mL) e hidrocortisona (0,2 µg/mL), y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con 5% CO₂.

La línea celular humana de cáncer de pulmón de células no pequeñas A549 se adquirió en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y se cultivó en medio DMEM suplementado con 10% FBS, 1% penicilina, 1% estreptomicina y 0,1% fungizona. Se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con 5% CO₂.

2. Péptidos y polímeros utilizados

El péptido sintético TcPaSK (KVNHAACAAHCLLKRRKRGGYCNKRRICVCRN) y su conjugado con fluoresceína-5-isotiocianato (TcPaSK-FITC) se adquirieron en GenScript Co. con un grado de pureza del 95,8% y 96,1%, respectivamente.

El polímero de doxorubicina PGA-HydDox (carga = 11,33 % peso de doxorubicina) fue cedido por el Laboratorio de Polímeros Terapéuticos del CIPF.

Los conjugados del péptido TcPaSK, PGA-PD-TcPaSK, PGA-Mal-TcPaSK, Psar-PD-TcPaSK y Psar-NHS-TcPaSK (carga = 10,5; 21; 25,6 y 7,9 % peso de TcPaSK, respectivamente) se sintetizaron en el Laboratorio de Polímeros Terapéuticos del CIPF.

3. Ensayos de viabilidad celular MTS

Se utilizó el ensayo colorimétrico MTS para determinar el efecto sobre la viabilidad celular del péptido TcPaSK, de sus conjugados poliméricos (PGA-PD-TcPaSK, PGA-Mal-TcPaSK, Psar-PD-TcPaSK y Psar-NHS-TcPaSK), y de las combinaciones con agentes quimioterapéuticos (doxorrubicina, cisplatino, paclitaxel, 5-fluorouracilo (Abcam), PGA-HydDox). Se sembraron células MDA-MB-231, 4T1, HC-11 y A549 en placas de 96 pocillos con una densidad de 5×10^3 o $7,5 \times 10^3$ células/pocillo y se incubaron toda la noche a 37 °C.

En los tratamientos con el péptido TcPaSK (rango de concentración ensayado de 0 - 1000 µg/mL) las células de epitelio mamario se incubaron durante 24 h a 37 °C y las células tumorales de pulmón A549 durante 72 h a 37 °C. En los tratamientos con los conjugados del péptido TcPaSK (rango de concentración ensayado de 0 - 200 µg/mL), tanto las células MDA-MB-231 como las A549 se incubaron durante 72 h a 37 °C. Se añadieron 10 µL/pocillo de una disolución 1:20 de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio] (MTS) (Promega) y metosulfato de feniazina (PMS) (Promega) y la mezcla se incubó durante 2 h a 37 °C. Se midió la absorbancia a 490 nm, utilizando un lector de microplacas (BMG-LABTECH o Tecan). La viabilidad de las células sometidas a los distintos tratamientos se expresó como porcentaje relativo a las células control, utilizando la fórmula $[100 \times T/C]$, donde T es la absorbancia de células tratadas y C la absorbancia de las células de control (tratadas con el medio con el que se realizó la dilución de los péptidos y de los compuestos ensayados).

En los tratamientos combinados del péptido TcPaSK con compuestos quimioterapéuticos, en las células MDA-MB-231 se utilizó una concentración del péptido TcPaSK de 100 µg/mL y en las células A549 de 200 µg/mL. En estos ensayos, el rango de concentraciones de los compuestos quimioterapéuticos utilizados fue el siguiente: doxorrubicina [0 – 4 µM], cisplatino [0 – 100 µM], paclitaxel [0–100 µM], 5-fluorouracilo [0 – 1000 µM] y el polímero PGA-HydDox [0 – 1,6 µg/mL doxorrubicina equivalente].

En los tratamientos del conjugado del péptido TcPaSK con polisarcosina en combinación con doxorrubicina o el polímero PGA-HydDox, las células MDA-MB-231 se trataron con Psar-NHS-TcPaSK (100 µg/mL), y doxorrubicina (rango de concentración 0 - 1 µM) o PGA-HydDox (rango de concentración 0 - 1,6 µg/mL doxorrubicina equivalente).

Todos los compuestos quimioterapéuticos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) excepto el cisplatino que se disolvió en NaCl 0,9% con sonicación. El polímero PGA-HydDox y los conjugados del péptido TcPaSK se disolvieron en medio de cultivo.

4. Ensayos de viabilidad celular LDH

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la interconversión de piruvato y lactato. Esta enzima se utiliza para evaluar la toxicidad y el daño provocado por diferentes

compuestos, ya que las células liberan LDH al medio cuando la estabilidad de la membrana se ve comprometida y hay actividad citolítica.

Las células MDA-MB-231 se sembraron en una placa de 96 pocillos con una densidad celular de $7,5 \times 10^3$ células/pocillo y se incubaron toda la noche a 37 °C. Se añadió el péptido TcPaSK (50, 100, 200 y 350 µg/mL) o medio de cultivo (control) y las células se incubaron a 37 °C durante 72 h. Transcurrido ese tiempo, se recogió el medio de los pocillos correspondiente a las cuatro réplicas técnicas de cada concentración y se cuantificó la actividad LDH con el kit *Lactate Dehydrogenase Activity Assay* (Sigma-Aldrich), mediante colorimetría a una longitud de onda de 450 nm con el lector de placas CLARIOstar (BMG-LABTECH), siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad LDH se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad LDH} = \left(\frac{B}{\text{tiempo de la reacción} \times V} \right) \times \text{factor de dilución de la muestra}$$

Donde B es la cantidad de NADH (nmol) generado en el tiempo de reacción ($T_{\text{inicial}} - T_{\text{final}}$) (min), y V es el volumen de muestra (mL). El porcentaje de viabilidad de las células tratadas con TcPaSK se expresó como porcentaje relativo a las células control ($100 \times T/C$, donde T es la actividad LDH de células tratadas con el péptido TcPaSK y C la actividad de LDH de las células de control no tratadas).

5. Ensayos de proliferación celular Oregon Green 488

Se sembraron células MDA-MB-231 en medio sin suero en una placa de 6 pocillos y se incubaron toda la noche a 37 °C. Las células adherentes ($1,5 \times 10^4$ células/pocillo) se tiñeron con el colorante fluorescente Oregon Green 488 (Life Technologies Inc.) (1,25 µM) utilizado para estimar el número de divisiones celulares, en medio DMEM sin suero. Tras incubación durante 45 min a 37 °C, las células de uno de los pocillos se fijaron con paraformaldehído 1 % (p/v), para establecer la fluorescencia de referencia, y el resto de las células se trataron durante 72 h con péptido TcPaSK (200 µg/mL) o H₂O (control). Posteriormente, se fijaron las células y analizaron los resultados con el citómetro de flujo FACSCalibur y el software Cell Quest™ (versión 3.3; BD Biosciences). El número de divisiones celulares (n) se calculó utilizando la siguiente fórmula en la que MF es la fluorescencia media:

$$MF_{\text{referencia}} = 2^n \times MF_{\text{tratamiento}}$$

6. Ensayos de adhesión celular

Los ensayos se llevaron a cabo con células MDA-MB-231 o A549 (8×10^4 células/pocillo) resuspendidas en una solución HBSS (*Hank's balanced salt solution*: HEPES 50 mM, BSA 1 mg/mL, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM, pH 7,4). Las células MDA-MB-

231, previamente incubadas durante 30 min con el péptido RGD (Sigma-Aldrich) (100 µg/mL), se trataron con el péptido TcPaSK (100 µg/mL) durante 15 min o 1 h a temperatura ambiente, se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con gelatina 2% (Sigma-Aldrich), y se incubaron a 37 °C durante 2 h. Las células A549, previamente incubadas durante 30 min con el anticuerpo anti-integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ (Proteintech®) (20 µg/mL), se trataron con el péptido TcPaSK (200 µg/mL) durante 30 min a temperatura ambiente, se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con vitronectina 5 µg/mL (Sigma-Aldrich), y se incubaron a 37 °C durante 2 h.

Las células MDA-MB-231 o A549 no adherentes se eliminaron con PBS (NaCl 137 mM, KH_2PO_4 1,8 mM y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, pH 7,4) y las células adheridas se tiñeron con una solución de cristal violeta 0,5 % en metanol 25 %, durante 20 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de los pocillos con PBS y se dejaron secar al aire sin tapar entre 16 y 24 h. Finalmente, se añadieron 200 µL de metanol y, tras una incubación de 20 min a temperatura ambiente, se leyeron los resultados por colorimetría a 570 nm con un lector de microplacas (Tecan). Los resultados se expresan como porcentaje de células adherentes relativo a las células no tratadas.

7. Ensayo de cicatrización de herida

Las células MDA-MB-231 y A549 se sembraron en placas de 24 pocillos con una densidad de 6×10^4 células/pocillo y se incubaron a 37 °C durante 48 h hasta obtener un 95% de confluencia. Se abrió una brecha física (“herida”) en la monocapa de células, empleando una punta de pipeta de 200 µL. Después de retirar con PBS las células desprendidas, se añadieron los tratamientos, péptido TcPaSK (100 µg/mL en MDA-MB-231 y 200 µg/mL en A549) o medio en los controles. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y las heridas se fotografiaron cada 2 h durante 24 h con el microscopio óptico invertido ZEISS Axio Vert equipado con cámara integrada.

8. Ensayos *in vitro* de migración e invasión celular

Los ensayos de migración e invasión celular se realizaron con el kit *CytoSelect™ 24-Well Cell Migration and Invasion Assay Combo Kit (8 µm, fluorometric format)* (Cell Biolabs, Inc.) siguiendo las especificaciones del fabricante, utilizando insertos con membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 8 µm o insertos recubiertos con membrana basal, para analizar las propiedades migratorias o invasivas de células. Se prepararon suspensiones celulares de MDA-MB-231 y A549 con 5×10^5 células/mL que se trataron con péptido TcPaSK (100 µg/mL en MDA-MB-231 y 200 µg/mL en A549) o medio sin suero para los correspondientes controles, y se suplementó o no con TGF- $\beta 1$ (Humankine®) 5 ng/mL (para los ensayos de migración con inductor). Se depositaron 300 µL de las suspensiones celulares en los insertos, ubicados en pocillos con 500 µL de medio con FBS 10% como quimioatrayente. Se incubaron a 37 °C durante 6 h

(células MDA-MB-231) o 24 h (células A549) para los ensayos de migración y 24 h (células MDA-MB-231) o 48 h (células A549) para los ensayos de invasión. Finalmente, las células que traspasaron la membrana se lisaron y tiñeron con el tampón de lisis/CyQuant® GR Dye y la fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación/emisión 480/520 nm en un lector de microplacas (Tecan).

9. Ensayos de angiogénesis

Los ensayos de formación de túbulos utilizados para comprobar el efecto antiangiogénico del péptido TcPaSK se llevaron a cabo con el kit *Endothelial Tube Formation Assay (In vitro Angiogenesis)* (Cell Biolabs, Inc.), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se sembraron las células HUVEC a una densidad de $1,5 \times 10^4$ células/pocillo en una placa de 96 pocillos recubiertos previamente con 50 μ L de gel ECM (matriz extracelular). Las células endoteliales se trataron con el péptido TcPaSK (100 μ g/mL) o con medio (controles) y se incubaron a 37 °C durante 4 h. Los pocillos se examinaron y fotografiaron con el microscopio óptico invertido ZEISS Axio Vert equipado con cámara integrada.

10. Microscopía confocal

En los ensayos de microscopía confocal se utilizaron células MDA-MB-231 y A549 sembradas en cámaras de 8 pocillos *μ -Slide 8 Well high* Ibidi®, pretratadas con ibiTreat o con poli-L-lisina a una densidad celular de 6×10^4 células/pocillo.

Para observar la interacción del péptido TcPaSK con la membrana celular, se utilizó el conjugado del péptido con el fluorocromo fluoresceína 5-isotiocianato (FITC) (longitud de onda de excitación: 488 nm; longitud de onda de emisión: 520 nm). Las células MDA-MB-231 y A549 se trataron con TcPaSK-FITC (25 μ g/mL) o con medio (control) y se incubaron a 37 °C durante 15 min y 1 h.

En los ensayos de competencia en las células MDA-MB-231, previamente al tratamiento durante 15 min o 1h con TcPaSK-FITC (25 μ g/mL) o con medio (control), las células se incubaron a 37 °C con péptido RGD (1 mg/ml) o anticuerpo anti-integrina $\alpha\beta 3$ (20 μ g/mL) durante 30 min. En los ensayos de competencia en las células A549, previamente al tratamiento durante 15 min o 1h con TcPaSK-FITC (25 μ g/mL) o con medio (control), las células se incubaron a 37 °C con anticuerpo anti-integrina $\alpha\beta 3$ (20 μ g/mL) durante 30 min.

Para la detección de daño en la membrana de las células MDA-MB-231 y A549 tratadas con el péptido TcPaSK (25 μ g/mL), se utilizó la tinción con yoduro de propidio (IP) (Sigma Aldrich) (longitud de onda de excitación: 559 nm; longitud de onda de emisión: 619 nm). Las células se incubaron con una dilución 1:1000 de IP durante 10 min.

La identificación de lisosomas en las células MDA-MB-231 y A549 tratadas con el péptido TcPaSK (25 μ g/mL) se llevó a cabo tiñendo las células durante 30 min con LysoTracker™

Red DND-99 (Invitrogen™) (longitud de onda de excitación: 559 nm; longitud de onda de emisión: 603 nm).

Para observar la localización celular de doxorubicina en células tratadas con el péptido TcPaSK, células MDA-MB-231 se incubaron durante 1 h a 37° C con doxorubicina (0,20 μ M) o con doxorubicina (0,20 μ M) en combinación con TcPaSK-FITC (25 μ g/mL). La autofluorescencia de doxorubicina se detectó a una longitud de onda de emisión de 590 nm (longitud de onda de excitación: 480 nm).

En todos los experimentos, los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst 33342 (Sigma Aldrich) (longitud de onda de excitación: 405 nm; longitud de onda de emisión: 455 nm). Todas las imágenes se obtuvieron con el microscopio confocal Olympus FV1000 con aceite de inmersión en el objetivo 60x.

11. Citometría de flujo

Para los ensayos de doble tinción Anexina V-FITC/IP, las células MDA-MB-231 se sembraron a una densidad de 3×10^5 células/pocillo en una placa de 12 pocillos y se incubaron a 37 °C toda la noche. Las células se trataron durante 24 h con el péptido TcPaSK (200 μ g/mL) o con medio (control), se disgregaron mediante tripsinización y se siguió el protocolo del kit *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Pharmingen™), de acuerdo las especificaciones del fabricante. La tinción con Anexina V-FITC se usa típicamente junto con un colorante vital como el IP permitiendo diferenciar entre células viables intactas (FITC negativo, IP negativo), células apoptóticas tempranas (FITC positivo, IP negativo), células apoptóticas tardías (FITC positivo, IP positivo) y células necróticas (FITC negativo, IP positivo). Las células viables con membranas intactas excluyen al IP, mientras que las membranas de las células muertas y dañadas son permeables a este. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo con el equipo BD LSR-Fortessa (Beckton Dickinson).

Para el análisis del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mm}$), se sembraron células MDA-MB-231 a una densidad de 6×10^4 células/pocillo en una placa de 24 pocillos, se incubaron a 37 °C toda la noche y se trataron con péptido TcPaSK (100 μ g/mL) durante 24, 48 y 72 h. Después del tratamiento, se realizó un lavado con PBS y se añadió tripsina-EDTA 0,25 % (100 μ L) durante 2 min a 37 °C. Una vez neutralizada la tripsina con medio FBS 10%, se centrifugaron las células a 500 x g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento de células en 100 μ L de yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC₆) 10 nM (Sigma Aldrich). Después de una incubación de 30 min a 37 °C, se añadieron 900 μ L de medio sin suero y se centrifugó de nuevo a 500 x g durante 5 min. Seguidamente, se descartó el sobrenadante y se realizó un nuevo lavado con PBS y centrifugación a 500 x g durante 5 min. Finalmente, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 500 μ L de PBS y se detectó la fluorescencia de las células separadas mediante citometría de flujo con el equipo BD LSR-

Fortessa (Beckton Dickinson). El DiOC6 es un colorante verde fluorescente (longitud de onda de excitación: 482 nm; longitud de onda de emisión: 504 nm) de carácter lipofílico y catiónico que es permeable a las células y se acumula en las mitocondrias, lo cual permite utilizarlo como indicador de integridad mitocondrial relacionando la disminución de fluorescencia con la pérdida de potencial transmembrana e indirectamente con señalización pro-apoptótica.

12. Extracción de ARN, síntesis de ADNc, RT-PCR y RT-qPCR

El ARN total de las células MDA-MB-231 y A549 se aisló usando el kit *Nucleospin XS RNA kit* (Macherey Nachel), siguiendo el protocolo del fabricante. La calidad de la extracción de ARN se comprobó mediante electroforesis en un gel de agarosa/TAE 1%, y se evaluó su pureza y cantidad a partir de las absorbancias a 260 nm y 280 nm, obtenidas en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

La síntesis del ADNc se llevó a cabo a partir de 500 ng de ARN total utilizando el kit *PrimeScript™ RT Reagent* (Takara), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La retrotranscripción de miARNs se realizó a partir 1 µg de ARN total, previa poliadenilación con *E. coli* poly(A) polimerasa (New England Biolabs).

Para la amplificación del transcrito pri-miRNA200a que codifica para miR200a y miR200b se realizó una RT-PCR en la que se utilizaron 10 ng de ADNc junto con cebadores específicos para el transcrito, diseñados con la herramienta Primer-Blast de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Tabla 7) y la polimerasa TaKaRa Ex Taq® DNA Polymerase. Las condiciones de los ciclos de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización a 95 °C durante 5 s, hibridación y elongación a 60 °C durante 30 s, en un total de 40 ciclos. El producto amplificado se detectó mediante electroforesis en gel de agarosa 2%.

Los niveles de expresión de genes y miARNs se analizaron mediante RT-qPCR usando el kit *SYBR Green PCR Mix* (Takara), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador “StepOnePlus Real-Time PCR system” (Applied Biosystems), aplicándose los siguientes ciclos de tiempo y temperatura: 95°C durante 30 s para activar la polimerasa, desnaturalización a 95 °C durante 5 s, e hibridación y elongación a 60 °C durante 30 s, en un total de 40 ciclos. Los cebadores para la amplificación de los genes se diseñaron con la herramienta Primer-Blast de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Tabla 7) y los cebadores para la amplificación de los miARN se diseñaron según se propone en Balcells *et al.* (2011) (Tabla 8). Para cada grupo, se analizaron tres réplicas biológicas, realizándose 3 réplicas técnicas de cada una de ellas y normalizándose los genes con los datos de expresión del gen que codifica para la proteína ribosomal 18S en el caso de los genes y con el gen U6 en el caso de los miARNs. El análisis de datos se llevó a cabo con el programa LinRegPCR (Ruijter *et al.*, 2009) y se aplicó el test estadístico *t-Student* ($p < 0.05$) para analizar las diferencias de expresión entre grupos.

Tabla 7. Cebadores usados para analizar la expresión génica mediante RT-qPCR. Directo (Fw) y reverso (Rv).

Gen	Identificador NCBI	Cebadores
TM9SF4	NM_014742.3	Fw ACTCCTTTTCCCCTCTGCTG
		Rv GCAGTAAAGACCACGGCAAC
ASNA1	NM_004317.3	Fw AGCTGCCTGACGAGTTCTTC
		Rv TGCCGTGTCAAATACCACCA
UROD	NM_000374.4	Fw TTGTTGTACCCCAGGCACTG
		Rv AGGGTGATGGCTTGGAACAC
LARP1	NM_015315.4	Fw CAGAGCTGGATTTCCAAGAGG
		Rv CAGGGAATGGCAATGGCTTC
Snail	NM_005985.4	Fw TAGCGAGTGGTTCTTCTGCG
		Rv AGGGCTGCTGGAAGGTAAAC
Slug	NM_003068.5	Fw TCATCTTTGGGGCGAGTGAG
		Rv TTCAATGGCATGGGGGTCTG
Zeb1	NM_001128128.3	Fw AACTGCTGGGAGGATGACAC
		Rv GTCCTCTTCAGGTGCCTCAG
Zeb2	NM_014795.4	Fw CCTGGCACAACAACGAGATTC
		Rv ATTGCGGTCTGGATCGTGG
Vimentina	NM_003380.5	Fw AACTTAGGGGCGCTCTTGTC
		Rv GAGGGCTCCTAGCGGTTTAG
Fibronectina	NM_212482.4	Fw GATGAGGTGCACGTGTGTTG
		Rv GACGCTTGTGGAATGTGTCTG
E-Cadherina	NM_004360.5	Fw GGGGTTAAGCACAACAGCAAC
		Rv GGGTATTGGGGGCATCAGC
N-Cadherina	NM_001308176.2	Fw GTCAACTGCAACCGTGTCTG
		Rv GGCCTGAGCAGTGAATGTTG
Ocludina	NM_002538.4	Fw TGGAGGAAGTGGCTTTGGTAG
		Rv CGCGGCAATGAAACAAAAGG
Twist1	NM_000474.4	Fw TCAAGAGGTCGTGCCAATCAG
		Rv TGCAGGCCAGTTTGATCCC
RP18S	NM_022551.3	Fw GGATGTAAAGGATGGAAAATACA
		Rv TCCAGGTCTTCACGGAGCTTGTT
TmiR200a	XR_007065348.1	Fw TCGGGGAGGGTTGGATTTTC
		Rv GTGATCCCGGCGTGAAAAC
ESRP1	NM_001034915.3	Fw TTTATGGCTGCACAGAAGTGTC
		Rv ATGGCGGTGGGGATAAGC
CD44tot	NM_000610.4	Fw ACCTCCCAGTATGACACATATTGC
		Rv CACCTTCTTCGACTGTTGACTG
CD44s	NM_000610.4	Fw GGAGCAGCACTTCAGGAGG
		Rv GGAATGTGTCTTGGTCTCTGGTAG
CD44v5	NM_000610.4	Fw GCTTATGAAGGAACTGGAACCC
		Rv TGTGCTTGTAGAATGTGGGGTC
CD44v6	NM_000610.4	Fw GGCAACTCCTAGTAGTACAACGG
		Rv TGGGAGTCTTCTTTGGGTGTTTG
CD44v7	NM_000610.4	Fw CATACCAGCCATCCAATGCAAG
		Rv TCCTTCTTCTGCTTGATGACC
CD44v8	NM_000610.4	Fw TGGACTCCAGTCATAGTATAACGC
		Rv GGTCTGTCTGTCCAAATCTTC
CD44v9	NM_000610.4	Fw GCAGCAGAGTAATTCTCAGAGC
		Rv CTTGATGTCAGAGTAGAAGTTGTTGG
CD44v10	NM_000610.4	Fw CCTCTCATTACCCACACACGAAG
		Rv CTGCAGTAACTCCAAAGGACCC

Tabla 8. Cebadores usados para analizar la expresión de miARN mediante RT-qPCR. Directo (Fw) y reverso (Rv).

miARN	Identificador NCBI	Cebadores
hsa-miR200a	MIMAT0000682	Fw CGCAGTAACACTGTCTGGTAAC
		Rv CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTACATC
hsa-miR200b	MIMAT0000318	Fw CGCAGTAATACTGCCTGGTAAT
		Rv CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCTACT
hsa-miR200c	MIMAT0000617	Fw GCAGTAATACTGCCGGGTAATG
		Rv CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTACCT
U6	NR_004394.1	Fw CGCTTCGGCAGCACATATAC
		Rv ATTTGCGTGTTCATCCTTGCG

13. Extracción de proteínas y Western-blot

Las células MDA-MB-231 y A549 se sembraron en placas de 24 pocillos con una densidad celular de 6×10^4 células/pocillo y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Las células se trataron con el péptido TcPaSK (100 µg/mL en las células MDA-MB-231; 200 µg/mL en las células A549) o con medio (controles) y se incubaron a 37 °C durante 24 o 48 h en condiciones de normoxia (O₂ 21%) o hipoxia (O₂ 1%). Para realizar la extracción proteica, en primer lugar, se eliminó el medio del pocillo, se añadieron 100 µL de tampón RIPA 1x con inhibidor de proteasas *cOmplete™ Mini* (Roche) y se incubaron durante 5 min en hielo. Seguidamente, se rascó el fondo del pocillo con una punta de pipeta, se recogió todo el sobrenadante y se realizó otra incubación de 30 min en hielo. Posteriormente, se realizaron 3 pulsos de sonicación con ciclos de 0,5 s y una amplitud del 70% durante 5 s, manteniendo las muestras en hielo en el intervalo de 30 s entre pulsos. Finalmente, las muestras se incubaron otros 30 min en hielo y se centrifugaron a 10000 x g durante 10 min a 4 °C, quedando las proteínas en el sobrenadante.

La concentración de proteína total en las muestras se cuantificó a partir de la absorbancia a 280 nm medida en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham™ Hybond™ ECL™). Las membranas se bloquearon con leche desnatada en polvo o BSA 5% en TBST 0,1% (Tris 20 mM, NaCl 150 mM y Tween20® 0,1 % (w/v)) durante 1 h a temperatura ambiente y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 9), durante toda la noche a 4 °C. Después de lavar las membranas varias veces con TBST 0,1%, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario (IgG de conejo o IgG de ratón, dependiendo del origen del anticuerpo primario) conjugado con HRP (horseradish peroxidase). La proteína GAPDH se usó como proteína de referencia. Las membranas se revelaron con el reactivo quimioluminiscente *Western BLoT Hyper HRP Substrate* (Takara) en el equipo ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare).

Tabla 9. Anticuerpos utilizados en los ensayos Western-blot

Anticuerpos primarios	Concentración	Casa comercial
Anti-HIF-1 α	1:5000	Invitrogen
Anti-E-cad	1:1000	Cell Signaling
Anti-GADPH	1:5000	Abcam
Anticuerpos secundarios	Concentración	Casa comercial
Anti-IgG conejo HRP	1:20000	Sigma Aldrich
Anti-IgG ratón HRP	1:10000	Sigma Aldrich

14. Análisis estadístico

El análisis estadístico para los estudios en los que se compararon las medias de dos grupos se llevó a cabo mediante una prueba *t*-Student y las diferencias entre grupos experimentales se consideraron significativas cuando $p\text{-valor} \leq 0.05$. Para las comparaciones entre medias de varios grupos se realizó una prueba ANOVA aplicando el test de Tukey para comparaciones múltiples *post hoc*, con el software SPSS statistics.

Para los análisis *in silico* de correlación de la expresión del gen que codifica para la integrina $\beta 3$ y de la de los genes *Snai1*, *Zeb1*, *VIM* y *FN* en distintos tipos de carcinomas humanos se empleó la base de datos RNA-Seq (TCGA, <https://cancergenome.nih.gov>, Firehose Legacy), utilizando como coeficiente de correlación entre dos variables la *rho* de Spearman. La correlación positiva o negativa se consideró significativa cuando $p\text{-valor} \leq 0.05$.

Resultados y discusión

1. Caracterización de la actividad antitumoral del péptido TcPaSK en células MDA-MB-231

1.1 Ensayos de viabilidad celular *in vitro*

Algunos péptidos antimicrobianos, además de ser efectivos contra los microorganismos, también poseen actividad anticancerígena selectiva y se consideran candidatos prometedores en la terapia contra el cáncer, ya sea solos o en combinación con fármacos existentes (Felício *et al.*, 2017). En la presente tesis, para investigar la potencial actividad antiproliferativa del péptido antimicrobiano TcPaSK, se trataron con diferentes concentraciones de dicho péptido células de cáncer de mama triple negativo humano MDA-MB-231 y de carcinoma mamario de ratón 4T1, así como células epiteliales mamarias no tumorales de ratón HC11. En colaboración con el grupo del Dr. Hoskin (Dalhousie University, Canadá), se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular en los cultivos utilizando el método colorimétrico MTS. Se observó una disminución del número de células viables estadísticamente significativa y dependiente de la concentración del péptido, tanto en las células epiteliales mamarias tumorales, como en las no tumorales (Figura 19).

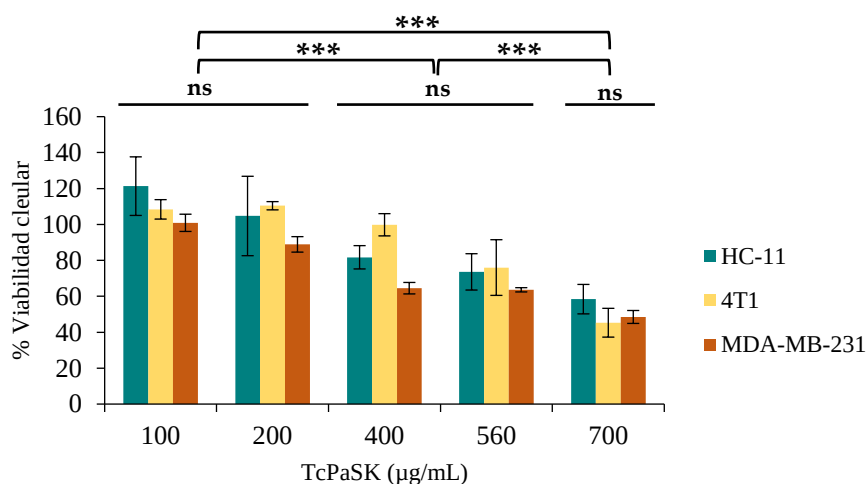


Figura 19. Efecto del péptido TcPaSK en la viabilidad de células tumorales y no tumorales de mamífero. Células tumorales de mama humanas MDA-MD-231, tumorales de mama de ratón 4T1 y no tumorales de ratón HC11 se cultivaron en presencia de medio, vehículo del péptido (H₂O) o diferentes concentraciones del péptido TcPaSK durante 24 h y se evaluó la viabilidad celular mediante un ensayo MTS. Los resultados se normalizaron con respecto a las células cultivadas con medio y el vehículo del péptido. Se representan las medias $\pm$ SE de al menos tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (ANOVA y test de Tukey, ns: no significativo, *** $p \leq 0,001$).

El ensayo MTS de viabilidad celular está basado en la utilización de un compuesto derivado de tetrazolio que se reduce en las células vivas para formar un producto coloreado soluble y es una de las técnicas más ampliamente utilizadas para evaluar el potencial anticancerígeno de un péptido antimicrobiano. En la base de datos “[Cancer PPD](#)”, empleando esta metodología o ensayos MTT (de fundamento similar a la MTS, aunque más laboriosa y menos sensible y precisa que la MTT), se recogen valores de citotoxicidad experimentalmente verificados de 441 péptidos anticancerígenos con un amplio rango de citotoxicidad *in vitro* en diferentes líneas celulares.

Aunque la citotoxicidad para las células sanas de los mamíferos puede suponer una limitación en el uso de AMPs en la terapia contra el cáncer, en dosis subcitotóxicas los AMPs han demostrado ser útiles como agentes quimiosensibilizadores en terapias combinadas con otros fármacos anticancerígenos convencionales (Hilchie *et al.*, 2011; Thundimadathil, 2012). Para explorar si el péptido TcPaSK podría usarse como agente anticancerígeno en el tratamiento de TNBC a concentraciones que resultan inocuas para las células no tumorales, evaluamos la actividad antiproliferativa del péptido TcPaSK a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$, la cual solo causó un efecto muy leve en la viabilidad de las células MDA-MB-231 y no tuvo ningún efecto sobre la línea celular no tumoral de ratón analizada (Figura 19). Para determinar el número de divisiones de las células, utilizamos el colorante fluorescente Oregon Green 488, reactivo que se une covalentemente al azar a grupos amino libres de las células, confiriéndoles una fluorescencia homogénea que se distribuye aproximadamente en partes iguales entre las células hijas tras cada división celular. La intensidad de fluorescencia final en relación a la fluorescencia inicial de las células proporciona información sobre el número de ciclos de división celular que han ocurrido. Se registró la fluorescencia media del vehículo de péptido (H_2O) y de las células MDA-MB-231 tratadas con TcPaSK, y los datos se normalizaron respecto de la fluorescencia de las células fijadas no proliferativas. Como se muestra en la Figura 20, la cantidad de divisiones celulares disminuyó significativamente con el tratamiento de las células MDA-MB-231 con el péptido TcPaSK (33%, $p\text{-valor} < 0,05$), en comparación con el mismo tipo celular tratado con H_2O (control). La actividad antiproliferativa que exhibe el péptido TcPaSK a la concentración subcitotóxica de 200 $\mu\text{g/mL}$ analizada está de acuerdo con nuestras observaciones previas de que el tratamiento con el péptido disminuye el número de células MDA-MB-231 que entran en fase S del ciclo celular (Robles-Fort *et al.*, 2021).

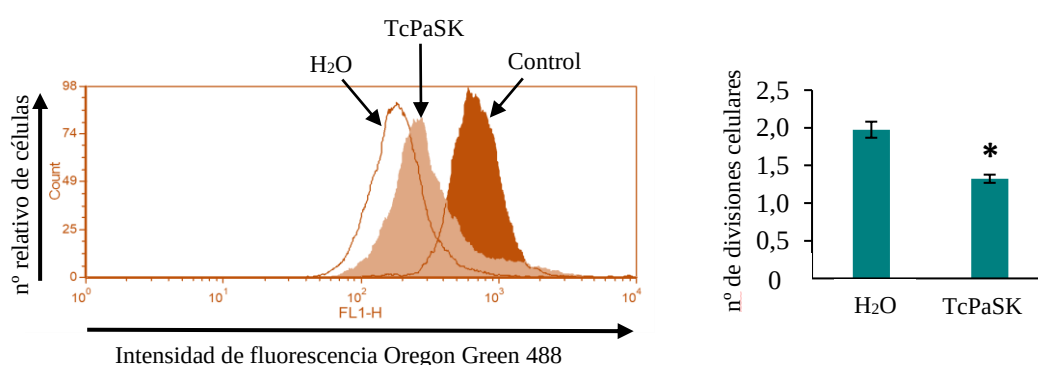


Figura 20. Efecto antiproliferativo del péptido TcPaSK en células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se tiñeron con el colorante fluorescente Oregon Green 488 y se cultivaron en presencia de medio (control), vehículo del péptido (agua) o péptido TcPaSK 200 $\mu\text{g/mL}$, durante 72 h. Tras la separación de las células mediante citometría de flujo se cuantificó la fluorescencia emitida por las mismas y se calculó el número de divisiones celulares. Se representan las medias $\pm$ SE de al menos tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Test *t-Student*, $*p \leq 0,05$).

1.2 Efecto del péptido TcPaSK sobre la integridad de las células MDA-MB-231

Para obtener una estima cuantitativa de la citotoxicidad del péptido TcPaSK frente a células MDA-MB-231, realizamos un ensayo LDH basado en la determinación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa citosólica liberada por las células cuando son dañadas por el péptido. Se observó una reducción estadísticamente significativa de la viabilidad celular a partir de una concentración del péptido de 200 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 21).

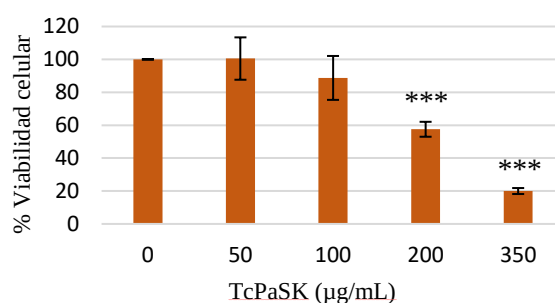


Figura 21. Actividad citotóxica del péptido TcPaSK frente a células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones del péptido TcPaSK durante 72 h y se evaluó la citotoxicidad mediante un ensayo LDH. Se representan las medias $\pm$ SE de al menos tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Test *t-Student*, *** $p \leq 0,001$).

Los resultados demuestran que el péptido TcPaSK, además de producir una alteración metabólica de las células MDA-MB-231, evidenciada en el ensayo MTS (Figura 19), posee capacidad citolítica sobre dichas células (Figura 21). Con las dos aproximaciones experimentales empleadas para analizar la citotoxicidad del péptido TcPaSK (ensayos MTS y LDH) se observa un efecto significativo sobre la viabilidad de las células tumorales a partir de 200 $\mu\text{g/mL}$.

Se ha descrito que los AMPs pueden actuar mediante mecanismos no membranolíticos o membranolíticos, de los cuales los segundos conducen a la formación de poros o micelas en la membrana celular. De entre los AMPs que presentan actividad anticancerígena (ACPs), los más ampliamente estudiados son los péptidos catiónicos membranolíticos (Gabernet *et al.*, 2016), particularmente los que contienen en su estructura una región α -helicoidal (Mohideen y Louis, 2021), como el péptido TcPaSK. Para la mayoría de ACPs no se ha establecido el mecanismo de acción antitumoral, algunos de ellos destruyen las células tumorales vía necrosis por lisis celular o formación de poros, mientras que otros inducen la muerte celular por apoptosis (Deslouches y Di, 2017). Se ha demostrado que para una alta actividad antitumoral es esencial una carga neta positiva en el ACP de alrededor de +7 (Yang *et al.*, 2004).

La muerte celular por necrosis se caracteriza principalmente por la pérdida de la integridad de la membrana celular y la liberación de los contenidos citosólicos al espacio extracelular (D'Arcy, 2019). El daño o ruptura en la membrana celular tras el tratamiento con el péptido que indican los resultados obtenidos en el ensayo LDH podría relacionarse con presencia de necrosis primaria o necrosis secundaria tras apoptosis. Por ello, llevamos a cabo la cuantificación de células apoptóticas y necróticas utilizando tinción con anexina V-FITC/IP en

células tratadas con el péptido y en los correspondientes controles de células sin tratar. La anexina V es una proteína capaz de unirse específicamente a la fosfatidilserina (PS, un fosfolípido que se transloca a la cara externa de la membrana en los procesos apoptóticos) y conjugada con el fluorocromo FITC nos permite detectar las células que se encuentran en apoptosis. Se utilizó IP como colorante vital, ya que este compuesto no es capaz de penetrar en las células con la membrana intacta. Las células necróticas serán aquellas que presentan captación de IP, pero en las que no se observa unión de la anexina V.

Se cuantificaron mediante citometría de flujo células MDA-MB-231 tratadas y no tratadas con el péptido TcPaSK y teñidas con anexina V-FITC/IP, observándose un aumento estadísticamente significativo en las células MDA-MB-231 que solo captaron IP y fueron tratadas con el péptido TcPaSK, con respecto a las células no tratadas (Figura 22A). Este resultado indica que el péptido induce muerte celular mediante necrosis y no por procesos apoptóticos en células MDA-MB-231.

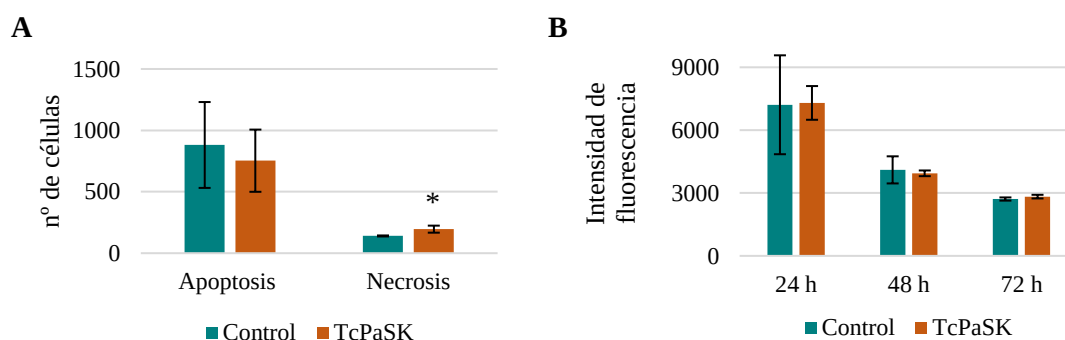


Figura 22. Ensayos de apoptosis/necrosis en células MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK. A) Cuantificación mediante citometría de flujo del número de células MDA-MB-231 en proceso de apoptosis/necrosis utilizando doble tinción Anexina V-FITC/IP. Las células MDA-MB-231 se trataron con el péptido TcPaSK (200 µg/mL) durante 24 h. B) Intensidad de fluorescencia de DiOC6 en células MDA-MB-231 tratadas y no tratadas con el péptido TcPaSK (100 µg/mL), durante 24, 48 y 72 h. En las gráficas se representan las medias $\pm$ SE de al menos tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Test *t-Student*, * $p \leq 0,05$).

La cationicidad que caracteriza a muchos AMPs les permite que, una vez internalizados, sean capaces de unirse a orgánulos intracelulares con membranas aniónicas como las mitocondrias y provocar su desestabilización. Dicha desestabilización se traduce en cambios en el potencial de membrana mitocondrial y conllevan la liberación de moléculas pro-apoptóticas. Como indicador de integridad mitocondrial, se utilizó yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC6) que es un colorante de fluorescencia verde, de carácter lipofílico y catiónico permeable a las células y que se acumula en las mitocondrias. La disminución de fluorescencia puede correlacionarse con la pérdida de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mm}$) e indirectamente con señalización pro-apoptótica.

Mediante citometría de flujo se realizó el recuento de las células que emitían fluorescencia correspondiente a DiOC6 en cada grupo (tratadas y sin tratar con el péptido TcPaSK). En ninguno de los tiempos de tratamiento analizados se observaron diferencias estadísticamente significativas en la intensidad de fluorescencia de las células MDA-MB-231 tratadas y no tratadas con TcPaSK (Figura 22B). Por tanto, al permanecer inalterado el $\Delta\Psi_{mm}$, podemos concluir que en las condiciones analizadas el péptido TcPaSK no afecta a la integridad mitocondrial y no desencadena procesos apoptóticos por esta vía.

Estos resultados están de acuerdo con los de los ensayos de apoptosis/necrosis realizados con la tinción anexina V-FITC/IP, en los que observamos que el péptido TcPaSK induce muerte celular mediante necrosis en células MDA-MB-231.

En células tumorales de mama, se ha descrito que el modo de acción de algunos péptidos como la maculatina 1.1, el NRC-03 y el NRC-07 implica daño en la membrana celular e inducción de necrosis, pero no alteración del potencial de membrana mitocondrial (Hilchie *et al.*, 2011; Sani *et al.*, 2015). Ting *et al.* (2016) han descrito que el péptido antimicrobiano catiónico TP4, derivado de *Oreochromis niloticus*, selectivamente mata las células MDA-MB-231 mediante inducción de necrosis, y en modelos *in vivo* con pez cebra asocian la reducción del crecimiento del tumor al efecto del péptido sobre la necrosis. Además, demostraron que la inyección intratumoral de TP4 causó una extensa necrosis en xenotransplantes de tumores TNBC en ratón, sin causar efectos secundarios. Entre los péptidos antitumorales en ensayos clínicos cabe destacar el péptido oncomembranolítico LTX-315 que se encuentra en fase I en pacientes con cáncer de mama e induce necrosis e infiltración de células T CD8⁺ en tumores sólidos (Spicer *et al.*, 2021).

1.3 Interacción del péptido TcPaSK con células MDA-MB-231

Para analizar el tipo de interacción del péptido TcPaSK con las células MDA-MB-231, se utilizó un conjugado del péptido con el fluorocromo FITC. En las imágenes de microscopía confocal de las células tratadas con el péptido TcPaSK-FITC, observamos que a 15 min este se localiza principalmente unido a la membrana celular, mientras que tras 1 h de tratamiento, el péptido se encuentra en el interior de la célula, mostrando un patrón punteado típico de vesículas (Figura 23A). En ningún caso observamos señal de TcPaSK-FITC en el núcleo celular.

Por otra parte, para comprobar si el péptido TcPaSK causa daño en la membrana celular, se incubaron con IP células MDA-MB-231 control o tratadas con TcPaSK-FITC durante 1 h. En la Figura 23B observamos que las células sin tratar con el péptido no emiten señal fluorescente de IP, mientras que las células tratadas con TcPaSK-FITC presentan un punteado rojo en el citoplasma correspondiente a la captación de IP. Todo ello confirma que el péptido TcPaSK causa daño en la membrana plasmática de las células MDA-MB-231.

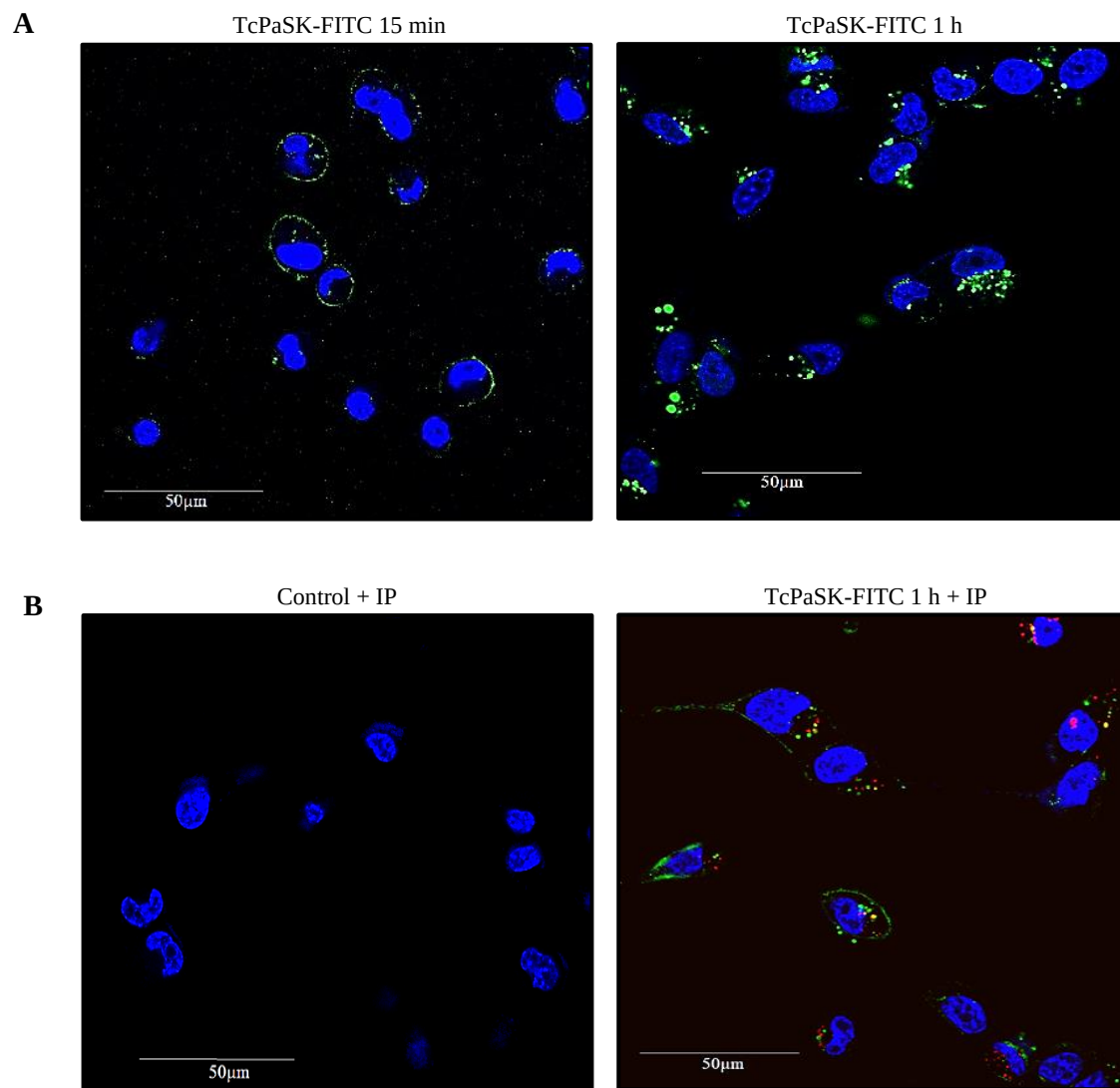


Figura 23. Interacción del péptido TcPaSK con la membrana de células MDA-MB-231. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. A) Células MDA-MB-231 tratadas con TcPaSK-FITC (25 μg/mL) durante 15 min y 1 h de incubación. B) Células MDA-MB-231 no tratadas y tratadas con TcPaSK-FITC (25 μg/mL) durante 1 h, tras posterior incubación con IP durante 10 min. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Fluorescencia azul corresponde a núcleos teñidos con Hoechst; fluorescencia verde a regiones en las que se localiza TcPaSK-FITC; y fluorescencia roja donde se encuentra IP.

El primer contacto de los AMPs catiónicos con las células es la interacción electroestática a través de las cargas negativas de sus membranas plasmáticas y se considera un factor determinante de la selectividad de los péptidos hacia los distintos tipos de células cancerosas (Tornesello *et al.*, 2020) que no solo depende de la carga neta del péptido sino también de la distribución de cargas, tanto en el péptido como a lo largo de la membrana celular (Quemé-Peña *et al.*, 2021) Tras la unión inicial a la célula, los péptidos se internalizan vía penetración (formación de poros y desestabilización de la membrana) y endocitosis (macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina o por caveolina, y endocitosis independiente de

clatrina/caveolina), dependiendo del tamaño, concentración y propiedades físico-químicas del péptido (Chiangjong *et al.*, 2020).

El patrón punteado de la fluorescencia del péptido TcPaSK-FITC, observado tras su unión a las células MDA-MB-231, y la captación de IP (Figura 23) sugieren que uno de los mecanismos por el cual el péptido ejerce su función citolítica es mediante formación de poros en la membrana, los cuales permiten la entrada del IP, y posterior endocitosis del péptido a través de vesículas.

Para comprobar si la internalización del péptido ocurre mediante endocitosis y si el destino de las vesículas es la fusión con los lisosomas, se trataron las células MDA-MB-231 con TcPaSK-FITC, se tiñeron con LysoTracker™ RedDND-99 y se obtuvieron las imágenes mediante microscopía confocal. LysoTracker™ Red DND-99 es una tinción de fluorescencia roja utilizada para el etiquetado y el seguimiento de orgánulos ácidos, como los endosomas tardíos y los lisosomas, en células vivas. En la Figura 24 se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. En la imagen 24A se observa el péptido TcPaSK-FITC alrededor de la membrana celular y con un patrón punteado en el citoplasma. En la imagen 24B podemos observar en rojo los endosomas tardíos y los lisosomas de las células MDA-MB-231, mediante la tinción con LysoTracker™. En las imágenes de los paneles 24C y 24D, correspondientes a la superposición de la fluorescencia asociada a ambas tinciones, observamos: fluorescencia verde del péptido adherido a la membrana celular (flecha blanca); punteado verde del péptido en el citoplasma próximo a la membrana celular (punta de flecha) que puede corresponder con endosomas tempranos; y punteado amarillo (flecha discontinua) que muestra co-localización de la señal de la tinción de lisosomas y de la de TcPaSK-FITC. Dicha co-localización sugiere que las células MDA-MB-231 transportan y degradan el péptido vía lisosomas a través de vesículas y que la internalización de este se produce por endocitosis.

Se ha descrito que el transporte y la degradación de moléculas endocitadas en una célula ocurre a través de un proceso de maduración de endosomas. Los endosomas tempranos se sitúan en la periferia celular cercanos a la membrana y, conforme van madurando y acercándose a la región perinuclear, se van transformando en endosomas tardíos. Finalmente, se fusionan con los lisosomas para llevar a cabo la degradación de las moléculas endocitadas (Bright *et al.*, 2016). Algunos AMPs como K6L9, K8L9, o melitina, además de poseer actividad membranolítica contra células tumorales, entran en el citoplasma vía endocitosis provocando un agrandamiento de los lisosomas (Kohn *et al.*, 2014).

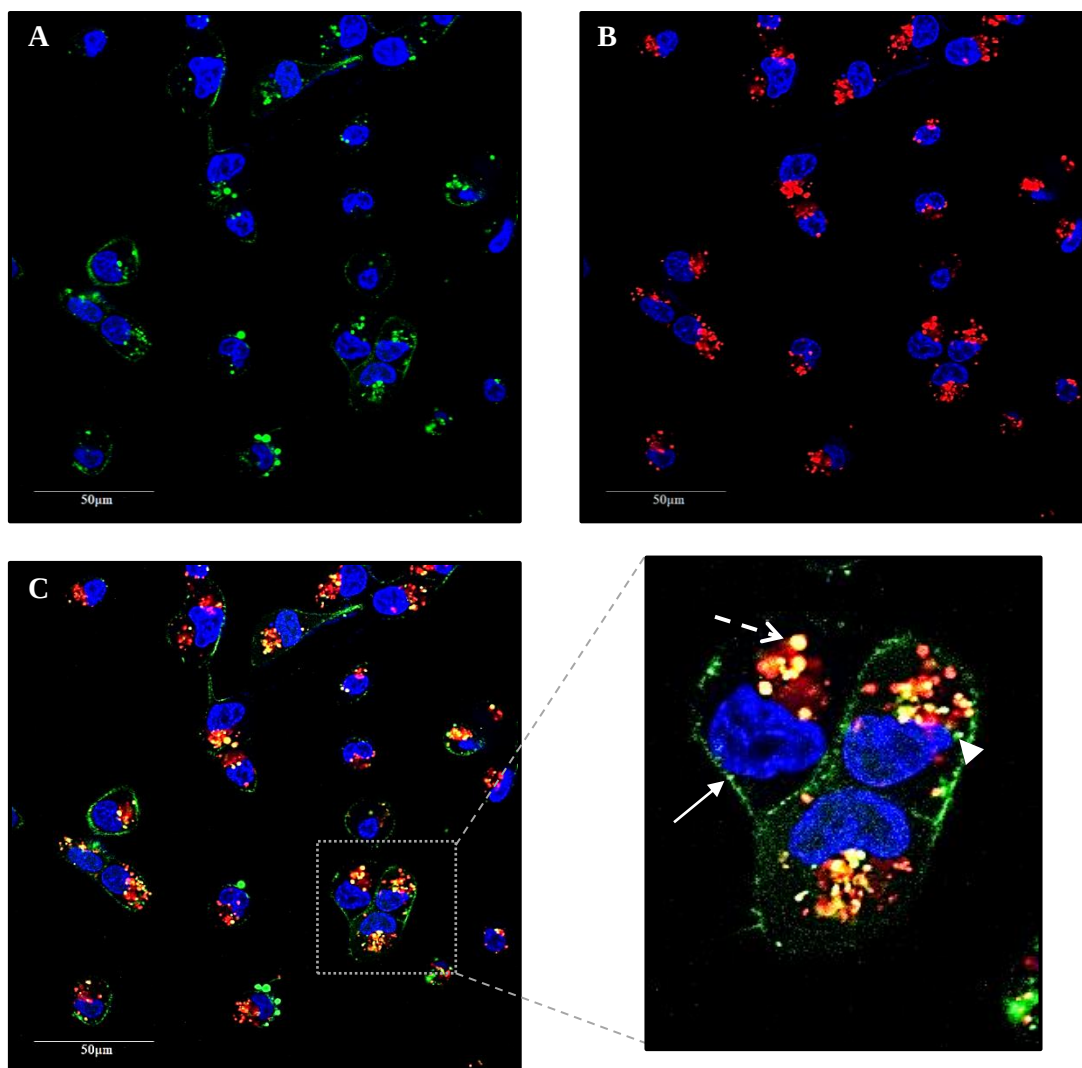


Figura 24. Internalización del péptido TcPaSK en células MDA-MB-231. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de células MDA-MB-231 tratadas con TcPaSK-FITC (100 μg/mL) durante 1 h y posteriormente teñidas con LysoTracker™ Red DND 99 (75 nM). A) Detección de la fluorescencia del péptido TcPaSK-FITC en las células. B) Detección de la fluorescencia de LysoTracker™ Red DND 99 en las células, correspondiente a endosomas tardíos y lisosomas. C) Superposición de las imágenes A) y B), con magnificación de una sección en la que la flecha blanca muestra el péptido TcPaSK en la membrana, la punta de flecha muestra vesículas solo marcadas con TcPaSK-FITC y la flecha discontinua muestra lisosomas que co-localizan con TcPaSK-FITC. Imágenes representativas de 2 experimentos independientes. La fluorescencia azul corresponde a los núcleos de las células teñidos con Hoechst.

2. Efecto del péptido TcPaSK sobre factores que determinan la progresión del cáncer

2.1 Angiogénesis

La capacidad de promover la vascularización es una característica que adquieren las células tumorales para proporcionar un mayor aporte de oxígeno y nutrientes al tumor, necesarios para la proliferación y el avance de este (De Palma *et al.*, 2017).

Los ensayos de formación de túbulos en células endoteliales se utilizan como modelo *in vitro* para determinar la actividad angiogénica o antiangiogénica de diferentes compuestos. En este trabajo, para comprobar el efecto del péptido TcPaSK en la capacidad de formación de túbulos, se obtuvieron imágenes mediante microscopía óptica de células endoteliales de venas umbilicales humanas (HUVEC), tratadas y sin tratar con el péptido TcPaSK (Figura 25). En las imágenes de las células HUVEC sin tratar se observó la formación de una red de túbulos bien definida (indicados con flechas negras en la imagen ampliada), mientras que en las imágenes de las células tratadas con péptido no se observa ninguna unión entre grupos de células. Estas observaciones indican que el péptido TcPaSK posee capacidad antiangiogénica dado que inhibe la formación de túbulos en células HUVEC.

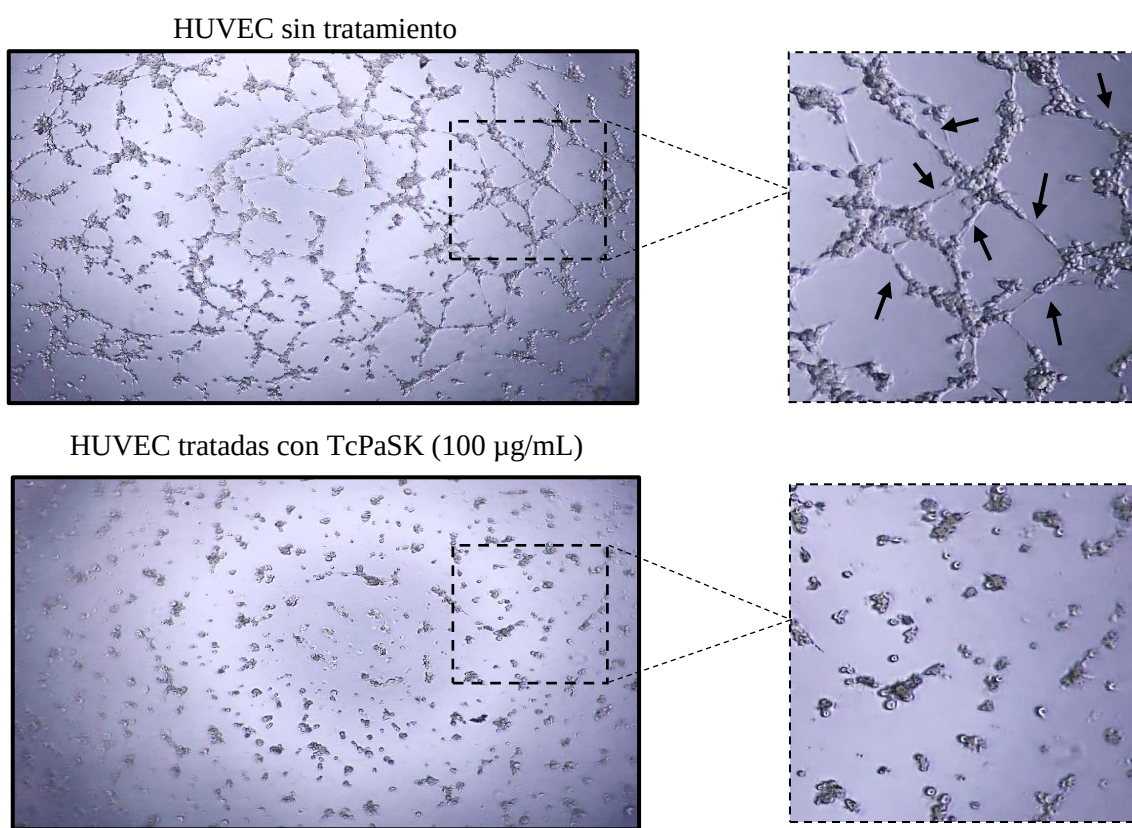


Figura 25. Efecto del péptido TcPaSK en la angiogénesis. Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica de células HUVEC no tratadas y tratadas con el péptido TcPaSK (100 µg/mL) durante 4 h. Las flechas negras señalan los túbulos formados. Imágenes representativas de experimentos con dos réplicas biológicas y cuatro réplicas técnicas cada uno.

En el tratamiento del cáncer hay un gran interés por la terapia anti-angiogénica cuya finalidad, más que reducir la densidad de los vasos sanguíneos en el tumor, es normalizar la vasculatura tumoral (Gaspar *et al.*, 2013). En la actualidad, se están desarrollando nuevos agentes terapéuticos anti-angiogénicos con mayor eficacia y menores efectos secundarios. Los péptidos pequeños con capacidad para bloquear el proceso de angiogénesis del tumor presentan numerosas

ventajas frente a fármacos de gran tamaño y estructuras complejas que dificultan su entrada en los tejidos. Se conocen alrededor de 7000 péptidos y peptidomiméticos derivados de péptidos naturales con diferentes propiedades terapéuticas, algunos de los cuales, solos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos, poseen actividad anti-angiogénica (Shoari *et al.*, 2021). La capacidad anti-angiogénica del péptido TcPaSK constituye una característica de gran relevancia para su uso potencial especialmente en el tratamiento de cánceres metastáticos en los que la angiogénesis es determinante para la progresión del cáncer.

2.2 Hipoxia

La hipoxia es otro factor importante que forma parte del microambiente interno de la masa tumoral y está relacionado con la progresión, la resistencia a los tratamientos y el mal pronóstico en muchos tumores (de Heer *et al.*, 2020). Las condiciones hipóxicas de las células tumorales conducen a la alteración de rutas metabólicas, promueven la supervivencia por adaptación al microambiente local y activan múltiples rutas de señalización que conllevan la proliferación celular, el incremento de la viabilidad de las células y la metástasis (Xie *et al.*, 2016). La mayoría de estas alteraciones fenotípicas están mediadas por el factor de transcripción HIF-1 constituido por las subunidades HIF-1 α y HIF-1 β . Debido a que la expresión del HIF-1 β es constitutiva, la actividad de HIF-1 exclusivamente puede ser regulada por los niveles de HIF-1 α , por lo que esta se considera el factor clave que media la adaptación de las células cancerosas a un entorno hipóxico.

Mediante Western-Blot se analizaron las diferencias en los niveles de la proteína HIF-1 α en células MDA-MB-231 tratadas y no tratadas con el péptido TcPaSK. Observamos que, en condiciones de normoxia, en las células tratadas 24 h con el péptido TcPaSK no hay variación en HIF-1 α , mientras que en las células tratadas durante 48 h con TcPaSK, HIF-1 α se encuentra disminuido (Figura 26). En condiciones de hipoxia, donde HIF-1 α se acumula en las células control, en las células tratadas con el péptido TcPaSK disminuyen los niveles de HIF-1 α , tanto a 24 h como a 48 h (Figura 26).

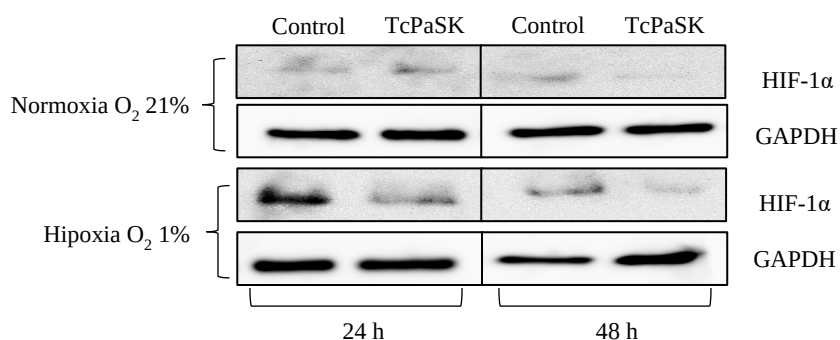


Figura 26. Western-Blot de la proteína HIF-1 α en células MDA-MB-231 tratadas con TcPaSK en condiciones de hipoxia. Bandas correspondientes a la cantidad relativa de proteína HIF-1 α . Las células MDA-MB-231 se trataron con el péptido TcPaSK (100 μ g/mL) durante 24 y 48 h en condiciones de normoxia (O₂ 21%) e hipoxia (O₂ 1%). Como control se utilizaron células MDA-MB-231 sin tratar. GAPDH se usó como proteína constitutiva de referencia.

Los resultados indican que el péptido TcPaSK podría inhibir la adaptación de las células MDA-MB-231 al microambiente hipóxico de algunas regiones del tumor.

El papel fundamental que desempeña HIF-1 α en el mantenimiento de la homeostasis de oxígeno en relación a la angiogénesis y a la progresión de los tumores hacen que sea considerada, además de un marcador tumoral, una importante diana potencial para el desarrollo de terapias contra el cáncer (Jing *et al.*, 2019). A este respecto, aunque existen avances en la comprensión de las alteraciones que se producen en los mecanismos de regulación de la expresión de HIF-1 α en células cancerosas, son escasos los trabajos que, con la finalidad de reducir el crecimiento tumoral, utilizan péptidos anticancerígenos dirigidos a la inhibición de la expresión de HIF-1 α . El péptido sintético antitumorogénico CIGB-552 exhibe citotoxicidad selectiva hacia distintas líneas celulares y es responsable del incremento de supervivencia en ratones con xenotransplantes de tumores (Vallespi *et al.*, 2014). Se ha demostrado que la capacidad anti-angiogénica de dicho péptido se debe a su efecto en la modulación de la ruta de señalización de HIF-1 y se está investigando la identificación de posibles dianas de este péptido para regular la activación de HIF-1 α (Daghero *et al.*, 2020).

El TNBC es un subtipo de cáncer de mama altamente hipóxico en comparación con otros subtipos (De Heer *et al.*, 2020), por lo que el efecto del péptido TcPaSK sobre los niveles de la proteína HIF-1 α observado en condiciones de hipoxia, podría ser explotado para reducir la acumulación de HIF-1 α que se produce en respuesta al microambiente hipóxico de este tipo tumoral.

3. Análisis de la capacidad antimetastásica del péptido TcPaSK en células MDA-MB-231

3.1 Adhesión celular

Muchas proteínas que forman parte de la matriz extracelular, como la vimentina, la fibronectina y el fibrinógeno, entre otras, poseen sitios RGD de unión a integrinas, lo cual constituye un sistema de reconocimiento para la adhesión celular (Kapp *et al.*, 2017). Se realizaron ensayos de adhesión celular tiñendo con violeta-cristal y cuantificando las células MDA-MB-231 adherentes después del tratamiento con el péptido TcPaSK y un péptido RGD como control positivo. Se observó una disminución estadísticamente significativa en el número de células adherentes MDA-MB-231 tras el tratamiento con ambos péptidos, respecto a las células sin tratar (Figura 27). Comparando la actividad entre el péptido TcPaSK y el péptido RGD, en el tratamiento de 15 min no se observan diferencias significativas, mientras que en el tratamiento de 1 h sí se observa disminución estadísticamente significativa en el porcentaje de células adherentes MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK respecto de las tratadas con el péptido RGD (figura 27).

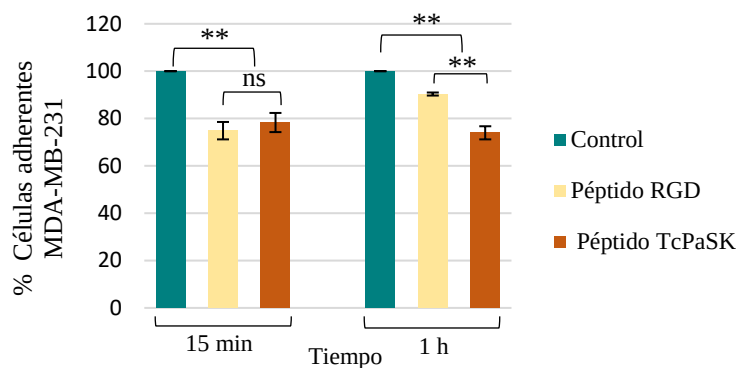


Figura 27. Efecto del péptido TcPaSK sobre la adhesión de células MDA-MB-231. Cuantificación del porcentaje de células adherentes MDA-MB-231 no tratadas y tratadas con el péptido TcPaSK (100 µg/mL) o el péptido RGD (100 µg/mL) durante 15 min y 1 h. En las gráficas se representan las medias $\pm$ SE de 3 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (ANOVA y Test de Tukey, ns: no significativo, $**p \leq 0,01$).

Estos resultados muestran que el péptido TcPaSK, mediante su interacción con la membrana, puede interferir en la capacidad de adhesión de las células tumorales MDA-MB-231. El correcto anclaje de las células tumorales a la matriz extracelular es un requerimiento básico para su supervivencia. La pérdida de la adhesión celular es el primer paso que conduce a la alteración de una serie de actividades celulares, tales como la difusión, migración, proliferación y diferenciación, relevantes en la progresión del cáncer.

3.2 Migración e invasión

Se examinó la capacidad del péptido TcPaSK para alterar la migración e invasión de células TNBC, realizando ensayos de cicatrización de herida y cuantificando las células MDA-MB-231 con capacidad de migración e invasión, tras tratamiento con el péptido TcPaSK.

En las imágenes de la Figura 28A se observa que, a las 6 h de realizar la estría, en las células sin tratar ya está prácticamente cerrada, mientras que en las células tratadas con el péptido TcPaSK apenas se observan cambios, demostrando así una fuerte inhibición por parte del péptido de la capacidad de migración de las células MDA-MB-231.

Una de las claves del proceso de metástasis es la capacidad de invasión, proceso que implica la degradación de la matriz extracelular y la migración de las células a través de ella. Se cuantificaron las células con capacidad de migración a través de una membrana de policarbonato (migración) y aquellas que, antes de migrar, fueron capaces de degradar la matriz extracelular (invasión), tiñéndolas con CyQuant® GR Dye. Como se observa en las Figuras 28B y C, en las células MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK se produce una disminución estadísticamente significativa de la extensión de la migración, evidenciando el potencial del péptido TcPaSK para disminuir la capacidad metastásica de las células MDA-MB-231.

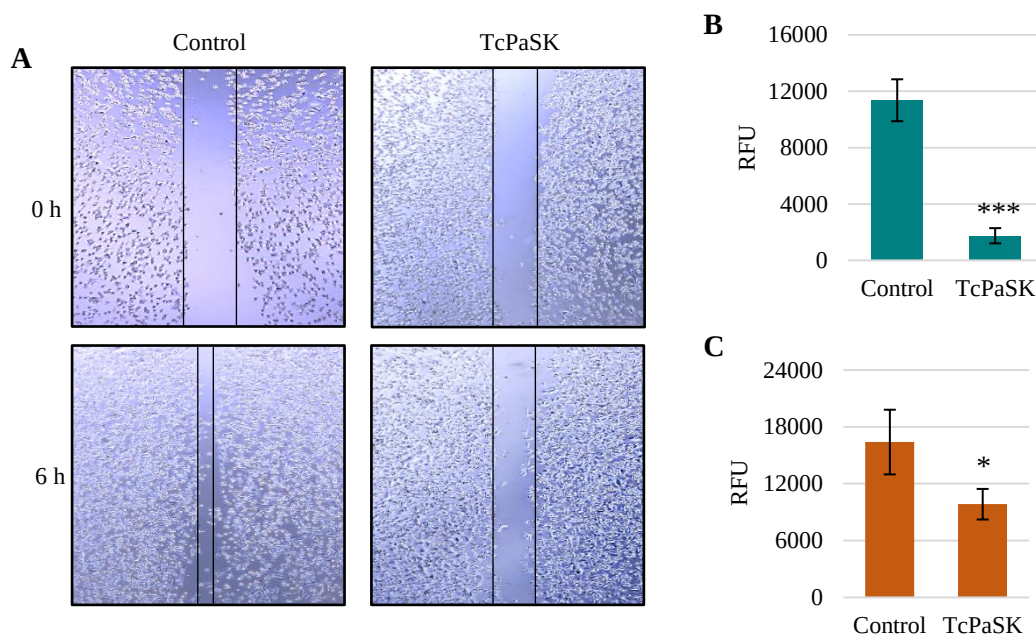


Figura 28. Efecto sobre la capacidad de migración e invasión de células MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK. A) Imágenes de microscopía óptica del ensayo de cicatrización de la herida a tiempo 0 y 6 h. Estría realizada en la monocapa de células MDA-MB-231 confluentes. B) Cuantificación de la fluorescencia relativa (RFU) de células que migran a través de la membrana de policarbonato. C) Cuantificación de células que degradan la matriz extracelular teñidas con CyQuant® GR (invasión celular). Los ensayos fueron realizados en células MDA-MB-231 no tratadas y tratadas con el péptido TcPaSK (100 µg/mL) durante 6 y 24 h. En las gráficas se representan las medias $\pm$ SE de 4 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Test *t-Student*, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$).

En líneas celulares TNBC, se ha descrito que algunos péptidos antimicrobianos catiónicos tienen capacidad para inhibir la invasión y la migración de las células *in vitro*. El péptido PR39, una catelicidina porcina rica en aminoácidos prolina y arginina, inhibe significativamente la invasión y migración de células 4T1 de epitelio mamario de ratón (Tian *et al.*, 2012). En células MDA-MB-231 los péptidos FR8P y FR11P, derivados de la catelicidina humana LL-37, a concentraciones sub-IC₅₀, también mostraron un efecto anti-migratorio y anti-invasivo (Tripathi *et al.*, 2017).

3.3 Transición epitelio-mesénquima (EMT)

Tanto la EMT como la MET son necesarias para el proceso de metástasis. Mientras que la EMT moviliza las células en el tumor primario, la MET da como resultado la colonización distal de células cancerosas finalizando el proceso de migración (Huang *et al.*, 2022). No obstante, la EMT no es un proceso binario EMT-MET y ocurre a través de un espectro de estados intermedios, en los que encontramos tanto EMT como MET parciales. En estos estados las células expresan combinaciones de marcadores de células epiteliales y mesenquimales y presentan características fenotípicas intermedias (Löönd *et al.*, 2021).

Los factores de transcripción *Snai1*, *Slug*, *Zeb1*, *Zeb2* y *Twist1* activan la EMT, por una parte, induciendo la expresión de genes relacionados con el fenotipo mesenquimal como los que codifican N-cadherina, Vimentina, Fibronectina, etc. y, por otra parte, reprimiendo la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina, Ocludina, ZO-1, etc. (Debnath *et al.*, 2022).

En células MDA-MB-231 tratadas y no tratadas con el péptido TcPaSK, se analizó la expresión de los factores de transcripción *Snai1*, *Snai2 (Slug)*, *Zeb1*, *Zeb2* y *Twist1* y de los genes que codifican las proteínas Vimentina, Fibronectina, N-cadherina, E-cadherina, Ocludina y ZO1, todos ellos relacionados con la EMT. Se observó una disminución estadísticamente significativa de la expresión de todos los factores de transcripción y marcadores mesenquimales estudiados implicados en EMT en células MDA-MB-231 tratadas con TcPaSK, a excepción del correspondiente transcrito de *Twist1* que no se detectó en células sin tratar (Figura 29A y B). Sin embargo, no se observaron diferencias de expresión en los marcadores epiteliales entre células tratadas y no tratadas con el péptido (Figura 29 C). Mediante Western-Blot se confirmó que los niveles de la proteína E-cadherina tampoco variaron después del tratamiento de las células MDA-MB-231 con el péptido TcPaSK durante 24 h (Figura 29D). Estos resultados muestran que, aunque el péptido TcPaSK reprime la expresión de los marcadores mesenquimales, no se produce la reversión a un fenotipo epitelial.

En modelos animales se ha demostrado que la represión de la expresión de factores de transcripción implicados en EMT disminuyó significativamente la metástasis de los tumores primarios y, por el contrario, la activación de estos factores de transcripción condujo a un aumento en la metástasis celular (Rubtsova *et al.*, 2022). Es bien conocido el papel de la E-cadherina como supresor de tumores, pero la evidencia acumulada muestra que también puede desempeñar un papel como promotor de estos. Muchos carcinomas invasivos y metastásicos, como el cáncer de mama inflamatorio, mantienen la expresión de E-cadherina (Lim *et al.*, 2018). Es decir, esta proteína puede desempeñar una importante función en la progresión del tumor, según el contexto de este. Aunque el inicio de la cascada de invasión-metástasis requiere un fenotipo más mesenquimal por parte de las células, la colonización metastásica exitosa en órganos distantes depende de la reversión al fenotipo epitelial y la reexpresión de E-cadherina (Rubtsova *et al.*, 2022). En un modelo de carcinoma de mama de ratón, se demostró que la metástasis dependía de la activación local de nichos metastásicos con un fenotipo más epitelial, incluida la regulación positiva de la expresión de E-cadherina (Del Pozo Martin *et al.*, 2015).

Las células cancerosas que experimentan transición epitelio-mesénquima muestran un incremento de la expresión de CD44, la cual se presenta en distintas isoformas que se generan por *splicing* alternativo regulado por ESRP1 (*Epithelial splicing regulatory protein 1*) y que poseen una función diferencial en la progresión, metástasis y quimioresistencia en diferentes tipos tumorales (Chen *et al.*, 2018).

En células MDA-MB-231, analizamos los niveles de transcritos de *ESRP1*, de la secuencia completa de CD44 (19 exones), de la isoforma estándar más pequeña CD44s (carece de la secuencia correspondiente a los exones 6-14) y de las distintas variantes CD44v (conteniendo un número variable de exones como resultado de *splicing* alternativo) (Figura 30). Se observó que en las células MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK la expresión del gen *ESRP1* aumenta significativamente, mientras que la de CD44c disminuye significativamente en relación a las células sin tratar. En cuanto a la expresión de las isoformas de CD44, los niveles de las variantes CD44s, CD44v8 y CD44v9 disminuyeron significativamente y no se observó variación en CD44v5, CD44v6, CD44v7 y CD44v10 (Figura 30).

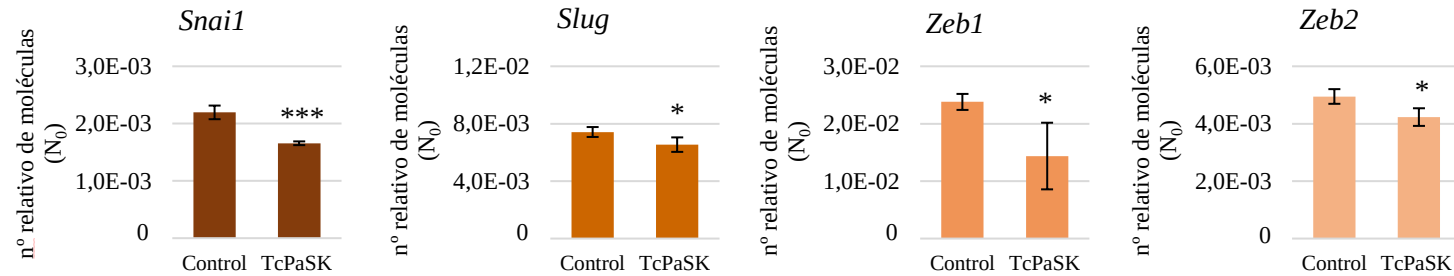
En conjunto, estos resultados apoyan que el péptido TcPaSK ejerce un efecto inhibitorio en el proceso de EMT en las células MDA-MB-231, reprimiendo la expresión de los factores de transcripción y marcadores mesenquimales, así como la de CD44 y algunas de sus isoformas.

La glicoproteína transmembrana CD44 está relacionada con procesos que permiten a las células tumorales comportarse como células madre, denominadas CSC. Estos procesos otorgan capacidad de autorenovación, de activación de la EMT y de resistencia a quimioterapéuticos y radioterapia (Hassn *et al.*, 2021). En la actualidad, existen estrategias terapéuticas dirigidas a cáncer, en distintas fases de desarrollo clínico, que bloquean CD44 o reducen su expresión (Chen *et al.*, 2018). Podemos hipotetizar que la disminución de los niveles del transcrito de CD44c como resultado del tratamiento con el péptido TcPaSK, se correspondería con un efecto del mismo impidiendo la adquisición del fenotipo CSC promovido por EMT en células epiteliales, corroborando así su potencial como agente anticancerígeno.

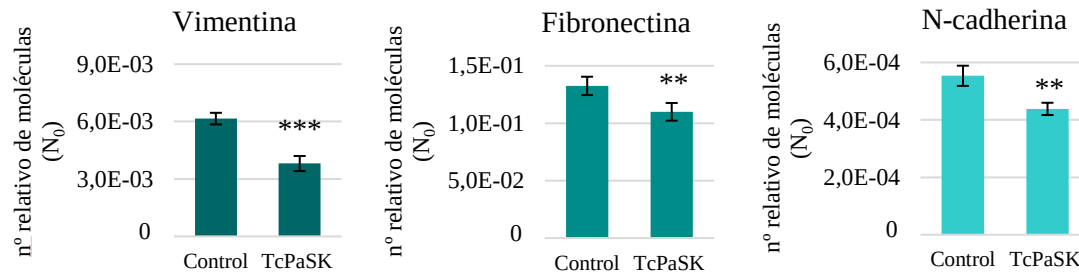
La funcionalidad de las diferentes isoformas producto del gen *CD44* no está completamente establecida. Se ha descrito que las isoformas variables CD44v están presentes en tumores metastáticos y que el cambio de isoformas CD44v a la estándar CD44s está asociado con EMT y con la represión de la expresión de *ESRP1* que actúa como regulador post-transcripcional de CD44 (Chen *et al.*, 2018). El factor de transcripción *Snai1* modula el *splicing* alternativo de CD44, regulando negativamente la expresión de *ESRP1*, lo cual resulta en un descenso de los niveles de las isoformas CD44v y un aumento de la isoforma CD44s (Reinke *et al.*, 2012).

En células MDA-MB-231, el efecto del péptido TcPaSK disminuyendo la expresión del gen *Snai1* se correlaciona con el aumento de la expresión del gen *ESRP1* y la reducción de los niveles de la isoforma CD44s. Sin embargo, no se observa el esperable aumento de las isoformas CD44v (incluso la expresión de las isoformas CD44v8 y CD44v9 disminuye), lo cual podría ser atribuido al hecho de que, en respuesta al tratamiento con el péptido, la expresión de CD44c disminuye. Por esta misma razón, no es posible concluir que la disminución de CD44s se deba exclusivamente a la acción de *ESRP1*.

A Factores de transcripción implicados en EMT



B Marcadores mesenquimales implicados en EMT



C Marcadores epiteliales implicados en EMT

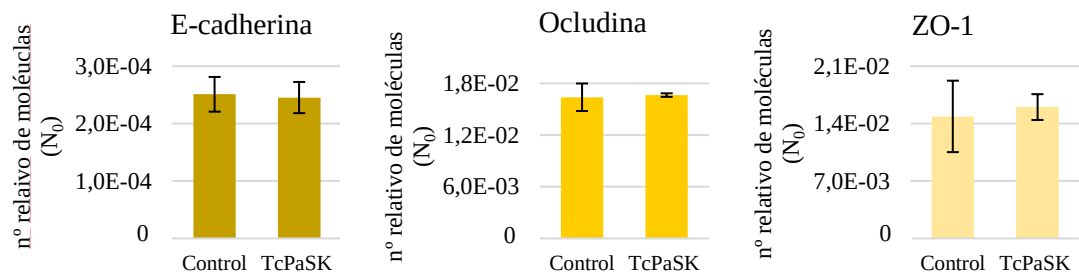
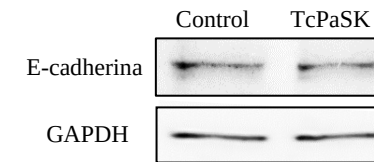


Figura 29. Expresión diferencial de factores de transcripción y genes marcadores de EMT en células MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK. Mediante RT-qPCR se analizó la expresión de: A) Factores de transcripción; B) Marcadores mesenquimales y C) Marcadores epiteliales. D) Western-Blot de la proteína E-cadherina. GAPDH se usó como proteína constitutiva de referencia. Las células se trataron con el péptido TcPaSK (100 µg/mL) durante 24 h. En las gráficas se representan las medias ± SE de 3 réplicas biológicas. (Test *t*-Student, **p* ≤ 0,05, ***p* ≤ 0,01, ****p* ≤ 0,001).

D Western-Blot



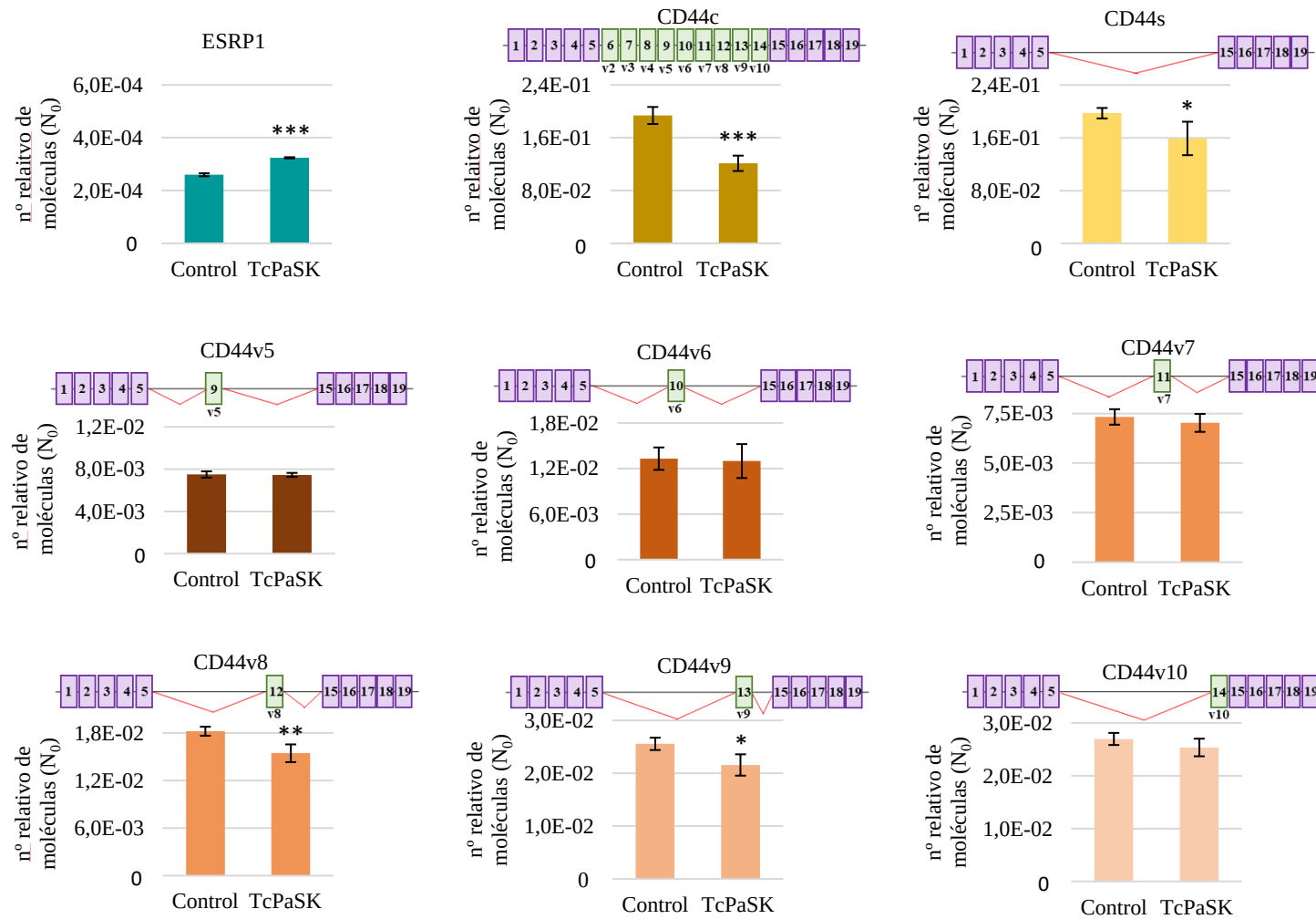


Figura 30. Análisis de la expresión de isoformas de CD44 tras el tratamiento de células MDA-MB-231 con el péptido TcPaSK. Mediante RT-qPCR se analizó la expresión de los genes que codifican para ESRP1 y para las diferentes isoformas de CD44 en células MDA-MB-231 no tratadas y tratadas con el péptido TcPaSK (100 µg/mL) durante 24 h. En las gráficas se representan las medias $\pm$ SE de 3 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Test *t-Student*, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Numerosos estudios evidencian el papel de los miARNs en la regulación de la EMT. Una de las familias más estudiadas y mejor conservadas implicadas en esta regulación es la del miR-200, la cual incluye cinco miARNs codificados en dos grupos. Un grupo formado por miR-200a, miR-200b y miR-429, y el otro por miR-200c y miR-141 (Wellner *et al.*, 2009; Fridrichova y Zmetakova, 2019). En varios tipos de cánceres se ha descrito el papel de miR-200 reprimiendo la expresión de los factores de transcripción mesenquimales *Zeb1* y *Zeb2* (Zaravinos, 2015). Comprobamos mediante RT-qPCR la expresión diferencial de la familia miR-200 en células MDA-MB-231 tratadas y no tratadas con el péptido TcPaSK (Figura 31A, B y C), observándose un aumento estadísticamente significativo de la expresión de los miR-200a, b y c en las células tratadas con el péptido TcPaSK respecto a las no tratadas. Esto concuerda con la disminución de la expresión de los genes *Zeb1* y *Zeb2* descrita anteriormente tras el tratamiento con el péptido (Figura 29). El incremento de la expresión de los miR-200a y b en las células tratadas con el péptido se confirmó mediante amplificación por PCR de la secuencia del pri-miR200a en el que están codificados el miR-200a y b (Figura 31D). No se pudo detectar producto del pri-miR200c tras amplificación por PCR.

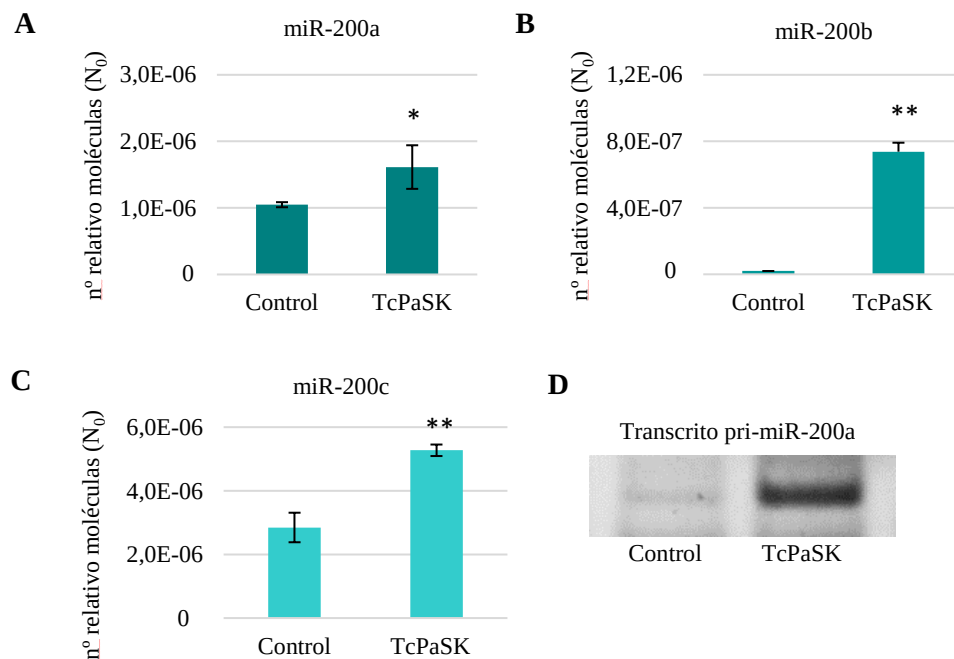


Figura 31. Expresión de la familia miR-200 en células MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK. Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de miR-200a (panel A), de miR-200b (panel B) y de miR-200c (panel C) en células MDA-MB-231 no tratadas y tratadas con el péptido TcPaSK (100 µg/mL) durante 24 h. En las gráficas se representan las medias $\pm$ SE de 3 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Test *t-Student*, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). D) Electroforesis del producto amplificado por PCR correspondiente al pri-miR que codifica miR-200a y b (pri-miR-200a).

La EMT es una forma de plasticidad celular crítica para la progresión del cáncer hacia la metástasis. Se ha postulado que el equilibrio entre los estados epitelial y mesenquimal está controlado por una doble retroalimentación negativa entre la familia miR-200 y los factores de transcripción *Zeb 1/2* (Cavallari *et al.*, 2021). Así, se ha demostrado que la alteración del equilibrio ZEB/miR-200 puede conducir al cambio reversible entre los estados epitelial y mesenquimal (Gregory *et al.*, 2011). Cuando se retiran las señales de inducción de la EMT, solo las células que presentan niveles bajos de *Zeb1/2* reversion a fenotipo epitelial inmediatamente, indicando que la activación de Zeb supone un punto crítico para las células que experimentan EMT (Jolly *et al.*, 2015). La ausencia de variación en la expresión de los marcadores epiteliales analizados en las células MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK, podría explicarse por el efecto particular de este péptido sobre el equilibrio ZEB/miR-200, evitando la reversión de las células a un fenotipo epitelial. A pesar de desconocer la base molecular, nuestros resultados muestran que TcPaSK activa determinados programas transcripcionales que inhiben la expresión de genes necesarios para promover la movilización celular, no incrementan la expresión de genes que codifican proteínas necesarias para la colonización en órganos distantes y, por tanto, impiden la metástasis.

Las terapias dirigidas a EMT combinadas con quimioterapia convencional pueden mejorar la sensibilidad de las células tumorales a la medicación en la etapa temprana del desarrollo del cáncer (Shen *et al.*, 2019), y en etapas posteriores de la enfermedad los inhibidores de la EMT pueden reducir la proporción de CSC en el tumor primario y prevenir la adhesión y la colonización de células tumorales circulantes (Huang *et al.*, 2022). El péptido TcPaSK podría constituir un eficaz coadyuvante para este tipo de tratamientos.

4. Reconocimiento celular del péptido TcPaSK en células MDA-MB-231

4.1 Estudio de la interacción del péptido TcPaSK con la integrina $\alpha\beta 3$

Los receptores de adhesión y señalización celular de la superfamilia de las integrinas desempeñan una función esencial en la adhesión de las células a la matriz extracelular (Kapp *et al.*, 2017; Sani *et al.*, 2021). La subfamilia de integrinas αv está constituida por cinco miembros ($\alpha\text{v}\beta 1$, $\alpha\text{v}\beta 3$, $\alpha\text{v}\beta 5$, $\alpha\text{v}\beta 6$ and $\alpha\text{v}\beta 8$) caracterizados por reconocer proteínas que contienen el motivo RGD (Nieberler *et al.*, 2017). De ellos, la integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ se ha demostrado que se encuentra sobreexpresada particularmente en cánceres agresivos, incluidos el de mama, el de pulmón, el melanoma, el glioblastoma, el de páncreas y el de próstata (Hosotani *et al.*, 2002; Sloan *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2012; Russo *et al.*, 2013; Heß *et al.*, 2014; Stojanovic *et al.*, 2018). Por ello, la presencia de esta integrina se relaciona con una mayor capacidad celular de migración, adhesión e invasión durante la progresión del tumor (Sheldrake y Patterson, 2014). Se ha descrito

que las células MDA-MB-231 presentan niveles muy elevados de la integrina de unión a ligandos RGD $\alpha v \beta 3$ (Hill *et al.*, 2019).

El péptido TcPaSK posee en las posiciones 17 a 19 de su secuencia proteica un triplete de aminoácidos RGG (Arg-Gly-Gly) (Tabla 6) que podría realizar un papel similar al del motivo representativo de adhesión RGD que es reconocido por la integrina $\alpha v \beta 3$, dando cuenta de la interferencia en la capacidad de adhesión de las células tumorales MDA-MB-231 tratadas con dicho péptido que mostramos en el apartado 3.1. En células MDA-MB-231 analizamos, mediante microscopía confocal, el efecto de la incubación, previamente al tratamiento con el péptido TcPaSK-FITC, por una parte, con un péptido RGD y, por otra, con un anticuerpo anti-integrina $\alpha v \beta 3$ (Figura 32).

En las células MDA-MB-231 tratadas con TcPaSK-FITC, tanto durante 15 min como durante 1 h, se observa el péptido unido a la membrana y su posterior internalización en el citoplasma celular (Figura 32A y B). En las imágenes de las células que se preincubaron con el péptido RGD, apenas se observa señal de TcPaSK cuando se trataron con TcPaSK-FITC durante 15 min (Figura 32C), mientras que, cuando el tratamiento con el mismo se prolongó hasta 1 h, detectamos señal correspondiente al péptido TcPaSK-FITC tanto en la membrana como en el interior de las células (Figura 32D). Cuando las células se preincubaron con el anticuerpo anti-integrina $\alpha v \beta 3$, prácticamente no se detectó la presencia del péptido TcPaSK ni en la membrana ni en el interior de las células, independientemente de que el tiempo de tratamiento con el péptido TcPaSK-FITC fuera de 15 min o de 1 h (Figura 32E y F). Estos resultados apoyan la posible interacción directa del péptido a través de integrinas $\alpha v \beta 3$ presentes en la membrana de las células MDA-MB-231, alterando así las condiciones de adhesión celular en el entorno de la matriz extracelular.

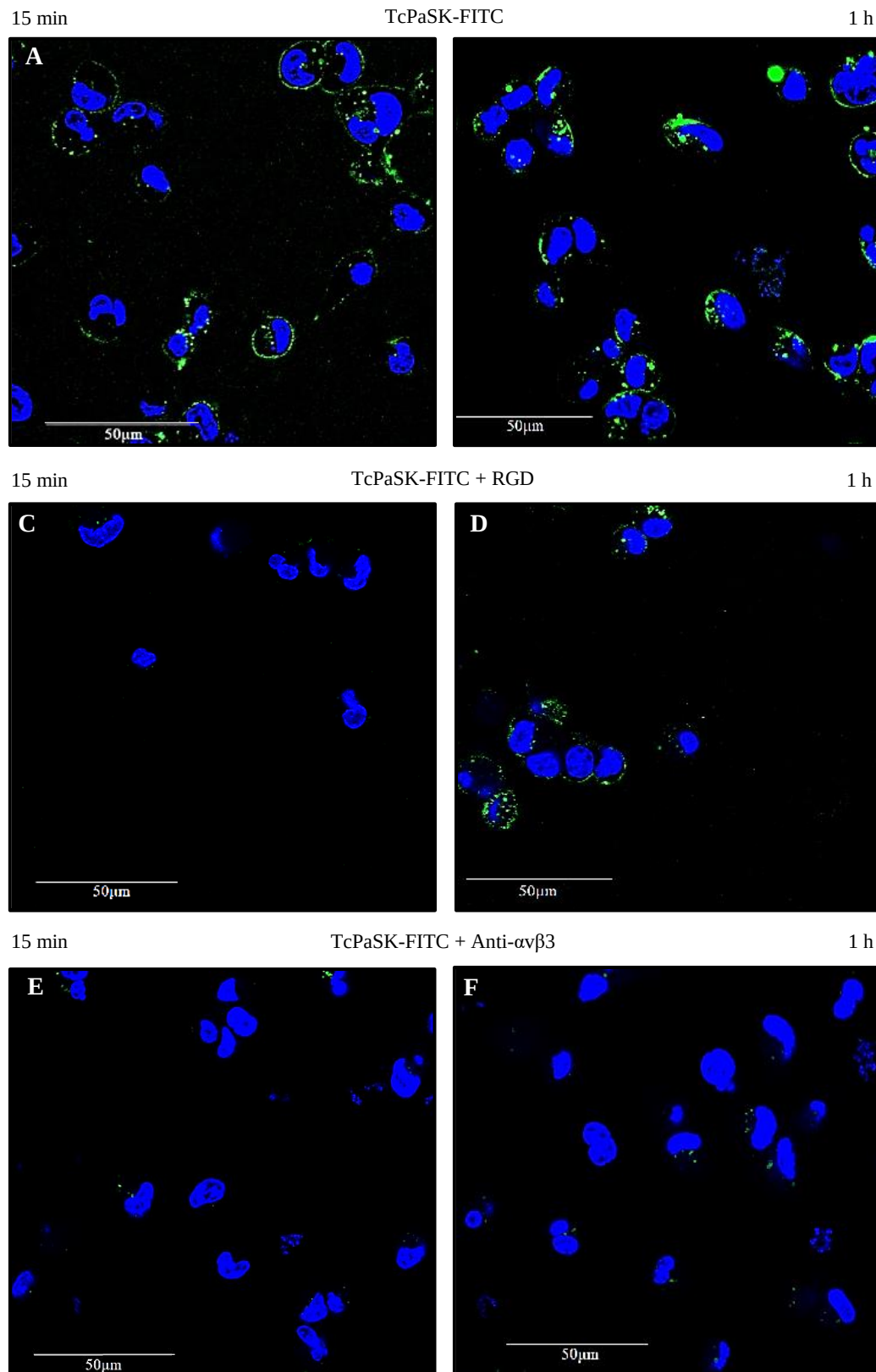


Figura 32. Análisis mediante microscopia confocal de la interacción del péptido TcPaSK con células MDA-MB-231. Imágenes de células MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK-FITC (25 $\mu g/mL$) durante 15 min (A) o 1 h (B), previa incubación durante 30 min con péptido RGD (1 mg/mL) (C y D) o con anticuerpo anti- $\alpha v \beta 3$ (10 $\mu g/mL$) (E y F). Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Fluorescencia azul corresponde a núcleos teñidos con Hoechst; fluorescencia verde corresponde a regiones en las que se localiza TcPaSK-FITC.

Las integrinas que unen motivos RGD desempeñan un papel crucial en la adhesión y señalización celular en las células tumorales, regulando procesos como apoptosis, metástasis o anti-angiogénesis (Ludwig *et al.*, 2021). Entre las integrinas, la $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ es la más importante en el proceso de angiogénesis (Brooks *et al.*, 1994; Kumar, 2003), ya que se ha demostrado que la inhibición de la actividad de la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ por anticuerpos monoclonales, péptidos RGD cíclicos antagonistas y peptidomiméticos inhibe la angiogenesis (Liu *et al.*, 2008). Además, la inhibición de la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ en células hipóxicas, con inhibidores específicos o con siRNA, disminuye los niveles intracelulares de HIF-1 α (Skuli *et al.*, 2009). El efecto del péptido TcPaSK sobre la angiogénesis y la acumulación de HIF-1 α en condiciones de hipoxia en las células MDA-MB-231 es compatible con su interacción con la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$.

Existe un tipo de péptidos denominados péptidos dirigidos a tumores que contienen motivos RGD a través de los cuales se unen específicamente a moléculas de la superficie de las células tumorales o de la vasculatura tumoral, particularmente a la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, alterando la adhesión de las células, la diferenciación y la migración celular, y la metástasis (Norouzi *et al.*, 2022). En el diagnóstico y tratamiento de tumores, las estrategias terapéuticas basadas en el uso de RGD resultan especialmente atractivas puesto que los receptores de integrinas y sus ligandos se internalizan eficientemente en las células vía endocitosis mediada por receptor. Las más extendidas se fundamentan en la conjugación de diferentes fármacos anticancerígenos con oligopéptidos que contienen la secuencia RGD o con TTPs que, aunque carecen de actividad antitumoral inherente, permiten liberar el agente anticancerígeno en el interior de la célula.

La interacción del péptido TcPaSK con la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ en células MDA-MB-231 hemos postulado que se produciría mediante el reconocimiento del tripéptido RGG contenido en su secuencia. En nuestro conocimiento, no se ha explorado la capacidad antitumoral de moléculas que presentan secuencias RGD-like, aunque sí se han identificado proteínas con motivos RGD-like que son reconocidas por integrinas. La glicoproteína de la matriz extracelular tenascina-C de *Latimeria chalumnae* posee dos motivos de unión a integrinas, identificados experimentalmente: el motivo IDG de unión a la integrina $\alpha\text{9}\beta\text{1}$; y, en lugar del motivo canónico RGD de unión a la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, un motivo RGG, a través del cual también es reconocido por esta última integrina (Adams *et al.*, 2015). Además, se ha propuesto que *Streptococcus gordonii* interacciona específicamente con la integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (el receptor más abundante en la superficie de las plaquetas de la sangre humana), a través de dos regiones RGD-like (RGG y RGT) presentes en la secuencia de la proteína platelet adherence protein A (PadA) de la membrana celular de la bacteria, provocando la activación de las plaquetas que conduce a complicaciones trombóticas (Keane *et al.*, 2010).

La caracterización del péptido TcPaSK, realizada en la presente tesis doctoral, pone de manifiesto su gran potencial para uso clínico, puesto que integra tres de las características que

idealmente se consideran esenciales en un péptido terapéutico: reconocimiento específico de las células tumorales, interacción con la membrana y citotoxicidad.

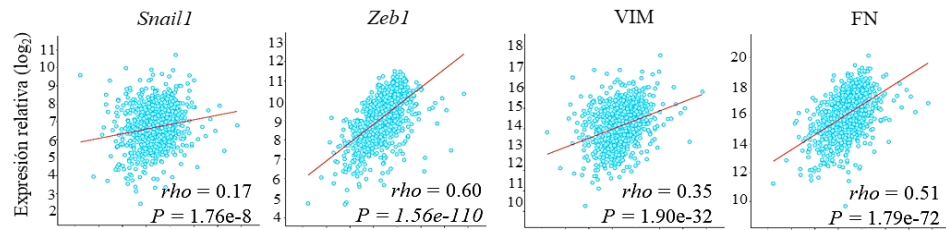
4.2 Análisis de correlación entre la subunidad $\beta 3$ de las integrinas y la expresión génica de marcadores mesenquimales en distintos tipos de carcinomas

Kariya *et al.* (2021) encontraron que en tejidos de adenocarcinoma de pulmón existía una correlación positiva entre el aumento de expresión de la subunidad $\beta 3$ de la integrina $\alpha v\beta 3$ y de los factores de transcripción *Zeb1* y *Zeb2*, los marcadores mesenquimales vimentina y fibronectina y la subunidad αv de la integrina.

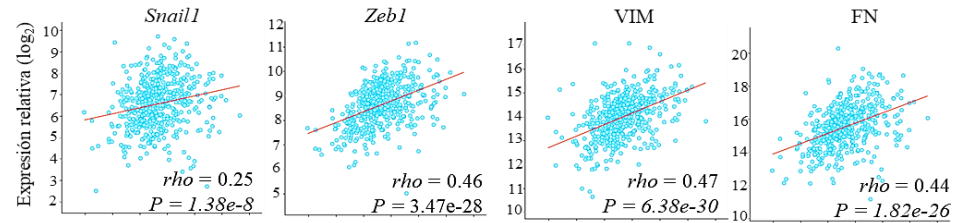
Con la finalidad de explorar la relación entre la subunidad $\beta 3$ y los marcadores de EMT en otros tipos de carcinomas, en colaboración con Cynthia Chardí, utilizamos esta misma aproximación, seleccionando para el análisis de correlación la expresión de los genes que codifican para los factores de transcripción *Snai1* y *Zeb1* y de los marcadores mesenquimales Vimentina y Fibronectina. Empleamos las bases de datos de RNA-Seq data del *The Cancer Genome Atlas (TCGA)* en tejidos de cáncer de mama, pulmón, colon, melanoma, hígado, próstata, ovario, páncreas, tiroides, útero y vejiga (Figura 33). La expresión de los cuatro marcadores de EMT seleccionados se correlaciona positivamente con $\beta 3$ en casi todos los carcinomas analizados, a excepción del melanoma, el carcinoma de tiroides y el carcinoma de útero, en los que la expresión de la vimentina se correlaciona negativamente con $\beta 3$.

En los carcinomas de mama, pulmón, colon, hígado, próstata, ovario, páncreas y vejiga, en los que se vio una correlación positiva en todos los marcadores, el péptido TcPaSK podría ser de utilidad terapéutica.

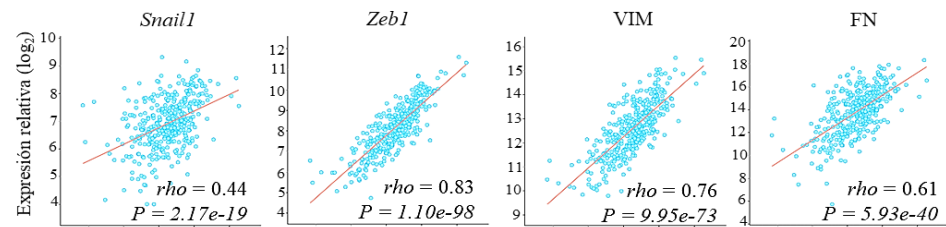
A Carcinomas mamarios



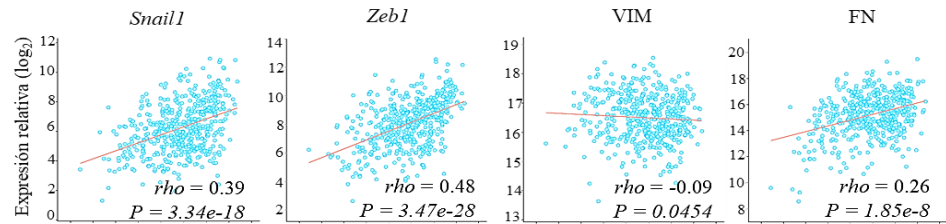
B Carcinomas de pulmón



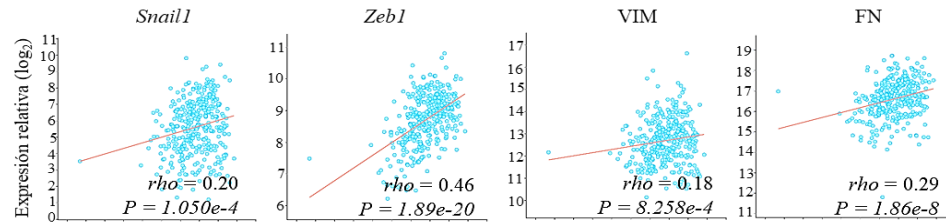
C Carcinomas de colon



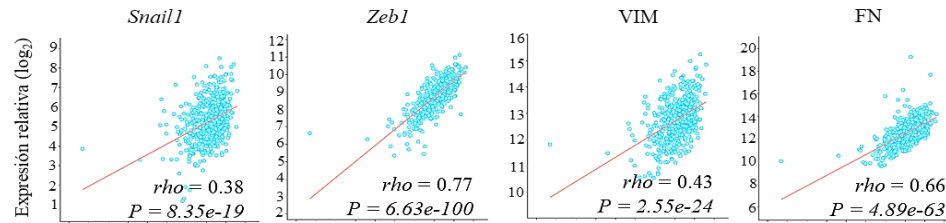
D Melanoma



E Carcinoma de hígado



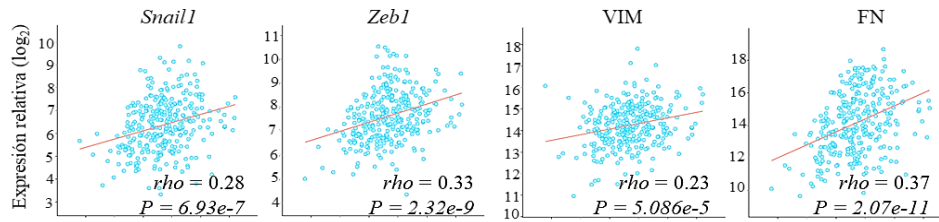
F Carcinoma de próstata



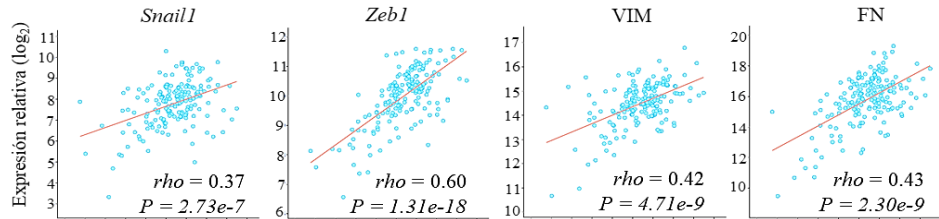
Expresión relativa integrina $\beta 3$ ($\log_2$)

Continuación Figura 33

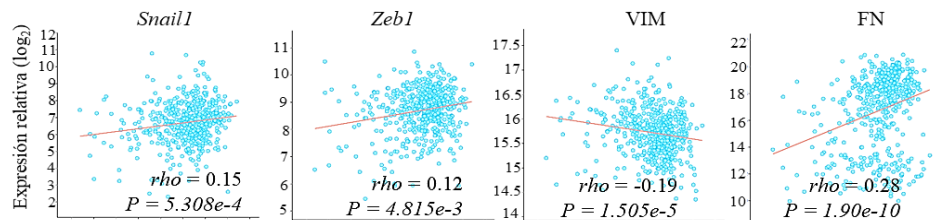
G Carcinomas de ovario



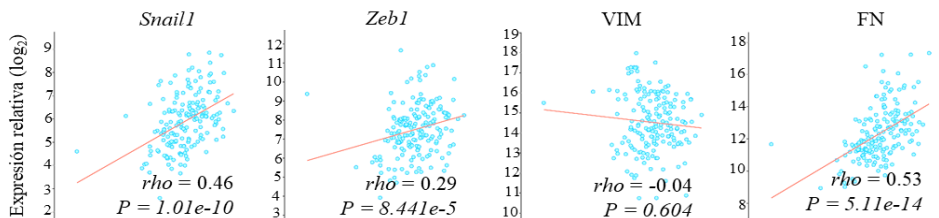
H Carcinomas de páncreas



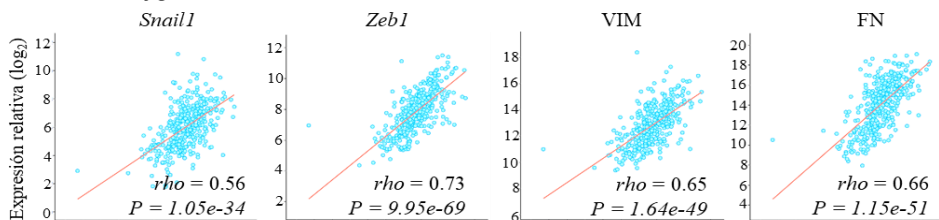
I Carcinomas de tiroides



J Carcinomas de útero



K Carcinomas de vejiga



Expresión relativa integrina $\beta 3$ ($\log_2$)

Figura 33. Análisis de correlación entre la expresión génica de la integrina $\beta 3$ y de marcadores mesenquimales en distintos tipos de carcinomas. Datos de RNAseq de integrina $\beta 3$, *Snail1*, *Zeb1*, Vimentina (VIM) y Fibronectina (FN) obtenidos a partir de las bases de datos *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Carcinomas: A) Mamario, B) Pulmón, C) Colon, D) Melanoma, E) Hígado, F) Próstata, G) Ovario, H) Páncreas, I) Tiroides, J) Útero, K) Vejiga. En las gráficas se muestra el coeficiente de Spearman (ρ) y el p-valor (p).

El desarrollo del programa de EMT es particular de cada tipo de cáncer y su capacidad metastásica va a depender de las señales de inducción de EMT a las que se ven expuestas las células cancerosas a lo largo de la dinámica espacio-temporal de la progresión del tumor. Las células cancerosas que experimentan EMT en el sitio primario del tumor que poseen la habilidad de revertir los procesos de EMT a MET pueden inhibir la progresión del cáncer mediada por EMT. En contraposición, en el sitio secundario, las células cancerosas que reciben señales de inducción de MET promueven la colonización y el crecimiento del tumor en sitios secundarios.

La línea celular MDA-MB-231 exhibe un fenotipo mesenquimal-*like* que dota a las células de características que las hacen altamente metastásicas. En dicha línea celular, hemos mostrado que el efecto del péptido TcPaSK no conduce a una reversión completa a fenotipo epitelial.

Para conseguir una visión representativa de la contribución de la EMT a la cascada metastásica en un tipo particular de cáncer es necesario determinar los niveles de factores de transcripción y marcadores mesenquimales y epiteliales que lo caracterizan. La aproximación *in-silico* empleada, nos ha permitido acceder a un gran número de estos datos en una gran variedad de tumores, para posteriormente poder seleccionar líneas celulares idóneas en las que validar el efecto del péptido TcPaSK observado en células MDA-MB-231.

5. Acción antitumoral del péptido TcPaSK en células tumorales de pulmón

De entre los carcinomas que muestran una correlación positiva entre el aumento de expresión de la subunidad $\beta 3$ de la integrina $\alpha \nu \beta 3$ y de los marcadores mesenquimales analizados en el apartado 4.3, el cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer, seguido del cáncer de colon y de hígado (Sung *et al.*, 2021). Alrededor del 81% de los cánceres de pulmón son de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés) y la tasa de supervivencia a 5 años para los pacientes con este tipo de cáncer es solo del 21% (American Cancer Society, 2023).

La línea celular A549, que deriva de NSCLC, se utiliza ampliamente en investigación como modelo de estudio de cáncer de pulmón y para el desarrollo de fármacos en terapias dirigidas a este tipo de cáncer (Barosova *et al.*, 2021). Seleccionamos dicha línea celular para evaluar el efecto del péptido TcPaSK sobre otra variedad tumoral, llevando a cabo el mismo tipo de experimentos realizados en la línea celular de cáncer mama MDA-MB-231.

5.1 Actividad del péptido TcPaSK en células A549

Se realizaron ensayos MTS para analizar el efecto del péptido TcPaSK en la viabilidad de células A549 tratadas con diferentes concentraciones de TcPaSK. Se observó una disminución de la viabilidad celular estadísticamente significativa en todas las concentraciones con respecto a las células sin tratar (Figura 34). Estos resultados indican que el péptido TcPaSK altera la

viabilidad de las células A549, pero la citotoxicidad del péptido frente a esta línea celular es mucho menor que frente a la línea celular MDA-MB-231, ya que una concentración de péptido de 700 µg/mL que reduce la viabilidad de las células de mama al 50% (Figura 19) tan solo tiene un efecto de alrededor de un 20% de reducción de la viabilidad en la línea celular de pulmón.

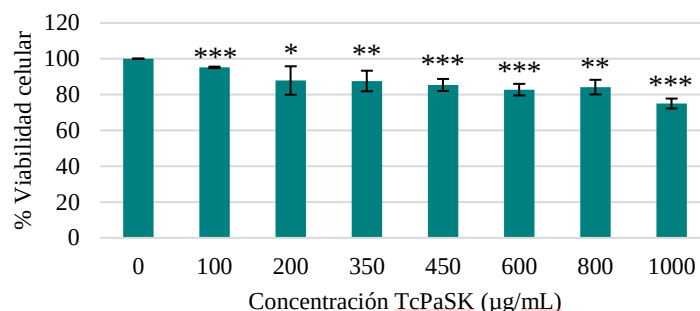


Figura 34. Efecto del péptido TcPaSK en la viabilidad de células tumorales de pulmón. Ensayo MTS de células A549 no tratadas y tratadas con diferentes concentraciones de TcPaSK durante 72 h. Se representan las medias $\pm$ SE de al menos tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Test *t*-Student, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Se han llevado a cabo un buen número de estudios con péptidos dirigidos a células cancerosas de pulmón, aunque muchos de ellos o bien utilizan células de adenocarcinomas diferenciados, o bien no son suficientemente robustos debido a selectividad parcial hacia células NSLC (Chi *et al.*, 2017). En la base de datos “[Cancer PPD](#)” se recogen ensayos realizados en la línea celular A549, incluyendo valores de citotoxicidad experimentalmente verificados de 55 péptidos anticancerígenos lineales, mayoritariamente con regiones de estructura α -helicoidal, y con IC₅₀ muy diversas. Se ha ensayado el efecto de algunos AMPs de insectos en células de pulmón, entre ellos el péptido sintético CB1, derivado del AMP Cecropina B, que mostró citotoxicidad selectiva frente a diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón sin afectar células sanas (Huang *et al.*, 2014).

El análisis de la interacción del péptido TcPaSK con las células A549 mediante microscopía confocal mostró que, tras 15 min de incubación con el péptido, este se encuentra principalmente unido a la membrana celular, aunque también se detecta péptido en el interior de la célula con un patrón punteado típico de vesículas (Figura 35A), al igual que se observó en células MDA-MB-231 (Figura 23A). Cuando las células A549 se trataron con el péptido durante 1 h este se localizó particularmente en el interior de la célula, pero no en el núcleo (Figura 35A).

El análisis mediante microscopía confocal de la interacción del péptido TcPaSK con las células A549, llevado a cabo mediante tratamiento de las mismas con TcPaSK-FITC y con IP, puso de manifiesto que el péptido TcPaSK daña la membrana plasmática de las células A549, permitiendo al IP penetrar en el interior de las células (Figura 35B).

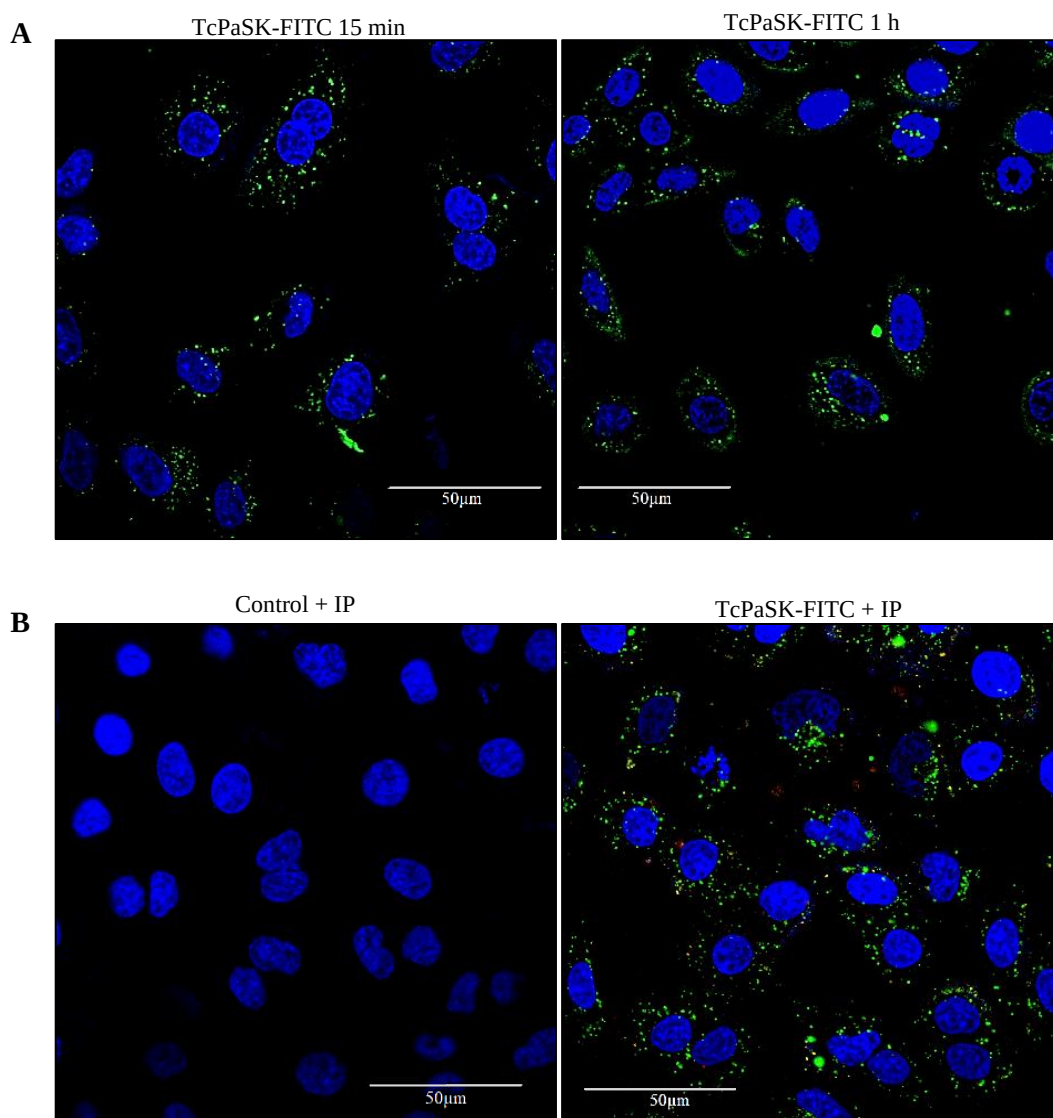


Figura 35. Interacción del péptido TcPaSK con células A549. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal. A) Células A549 tratadas con TcPaSK-FITC (25 $\mu\text{g/mL}$) durante 15 min y 1 h. B) Células A549 no tratadas y tratadas con TcPaSK-FITC durante 1 h y posteriormente incubadas con IP durante 10 min. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Fluorescencia azul corresponde a núcleos teñidos con Hoechst; Fluorescencia verde regiones en las que se localiza TcPaSK-FITC; y fluorescencia roja donde se encuentra IP.

Tras la tinción de células A549 tratadas con el péptido TcPaSK con el marcador de lisosomas LysoTrackerTMRedDND-99, se observó, junto con el patrón punteado de fluorescencia verde correspondiente al péptido TcPaSK (flechas blancas Figura 36A), los endosomas tardíos y lisosomas presentes en las células A549 (Figura 36B), que colocalizan con el péptido en algunos puntos (flechas discontinuas Figura 36C y D). Al igual que en las células MDA-MB-231 (Figura 24), las imágenes de microscopía confocal de las células A549 sugieren que el péptido es transportado al interior de la célula a través de vesículas y se degrada vía lisosomas, lo cual apoya que la internalización del péptido podría producirse por endocitosis.

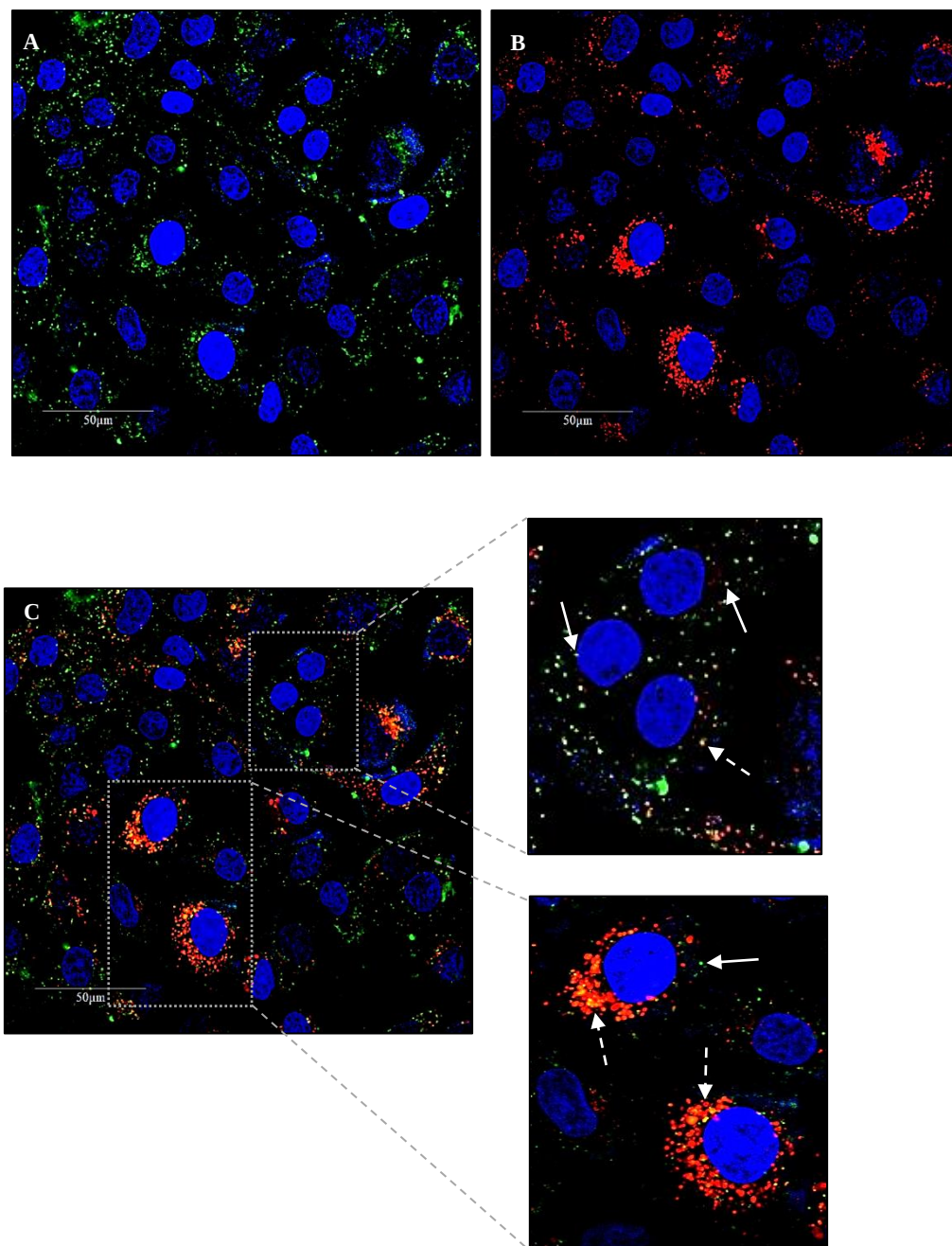


Figura 36. Internalización de TcPaSK en células A549. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de células A549 tratadas con TcPaSK-FITC (200 µg/mL) durante 1 h y posteriormente teñidas con LysoTracker™ Red DND 99 (75 nM). A) Detección de la fluorescencia del péptido TcPaSK-FITC. B) Detección de la fluorescencia de LysoTracker™ Red DND 99 en las células, correspondiente a endosomas tardíos y lisosomas. C) Superposición de las imágenes A) y B), con magnificación de dos secciones en las que la flecha blanca muestra el péptido TcPaSK y la flecha discontinua muestra lisosomas que colocalizan con el péptido TcPaSK. Imágenes representativas de 2 experimentos independientes. La fluorescencia azul corresponde a los núcleos de las células teñidos con Hoechst.

Los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular y de interacción con la membrana con dos tipos de líneas celulares cancerosas caracterizados por una gran capacidad invasiva y de metástasis, como son MDA-MB-231 y A549, muestran un modo de acción común del péptido TcPaSK. A concentraciones subcitotóxicas, el péptido TcPaSK exhibe toxicidad

selectiva hacia las células tumorales, posee capacidad citolítica y penetra en las células por endocitosis a través de vesículas.

5.2 Efecto del péptido TcPaSK sobre factores que determinan la progresión del cáncer y la metástasis en células A549

Mediante Western-Blot se analizaron los niveles de la proteína HIF-1 α en células A549 tratadas y no tratadas con el péptido TcPaSK, en condiciones de normoxia e hipoxia (Figura 37). Observamos que, en las células no tratadas con el péptido y sometidas durante 24 h o 48 h a condiciones de hipoxia, HIF-1 α se acumula porque, tal como se ha descrito en la bibliografía, no es degradada tan rápidamente como ocurre a altas concentraciones de O₂. En las células tratadas 24 h con el péptido, en condiciones de normoxia la cantidad de HIF-1 α es mayor que en las células no tratadas, mientras que en condiciones de hipoxia apenas se observa variación. En células tratadas 48 h con el péptido, aunque tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia se observa una disminución en la cantidad de HIF-1 α , es tras una exposición a condiciones de hipoxia aguda cuando el efecto del péptido TcPaSK es mucho más notable.

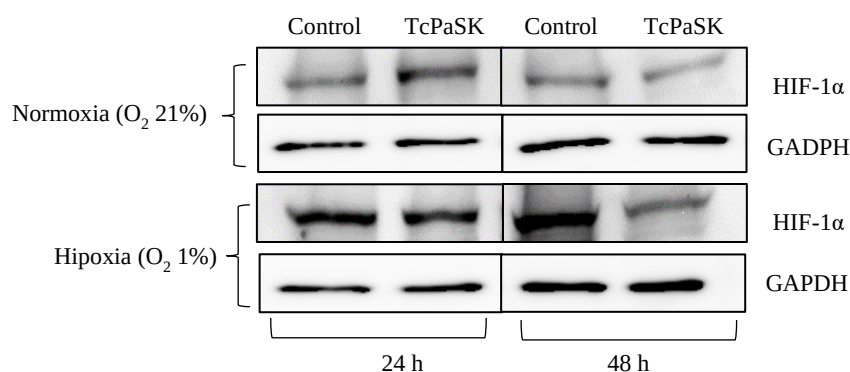


Figura 37. Western-Blot de la proteína HIF-1 α en células A549 tratadas con TcPaSK en condiciones de hipoxia. Bandas correspondientes a la cantidad relativa de proteína HIF-1 α . Las células A549 se trataron con TcPaSK (200 μ g/mL) durante 24 y 48 h en condiciones de normoxia (O₂ 21%) e hipoxia (O₂ 1%). GAPDH se usó como proteína constitutiva de referencia.

La disminución de los niveles de HIF-1 α en condiciones de hipoxia que se observa tanto en las células de mama MDA-MB-231 (Figura 26) como en las células pulmón A549 (Figura 37) sugiere que el péptido puede interferir en la progresión del cáncer mediada por HIF-1 α .

En el microambiente tumoral del cáncer de pulmón la hipoxia es la característica más común y afecta al metabolismo, a la progresión del cáncer y a la metástasis que permite a las células tumorales malignas desplazarse e invadir tejidos circundantes y distantes (Ziółkowska-Suchanek, 2021). La hipoxia y los elevados niveles de ROS modifican el microentorno del tumor,

disruptiendo la distribución simétrica de fosfolípidos entre las caras interior y exterior de la membrana plasmática. Como resultado, se exponen las fosfatidilserinas aniónicas de la capa externa que son muy abundantes en las membranas de las células tumorales, facilitando su reconocimiento por ACPs catiónicos en una primera fase de interacción con la membrana celular (Ghaly *et al.*, 2023).

En la mayoría de cánceres humanos, incluyendo cerebro, mama, pulmón, páncreas, colon, ovario y próstata, se detectan elevados niveles del HIF-1 en relación con los tejidos sanos (Mabjeesh and Amir, 2007). El factor de transcripción HIF-1 α media la adaptación de las células cancerosas a un entorno hipóxico, regulando genes involucrados en funciones celulares clave y contribuyendo a incrementar la agresividad de los tumores (Liu *et al.*, 2022b). Diversos estudios muestran una correlación significativa entre la sobreexpresión de HIF y un pronóstico más desfavorable y menor tasa de supervivencia de los pacientes de cáncer. Actualmente, se están investigando estrategias terapéuticas que tengan como diana HIF-1 α para frenar la progresión de varios tipos de cáncer (Jing *et al.*, 2019), y se ha propuesto que HIF-1 α podría ser utilizado como un marcador de pronóstico de supervivencia (Zhang *et al.*, 2021). Se abre así también la oportunidad de investigar el posible valor predictivo de HIF-1 α para evaluar la respuesta al tratamiento con el péptido TcPaSK en distintos tipos de tumores.

Se examinó la capacidad del péptido TcPaSK para alterar la migración e invasión de células A549, realizando ensayos de cicatrización de herida y cuantificando las células que, tras tratamiento con el péptido TcPaSK, fueron capaces de migrar a través de una membrana de policarbonato (migración) o degradar la matriz extracelular antes de migrar (invasión). Se observó una disminución en la capacidad de cierre de la herida (Figura 38A) y una disminución estadísticamente significativa en la capacidad de migración e invasión de las células A549 tratadas con TcPaSK (Figura 38B y C).

Estos resultados demuestran que, al igual que ocurre en las células MDA-MB-231, el péptido TcPaSK es capaz de disminuir la capacidad metastásica de las células A549, por lo que en estas células estudiamos también la contribución funcional del proceso de EMT a la metástasis.

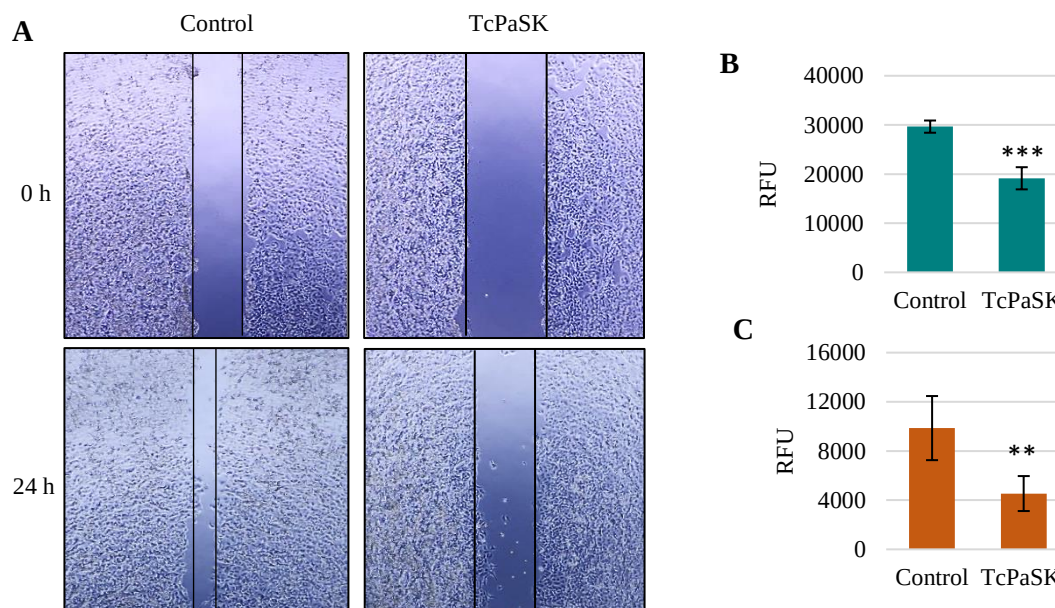


Figura 38. Efecto sobre la capacidad de migración e invasión de células A549 tratadas con el péptido TcPaSK. A) Imágenes de microscopía óptica del ensayo de cicatrización de herida tomadas a tiempo 0 y 24 h. Estría realizada en la monocapa de células A549 confluentes. B) Cuantificación de la fluorescencia relativa (RFU) de células que migran a través de la membrana de policarbonato. C) Cuantificación de células que degradan la matriz extracelular teñidas con CyQuant® GR (invasión celular). Los ensayos fueron realizados en células A549 no tratadas y tratadas con el péptido TcPaSK (200 µg/mL). En las gráficas se representan las medias ± SE de 4 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Test t-Student, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

El análisis mediante RT-qPCR de la expresión de factores de transcripción implicados en la EMT (*Snai1*, *Slug*, *Zeb1*, *Zeb2* y *Twist1*) y genes marcadores mesenquimales y epiteliales implicados en la EMT (*Vimentina*, *Fibronectina*, *N-cadherina*, *E-cadherina*, *Ocludina* y *ZO1*) en células A549 tratadas con el péptido TcPaSK mostró una disminución de la expresión estadísticamente significativa en todos los factores de transcripción analizados, excepto *Zeb2*, y de la de todos los marcadores mesenquimales estudiados (Figura 39A y B). Sin embargo, no se observaron diferencias de expresión en los marcadores epiteliales entre células tratadas y no tratadas con el péptido (Figura 39C). Mediante Western-Blot se confirmó que los niveles de la proteína E-cadherina tampoco variaron después de 24 h de tratamiento de las células A549 con el péptido TcPaSK (Figura 39D). En células MDA-MB-231 obtuvimos estos mismos resultados que indican que el péptido TcPaSK revierte la EMT a MET de forma parcial. En ambas líneas no varía la expresión del marcador epitelial E-cadherina, aunque los niveles de los correspondientes transcritos son mucho más elevados en la línea A549 que en la MDA-MB-231.

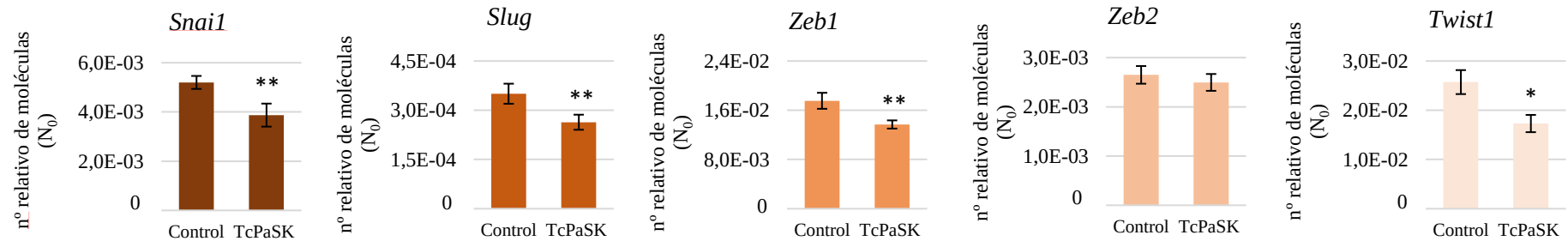
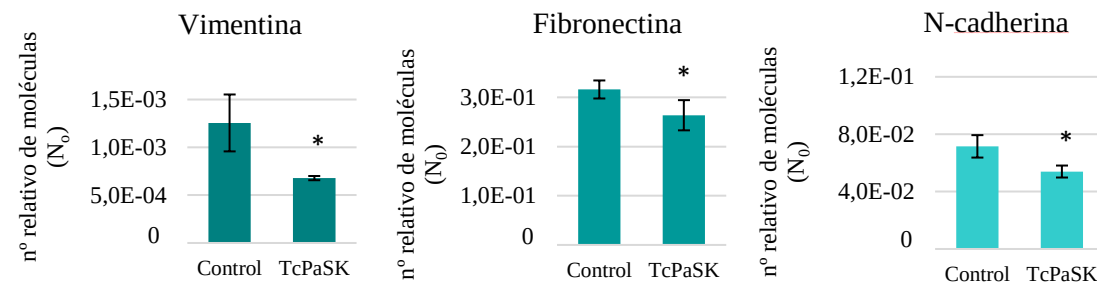
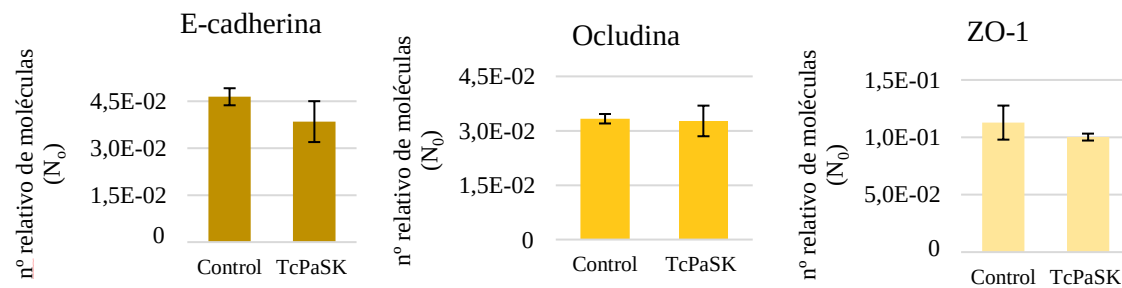
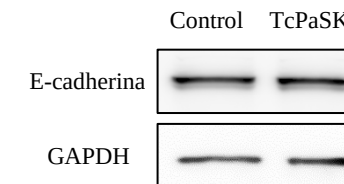
A Factores de transcripción implicados en EMT**B Marcadores mesenquimales implicados en EMT****C Marcadores epiteliales implicados en EMT**

Figura 39. Expresión diferencial de factores de transcripción y genes marcadores de EMT en células A549 tratadas con el péptido TcPaSK. A) Factores de transcripción. B) Marcadores mesenquimales. C) Marcadores epiteliales. D) Western-Blot de la proteína E-cadherina. Las células A549 se trataron con el péptido TcPaSK (200 µg/mL) durante 24 h. GAPDH se usó como proteína constitutiva de referencia. En las gráficas se representan las medias $\pm$ SE de 3 réplicas biológicas. (Test *t-Student*, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

D Western-blot

Tras el tratamiento de las células A549 con el péptido TcPaSK, la represión observada del factor de transcripción *Zeb1* (Figura 39A), regulado por miR200, se correlaciona con un aumento estadísticamente significativo de la expresión de los miR-200a y c, respecto a las no tratadas, (Figura 40A), así como del pri-miR200a (transcrito primario de miR200a y b) (Figura 40B). El miR-200b no se pudo amplificar en células A549.

Se ha descrito que la expresión de la familia miR-200 se encuentra reprimida en cáncer de pulmón metastásico, comparando su expresión con la de tumores primarios, y se ha asociado miR-200c como marcador de supervivencia en estadios tempranos de NSCLC (Garinet *et al.*, 2021). Tanto en la línea celular MDA-MB-231 como en la A549 observamos un aumento significativo de la expresión de los transcritos primarios miR200a y c en las células tratadas con TcPaSK (Figura 31B y Figura 40B).

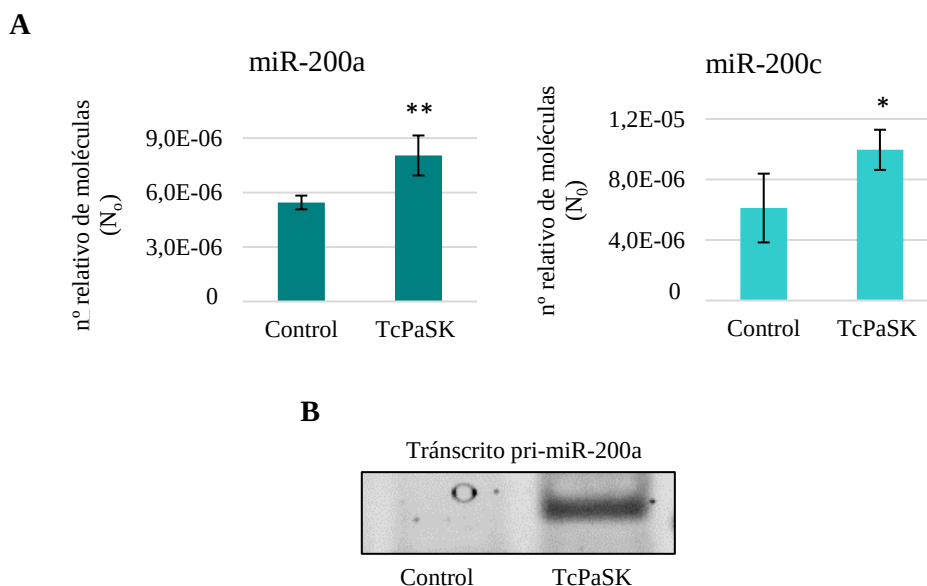


Figura 40. Expresión de la familia miR-200 en células A549 tratadas con el péptido TcPaSK. A) Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de miR-200a y c en células A549 no tratadas y tratadas con el péptido TcPaSK (200 µg/mL) durante 24 h. B) Electroforesis del producto amplificado por PCR correspondiente al pri-miR200a que codifica para miR-200a y b en células A549 no tratadas y tratadas con el péptido TcPaSK (200 µg/mL) durante 24 h. En las gráficas se representan las medias $\pm$ SE de 3 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Test t-Student, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

Los miARNs se transcriben como transcritos primarios mucho más grandes (pri-miARNs). En diversos estudios se ha visto que los pri-miARN de plantas contienen pautas de lectura abiertas que codifican para péptidos reguladores de sus propios miARNs (Lauressergues *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2020; Ormancey *et al.*, 2021). Recientemente, se ha encontrado en humanos un pri-miR200 con ORFs que codifican para los péptidos miPEP-200a y miPEP-200b en células tumorales que se ha descrito que inhiben la migración celular regulando la EMT y se ha propuesto su utilidad como marcadores de diagnóstico de metástasis o como agentes terapéuticos (Fang *et al.*, 2017). Algunos estudios sugieren que estos miPEPs podrían actuar

independientemente de los correspondientes miRNAs (Prel *et al.*, 2021). Estos hallazgos han abierto un atractivo campo de investigación sobre la función del ADN no codificante y sus miRNAs no codificantes en cáncer y sus aplicaciones terapéuticas.

Al igual que se hizo en las células MDA-MB-231 (apartado 3.3), analizamos la expresión del gen *ESRP1*, implicado en el cambio de isoformas en CD44 y por ende en la promoción de la EMT. No se observó variación estadísticamente significativa en la expresión de *ESRP1* (aunque la tendencia es una reducción de la expresión en respuesta al tratamiento con el péptido), pero sí una disminución estadísticamente significativa tanto de la isoforma estándar de CD44 como de la completa (Figura 41). Estos resultados corroboran que el tratamiento de las células A549 con el péptido TcPaSK, de igual modo que ocurre en células MDA-MB-231, altera la EMT, provoca una disminución de la forma completa de CD44 que daría cuenta de la reducción de la expresión de la isoforma CD44s, y esta no sería debida a una alteración del *splicing* mediado por *ESRP1*.

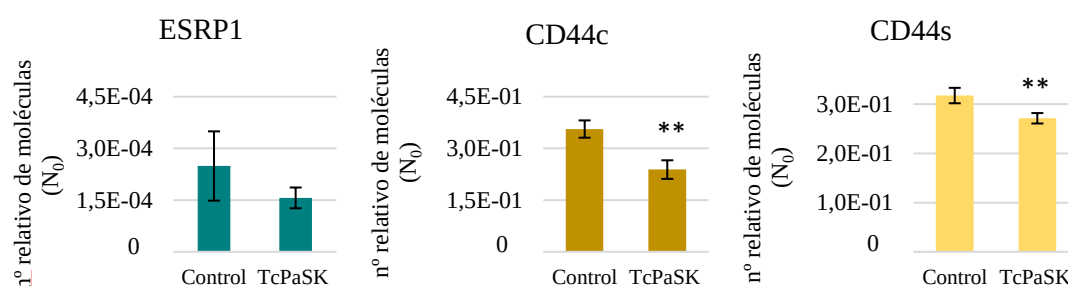


Figura 41. Análisis de la expresión de las isoformas de CD44 estándar y CD44 completa tras el tratamiento de células A549 con el péptido TcPaSK. La expresión de los genes que codifican para *ESRP1* y para las isoformas CD44 estándar y CD44 completa en células A549 no tratadas y tratadas con (200 µg/mL) durante 24 h se analizó mediante RT-qPCR. En las gráficas se representan las medias $\pm$ SE de 3 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Test *t-Student*, ** $p \leq 0,01$).

CD44 es un marcador de células CSC que se ha asociado con una peor prognosis en pacientes con tumores NSCLC. Hu *et al.* (2018a) investigaron el efecto de CD44 en la proliferación de 6 líneas celulares NSCLC (H1975, H1299, H520, A549, PC-9 y GLC82) evidenciando la implicación de CD44 en la progresión del cáncer de pulmón. En células A549, demostraron que la inhibición de CD44 mediante siARNs suprime la proliferación celular y la capacidad de formar colonias.

El efecto del péptido TcPaSK disminuyendo la movilidad e invasión de las líneas celulares de cáncer de mama y pulmón estudiadas se correlaciona con una represión de la expresión de factores de transcripción, genes marcadores mesenquimales y del gen marcador de troncalidad CD44, relacionados con EMT. El complejo programa biológico de EMT es fundamental en el proceso de carcinogénesis, por lo que tratamientos que incluyan el péptido TcPaSK pueden constituir una atractiva estrategia terapéutica dirigida a EMT.

5.3 Reconocimiento y señalización celular del péptido TcPaSK vía integrina $\alpha\beta 3$ /TGF- $\beta 1$, en células A549

Evaluamos si, como hemos propuesto en el caso de las células MDA-MB-231 (apartado 4.1), la interacción con la membrana celular por parte del péptido TcPaSK podría estar mediada por la integrina $\alpha\beta 3$. Mediante microscopía confocal comprobamos que en células A549 tratadas con TcPaSK-FITC e incubadas previamente con anticuerpo anti-integrina $\alpha\beta 3$ el anticuerpo impide la unión del péptido TcPaSK a la superficie de las células A549, sugiriendo así la interacción directa del péptido a través de integrinas $\alpha\beta 3$ (Figura 42).

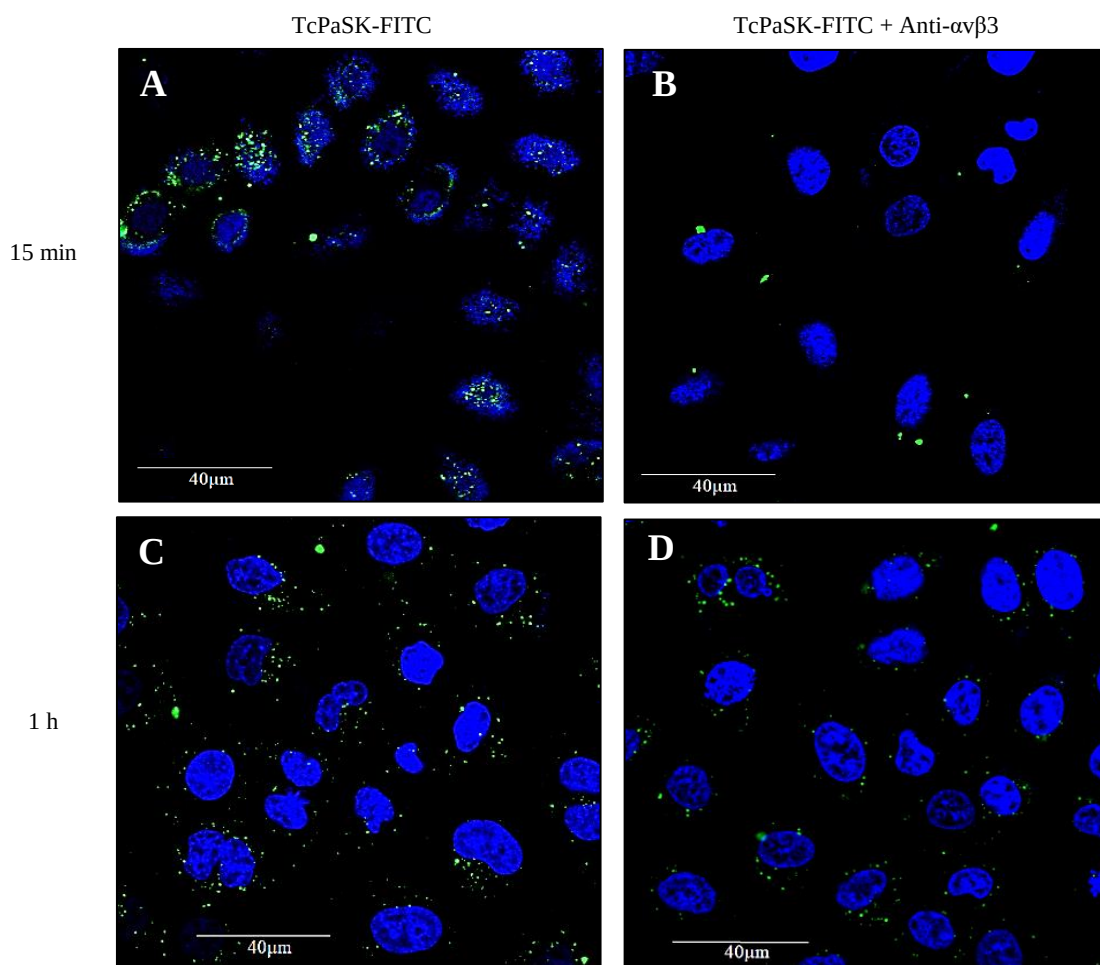


Figura 42. Análisis de la interacción del péptido TcPaSK con células A549 mediante microscopía confocal. Imágenes de células A549 tratadas con el péptido TcPaSK-FITC (25 $\mu\text{g/mL}$) durante 15 min (panel A) o 1 h (panel B), previa incubación durante 30 min con el anticuerpo anti- $\alpha\beta 3$ (10 $\mu\text{g/mL}$) (paneles C y D). Fluorescencia azul corresponde a núcleos teñidos con Hoechst; fluorescencia verde a regiones en las que se localiza TcPaSK-FITC.

Por otra parte, como se ha descrito en las células MDA-MB-231 (apartado 3.1), comprobamos que el péptido TcPaSK disminuye la adhesión de células A549 ya que se observó una reducción estadísticamente significativa del número de células adherentes cuando son tratadas con dicho péptido, como también ocurre cuando se bloquea la integrina $\alpha\beta 3$ por incubación con anti-integrina $\alpha\beta 3$ (Figura 43A).

Se ha descrito que la expresión de los genes de algunas de las integrinas, y entre ellas la $\alpha\beta3$, está inducida por el factor de crecimiento TGF- $\beta1$ durante la EMT (Mori *et al.*, 2015). El incremento de la migración de células de glioma mediada por TGF- β vía inducción de la expresión de la integrina $\alpha\beta3$ fue bloqueada por equistatina, péptido de 49 aminoácidos derivado del veneno de serpiente, que contiene el motivo RGD y es un potente antagonista de la integrina $\alpha\beta3$ (Platten *et al.*, 2001).

Se realizaron ensayos de migración celular en células A459 tratadas con el péptido TcPaSK, inducidas y no inducidas previamente con TGF- $\beta1$ (Figura 43B). El tratamiento de las células con TGF- $\beta1$ produjo un aumento estadísticamente significativo de la migración celular. A pesar de ello, en las células inducidas con TGF- $\beta1$ y tratadas con el péptido TcPaSK se observó una disminución estadísticamente significativa de la migración celular. Estos resultados apoyan que la integrina $\alpha\beta3$ puede ser una diana del péptido TcPaSK.

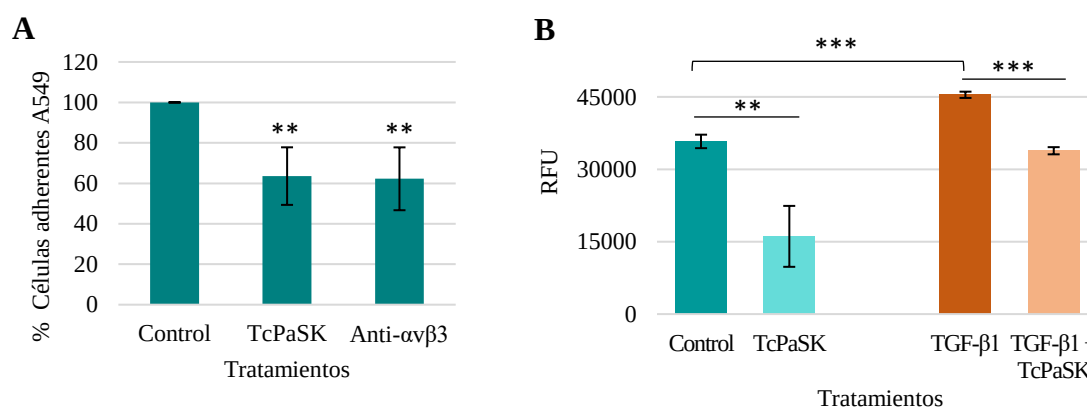


Figura 43. Efecto del péptido TcPaSK sobre la adhesión y la migración de células A549 inducidas por TGF- $\beta1$. A) Cuantificación del porcentaje de células adherentes. Ensayos realizados en células A549 control y tratadas con el péptido TcPaSK (200 $\mu\text{g/mL}$) y anti- $\alpha\beta3$ (10 $\mu\text{g/mL}$). B) Cuantificación de migración celular en células A549 inducidas con TGF- $\beta1$ (5 ng/mL) control y tratadas con el péptido TcPaSK (200 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 h. En las gráficas se representan las medias $\pm$ SE de al menos réplicas 3 biológicas con 4 réplicas técnicas cada una. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Test t-Student, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

El efecto de TGF- β en el desarrollo tumoral es muy variable y depende fundamentalmente del tipo celular y del contexto del microambiente tumoral en el que se encuentren las células. Se ha demostrado que la integrina $\alpha\beta3$ participa en la transducción de señales de diversas vías implicadas en proliferación tumoral y metástasis (Cheng *et al.*, 2021) y puede inducir EMT parcial, independientemente de la señalización vía TGF- $\beta1$ en células tumorales de pulmón (Kariya *et al.*, 2021). Los detalles moleculares del circuito de señalización alterado por efecto del péptido TcPaSK requieren de un futuro análisis en profundidad.

6. Efecto citotóxico de tratamientos combinados del péptido TcPaSK con agentes quimioterapéuticos en líneas celulares de cáncer de mama y de pulmón

La terapia del cáncer basada en la combinación de compuestos quimioterapéuticos con péptidos anticancerígenos está emergiendo como una importante estrategia para lograr efectos sinérgicos en la lucha contra el cáncer, ya que se ha demostrado que sensibilizan a las células frente a los fármacos y minimizan los problemas de la quimioterapia convencional (Thundimadathil, 2012).

Los resultados del efecto antitumoral del péptido TcPaSK a concentraciones subcitotóxicas, observados tanto en la línea celular MDA-MB-231 como en la A549, sugieren que dicho péptido podría potenciar el efecto de la quimioterapia. En este apartado evaluamos el efecto citotóxico en células tumorales MDA-MB-231 y A549 del tratamiento combinado del péptido TcPaSK con compuestos quimioterapéuticos.

6.1 Evaluación de la actividad citotóxica de tratamientos combinados del péptido TcPaSK con diferentes compuestos quimioterapéuticos en células MDA-MB-231

En el análisis proteómico diferencial realizado anteriormente en nuestro laboratorio mediante SWATH, se encontraron 14 proteínas cuya cantidad relativa disminuía en células MDA-MB-231 tratadas con concentraciones subcitotóxicas del péptido TcPaSK con respecto a las no tratadas (Robles-Fort *et al.*, 2021). Se ha descrito que la represión de los genes que codifican para 4 de estas 14 proteínas (LARP1, ASNA1, UROD y TM9SF4) está asociada con la sensibilización de las células tumorales a la radioterapia y al tratamiento con distintos agentes quimioterapéuticos, como el cisplatino, el paclitaxel y el 5-fluoracilo, en diferentes tipos de cáncer (Hemmingsson *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2011; Lozupone *et al.*, 2015; Hopkins *et al.*, 2016). Con la finalidad de determinar si la reducción observada tras el tratamiento con el péptido TcPaSK en las cuatro proteínas anteriores se debe a la represión transcripcional de los genes que las codifican o a una regulación post-transcripcional, se realizaron análisis mediante RT-qPCR de la expresión de dichos genes en células MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK. Se observó una disminución estadísticamente significativa en la expresión de los cuatro genes estudiados (Figura 44), correlacionable con la reducción de las correspondientes proteínas detectada en el análisis proteómico previo. Estos resultados avalan la potencialidad del péptido TcPaSK para su utilización en el desarrollo de estrategias de sensibilización a la quimioterapia en células tumorales de mama.

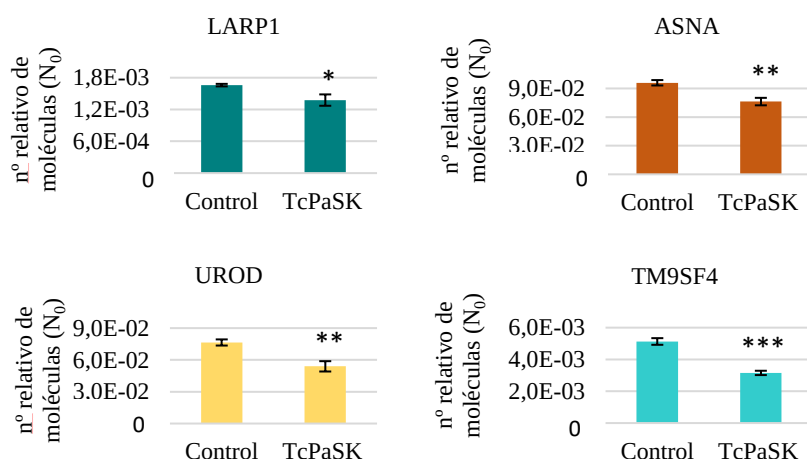


Figura 44. Efecto del tratamiento de células MDA-MB-231 con el péptido TcPaSK en la expresión de genes que sensibilizan a las células frente a quimioterapia. La expresión de los genes *LARP1*, *ASNA*, *UROD* y *TM9SF4* se analizó mediante RT-qPCR en células MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK (100 µg/mL) durante 48 h. En las gráficas se representan las medias $\pm$ SE de al menos tres réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Test *t-Student*, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

En experimentos realizados en colaboración con el Laboratorio de Polímeros Terapéuticos del Centro de Investigación Príncipe Felipe evaluamos la viabilidad de células MDA-MB-231 en tratamientos combinados utilizando concentraciones subcitotóxicas del péptido TcPaSK con compuestos quimioterapéuticos que presentan diferente modo de acción, como son doxorrubicina, cisplatino, paclitaxel y 5-fluorouracilo.

En las células MDA-MB-231 tratadas con el péptido TcPaSK en combinación con doxorrubicina o con cisplatino se observó una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular en comparación con las células tratadas únicamente con doxorrubicina o cisplatino, en todas las concentraciones ensayadas (Figura 45A y B). En el caso de la doxorrubicina, la EC_{50} disminuyó de $0,407 \pm 0,033$ µM a $0,077 \pm 0,026$ µM en combinación con TcPaSK, mientras que en la combinación del péptido con cisplatino se redujo de $168,16 \pm 53,89$ µM a $22,50 \pm 4,29$ µM. El efecto sobre la viabilidad de las células MDA-MB-231 tratadas con combinaciones del péptido TcPaSK con paclitaxel o con 5-fluorouracilo no fue consistente y la disminución de las correspondientes EC_{50} fue mucho menor que con doxorrubicina o cisplatino (para el paclitaxel reducción de $0,008 \pm 0,005$ µM a $0,003 \pm 0,002$ µM; para 5-fluorouracilo reducción de $25,34 \pm 4,33$ µM a $12,22 \pm 2,72$ µM) (Figura 45C y D). Estos resultados apoyan el potencial del péptido TcPaSK para incrementar la eficacia antitumoral de los tratamientos con los agentes quimioterapéuticos doxorrubicina y cisplatino.

Varios estudios demuestran las propiedades quimiosensibilizantes de los AMPs. Hilchie *et al.* (2011) mostraron que dosis subletales de los AMPs NRC-03 y NRC-07 reducen significativamente la EC_{50} del cisplatino en células de carcinoma mamario. En otro estudio, la administración de doxorrubicina en combinación con concentraciones subcitotóxicas de

Nisina a células de cáncer de mama resultó en una citotoxicidad tres veces mayor respecto de la administración con el fármaco solo (Avand *et al.*, 2018).

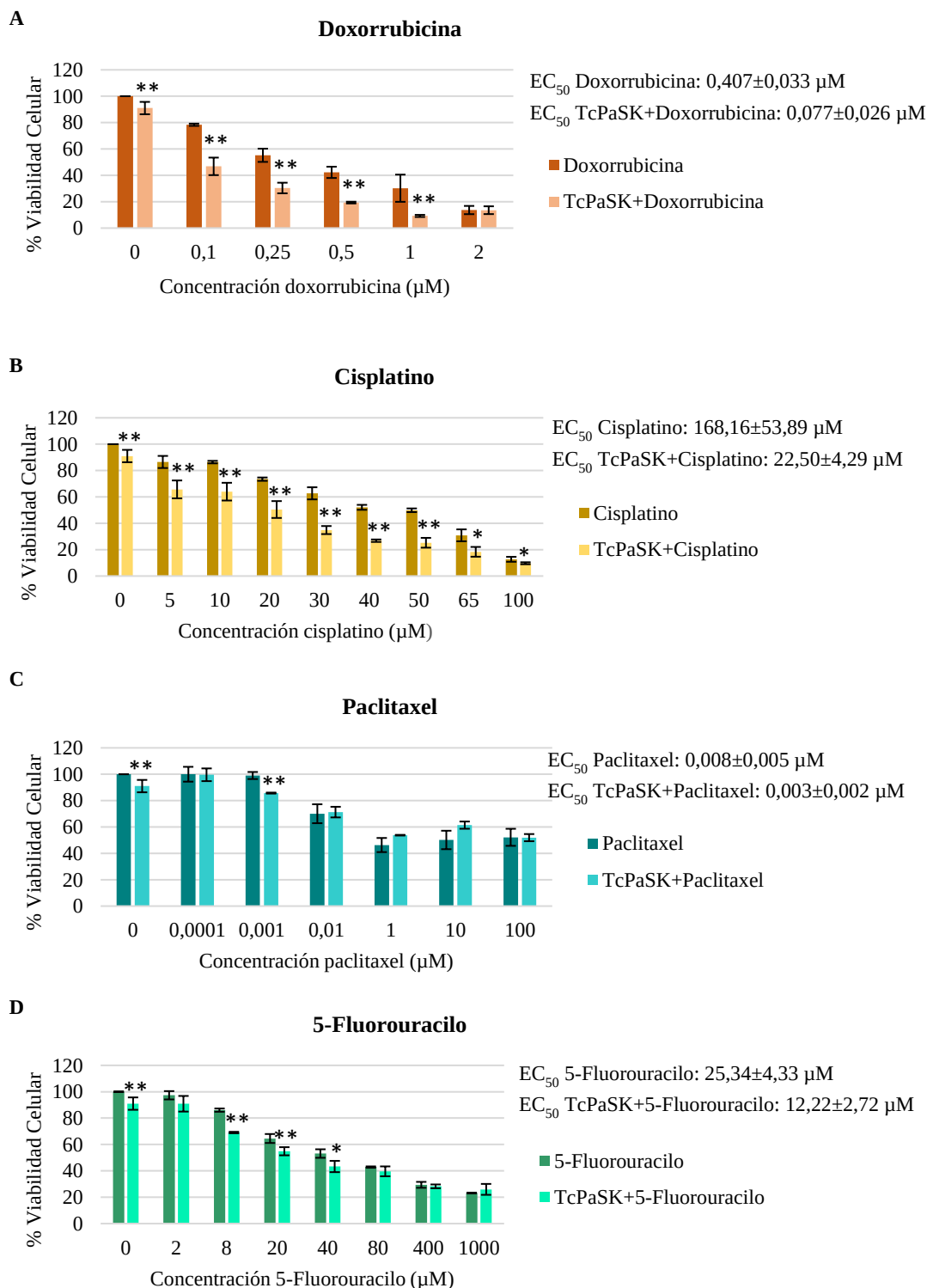


Figura 45. Evaluación de la actividad citotóxica en células MDA-MB-231 de tratamientos con diferentes compuestos quimioterapéuticos en combinación con el péptido TcPaSK. Se realizaron ensayos MTS comparando la viabilidad de células MDA-MB-231 tratadas durante 72 h con combinaciones del péptido TcPaSK (100 μg/mL) con A) Doxorubicina B) Cisplatino C) Paclitaxel y D) 5-Fluorouracilo. En las gráficas se representan las medias ± SE de al menos 3 réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Test *t-Student*, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). Las EC₅₀ se calcularon con la herramienta Quest Graph™ EC50 Calculator. AAT Bioquest. <https://www.aatbio.com/tools/ec50-calculator>.

Actualmente, la quimioterapia es la única opción de tratamiento sistémico contra el TNBC. Sin embargo, una exposición prolongada a los agentes quimioterapéuticos puede generar una respuesta celular adaptativa que resulta en la inducción de resistencia a la medicación (Nedeljković y Damjanović, 2019; Jin *et al.*, 2020). La quimioterapia basada en antraciclina/taxano, tanto como terapia neoadyuvante o adyuvante, es el tratamiento estándar para el TNBC (Furlanetto y Loibl, 2020). Entre las antraciclinas, la doxorrubicina es una de las más comúnmente utilizadas. Nuevas evidencias sugieren que las células madre cancerosas de mama (BCSCs, por sus siglas en inglés) y la EMT pueden estar implicadas en la resistencia a doxorrubicina (Paramanantham *et al.*, 2021). Además, se ha comprobado que HIF-1 α también está implicada en la resistencia de las células MDA-MB-231 a doxorrubicina (Dai *et al.*, 2014). Por todo ello, la combinación del péptido TcPaSK con doxorrubicina puede resultar un tratamiento combinado clínicamente relevante para aumentar la eficiencia terapéutica de doxorrubicina. Por una parte, porque la utilización de dosis menores de doxorrubicina reduciría sus efectos secundarios y, por otra, porque la utilización de dos compuestos con distinto modo de acción disminuye la posibilidad de que se desarrollen células cancerosas resistentes.

Estudiamos la localización intracelular de la doxorrubicina en células MDA-MB-231 tratadas y no tratadas con el péptido TcPaSK. En células únicamente tratadas con doxorrubicina, aprovechando sus propiedades autofluorescentes, se observó un patrón punteado en el citoplasma (Figura 46A). En células tratadas con doxorrubicina y TcPaSK-FITC la acumulación de doxorrubicina fue mayor y, además de en el citoplasma, se localizó en el núcleo (Figura 46B). Se observó colocalización de la doxorrubicina y el péptido TcPaSK-FITC en algunos puntos del patrón punteado del citoplasma, pero no en el núcleo donde no se localizó el péptido TcPaSK-FITC (Figura 46B).

Los mecanismos por los cuales la doxorrubicina ejerce su citotoxicidad son muy complejos, pero está establecido que actúa principalmente por intercalación en el ADN y por interacción con componentes nucleares, principalmente con la ADN topoisomerasa II (Micallef and Baron, 2020). Los experimentos realizados muestran que el tratamiento combinado de doxorrubicina con el péptido TcPaSK facilita la acumulación de doxorrubicina en el núcleo, y esto podría dar cuenta, en parte, de la disminución de la EC₅₀ observada en los ensayos de viabilidad celular con el tratamiento combinado (Figura 45). En la línea celular MCF-7/ADR resistente a doxorrubicina se ha descrito que el tratamiento con el péptido catiónico anticancerígeno L-K6 produjo un incremento en la acumulación intracelular de doxorrubicina revirtiendo el fenotipo resistente a dicho compuesto quimioterapéutico (Wang *et al.*, 2021b).

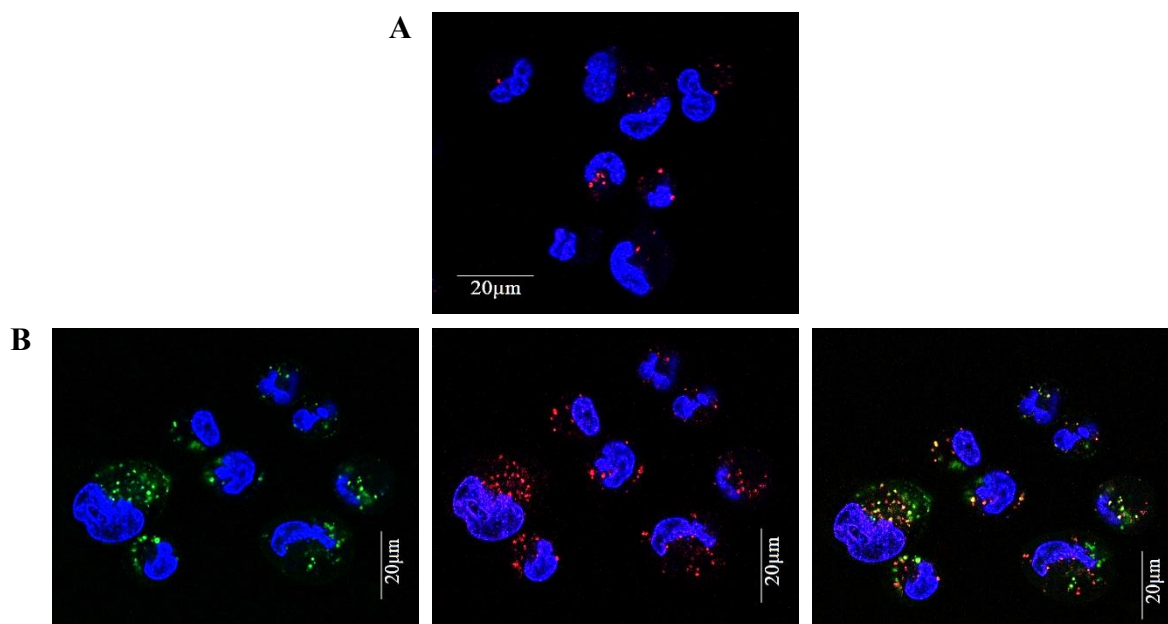


Figura 46. Análisis mediante microscopia confocal de células MDA-MB-231 tratadas con doxorubicina en presencia del péptido TcPaSK. Imágenes de células MDA-MB-231 tratadas con: (A) doxorubicina (0,20 μ M), durante 1 h; (B) péptido TcPaSK-FITC (25 μ g/mL) y doxorubicina (0,20 μ M), durante 1 h. Imágenes representativas de 2 experimentos independientes. Fluorescencia azul corresponde a núcleos teñidos con Hoechst; fluorescencia roja a la autofluorescencia de la doxorubicina; fluorescencia verde a regiones en las que se localiza TcPaSK-FITC.

En un gran número de tipos de cánceres, particularmente colorectal, gástrico, mama e hígado, se ha demostrado resistencia a doxorubicina (Micallef y Baron, 2020). Nuestros resultados apoyan los beneficios potenciales de la combinación de doxorubicina, u otros agentes antineoplásicos convencionales como cisplatino, con un péptido que reúne las propiedades que hemos demostrado en el péptido TcPaSK para contrarrestar el desarrollo de resistencia en los tratamientos quimioterapéuticos.

6.2 Evaluación de la actividad citotóxica de tratamientos combinados del péptido TcPaSK con el compuesto quimioterapéutico doxorubicina en células A549

Previamente a la realización de ensayos de citotoxicidad en células A549 sometidas a tratamientos combinados, al igual que se realizó en el apartado 6.1 en células MDA-MB-231, se analizó mediante RT-qPCR la expresión de los genes estudiados como biomarcadores de resistencia a quimioterapéuticos: *LARP1*, *ASNA1*, *UROD* y *TM9SF4*. Se observaron disminuciones estadísticamente significativas en la expresión de tres de los cuatro genes (*LARP1*, *ASNA1* y *TM9SF4*) (Figura 47), cuya expresión también disminuyó significativamente en la línea celular de cáncer de mama y que, por tanto, podrían ser de utilidad como biomarcadores para monitorizar el efecto del péptido TcPaSK.

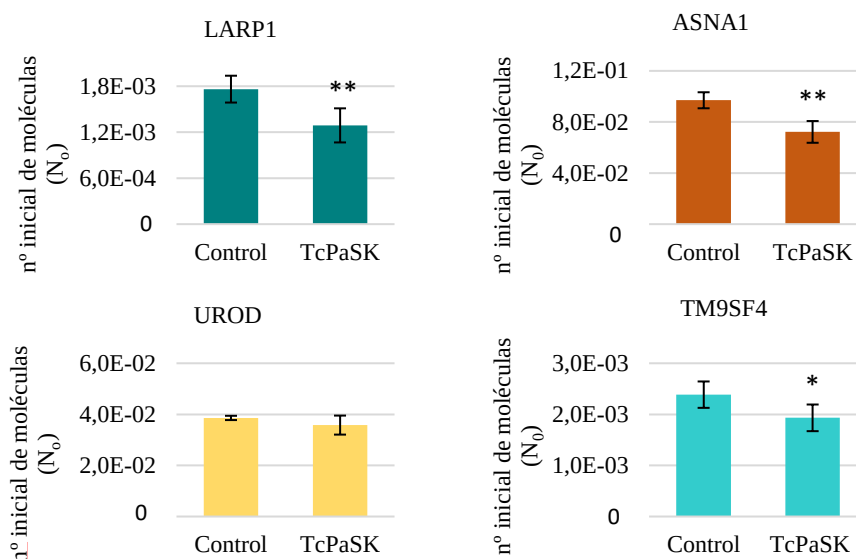


Figura 47. Análisis de la expresión de genes biomarcadores de resistencia a quimioterapia en células A549 tratadas con el péptido TcPaSK. La expresión de los genes *LARP1*, *ASNA*, *UROD* y *TM9SF4* se analizó mediante RT-qPCR en células A549 tratadas con el péptido TcPaSK (200 µg/mL) durante 48 h. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. En las gráficas se representan las medias $\pm$ SE de al menos tres réplicas biológicas (Test *t-Student*, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

Se evaluó mediante ensayos MTS el efecto sobre la viabilidad de células A549 del tratamiento con el quimioterapéutico doxorrubicina en combinación con una concentración subcitotóxica del péptido TcPaSK, encontrándose una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular a concentraciones de doxorrubicina mayores de 1 µM, con respecto a la viabilidad de células tratadas únicamente con doxorrubicina (Figura 48). La EC_{50} de la doxorrubicina en combinación con el péptido TcPaSK disminuye de $2,061 \pm 0,176$ µM a $1,324 \pm 0,059$ µM.

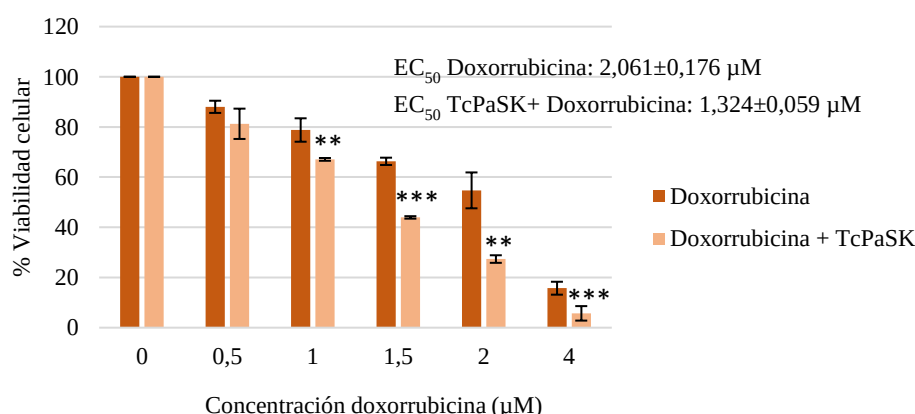


Figura 48. Evaluación de la actividad citotóxica del quimioterapéutico doxorrubicina en combinación con el péptido TcPaSK en células A549. Se realizaron ensayos MTS comparando la viabilidad de células A549 tratadas con doxorrubicina en combinación con el péptido TcPaSK (200 µg/mL) durante 72 h. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. En las gráficas se representan las medias $\pm$ SE de al menos tres réplicas biológicas. (Test *t-Student*, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). La EC_{50} se calculó con la herramienta Quest Graph™ EC50 Calculator. AAT Bioquest. <https://www.aatbio.com/tools/ec50-calculator>.

La quimioterapia es el procedimiento clínico con mayor peso en el tratamiento del NSCLC. Uno de los principales obstáculos para el tratamiento con doxorrubicina de los pacientes con NSCLC es el desarrollo de resistencias contra este quimioterapéutico (Jin *et al.*, 2020). Nuestros resultados confirman que la combinación de doxorrubicina con concentraciones subcitotóxicas de TcPaSK aumenta la eficacia de este compuesto quimioterapéutico también en células A549, aunque la sensibilidad a doxorrubicina de esta línea tumoral es menor que la de las células MDA-MB-231. En ambos tipos celulares, en los tratamientos combinados de doxorrubicina con el péptido TcPaSK ya se detecta una disminución adicional de la viabilidad por efecto de dicho péptido a concentraciones de doxorrubicina que en ausencia del péptido producen una viabilidad celular del 80% (Figuras 45A y 48).

7. Desarrollo de conjugados poliméricos terapéuticos del péptido TcPaSK para su uso en estrategias de sensibilización a la quimioterapia

La conjugación de AMPs con polímeros mejora la utilidad terapéutica de estos, ya que aumenta su solubilidad, los protege de la degradación por proteasas y se generan moléculas de mayor tamaño que evitan la filtración renal rápida prolongando así su circulación en el torrente sanguíneo. Otros importantes beneficios que ofrecen los conjugados de AMPs son que permiten controlar la tasa de liberación del fármaco, aumentar su eficacia y mejorar la farmacocinética, lo que posibilita una reducción de la dosis para conseguir una misma efectividad (Ekladios *et al.*, 2019; Cui *et al.*, 2021).

En colaboración con el Laboratorio de Polímeros Terapéuticos del Centro de Investigación Príncipe Felipe se sintetizaron varios conjugados del péptido TcPaSK con la finalidad de encontrar un polímero que confiriese al péptido estabilidad frente a la degradación y capacidad para actuar en sinergia con agentes quimioterapéuticos.

En una primera aproximación, para la conjugación del péptido TcPaSK se utilizaron los grupos sulfidrilos presentes en las cisteínas del péptido TcPaSK y como portador polimérico el ácido poliglútmico (PGA). En el polímero se modificó el PGA lineal de dos formas alternativas: (1) con grupos sulfidrilos activados ((*S*)-2-pyridylthio cysteamine, PD) para a continuación unir el péptido vía enlace disulfuro utilizando enlaces biodegradables (polímero PGA-PD-TcPaSK); (2) con grupos maleimida para su posterior enlace con los grupos SH- del péptido (polímero PGA-Mal-TcPaSK). El péptido posee una complejidad añadida ya que presenta cuatro cisteínas que, a pesar de formar dos puentes disulfuro internos, pueden dar lugar a entrecruzamientos con el polímero. Ambos conjugados fueron sintetizados con éxito (Tabla 10), obteniéndose 0.5% y 1% molar de carga de péptido (analizado por ¹H-NMR).

En una segunda aproximación, con el fin de exponer el péptido para su óptima interacción con la membrana de las células tumorales, se utilizó como portador polisarcosina (PSar), polímero

polipeptido hidrofílico no inmunogénico con capacidades “stealth” similar al conocido polietilenglicol (PEG), pero que podría evitar reacciones de hipersensitividad. A diferencia del PGA, la conjugación a PSar es semitelequímica, a través de un único punto de anclaje al portador. La conjugación se realizó de dos formas alternativas: (1) mediante enlaces no biodegradables, usando los grupos NH_2 - libres del péptido y un grupo carboxilo activado de la polisarcosina (N-hydroxysuccinimide, NHS) (polímero PSar-NHS-TcPaSK) y (2) mediante enlace biodegradable bisulfuro, empleando PSar modificada con un grupo PD (polímero PSar-PD-TcPaSK). En este caso los porcentajes de carga fueron 25.6% y 7.9% molar, respectivamente (Tabla 10).

Tabla 10. Polímeros conjugados del péptido TcPaSK sintetizados.

Conjugado	Tipo enlace	%mol TcPaSK	%peso TcPaSK	Tamaño (nm)
PGA-PG-TcPaSK	Disulfuro	0,5	10,5	192 $\pm$ 25
PGA-Mal-TcPaSK	Maleimida	1	21	80 $\pm$ 16
Psar-NHS-TcPaSK	Amida	64	25,6	3,9 $\pm$ 1,2
Psar-PD-TcPaSK	Disulfuro	24,7	7,9	4,5 $\pm$ 0,4

7.1 Evaluación de la actividad citotóxica de distintos conjugados poliméricos del péptido TcPaSK en la línea celular MDA-MB-231

Se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante MTS con células MDA-MB-231 tratadas con los cuatro conjugados poliméricos sintetizados, comparándolos con el tratamiento con el péptido TcPaSK. A una concentración 200 $\mu\text{g/mL}$ de los compuestos conjugados, se observaron diferencias entre los conjugados con PGA y con Psar (Figura 49). En relación a la actividad antiproliferativa del péptido TcPaSK sin conjugar, la actividad PGA-Mal-TcPaSK fue menor, las actividades de PGA-PD-TcPaSK y Psar-PD-TcPaSK similares y la de Psar-NHS-TcPaSK fue superior (Figura 49).

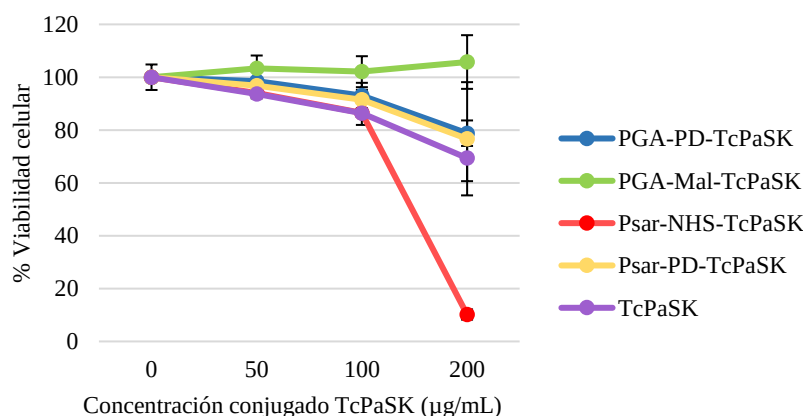


Figura 49. Actividad citotóxica de diferentes conjugados poliméricos del péptido TcPaSK en células MDA-MB-231. Ensayos MTS de viabilidad de las células MDA-MB-231 tratadas durante 72 h con diferentes concentraciones de PGA-PD-TcPaSK, PGA-Mal-TcPaSK, Psar-PD-TcPaSK y Psar-NHS-TcPaSK. El péptido TcPaSK fue incluido en el ensayo como control. Las gráficas representan las medias $\pm$ SE de dos réplicas.

Actualmente, la mayoría de polímeros conjugados con proteínas terapéuticas registrados para su uso clínico están basados en PEG. A pesar de ser efectivo, las limitaciones que presenta han estimulado la búsqueda de alternativas para la conjugación con proteínas, incluyendo poli(aminoácidos) como PGA, poli(2-oxazolina), ácido polisiálico, poliglicerol, poli(poli(etilenglicol) metil éter metacrilato), poli(carboxibetaína), polímeros zwitteriónicos, poli(polivinilpirrolidona), entre otros (Ekladios *et al.*, 2019; Pelegri-O'Day *et al.*, 2014)

El PGA es un polímero biocompatible que sufre degradación intracelular mediante enzimas hidrolíticas como la cathepsina B. Los conjugados de PGA mejoran la solubilidad y reducen la exposición sistémica y los efectos secundarios adversos de agentes quimioterapéuticos como el paclitaxel y la doxorubicina (Duro-Castano *et al.*, 2014; Melnyk *et al.*, 2020). Una posible explicación de la menor actividad citotóxica observada en los polímeros del péptido TcPaSK con PGA es que el péptido presenta cinco cisteínas que pueden dar lugar a entrecruzamientos con los polímeros alterando su conformación y ocultando los sitios de interacción con la membrana de las células diana. La polisarcosina (PSar) se basa en el aminoácido endógeno sarcosina (glicina N-metilada) y ha emergido como una alternativa al PEG, ya que aporta una mayor solubilidad en agua, flexibilidad, evasión inmune y baja inmunogenicidad (Weber *et al.*, 2016; Melnyk *et al.*, 2020). Dada la conjugación semitelequímica de TcPaSK a PSar, es más probable que los motivos de unión de TcPaSK a las membranas celulares se encuentren libres para poder interaccionar con estas, aumentando así su capacidad citotóxica.

Hu *et al.*, (2018b) evaluaron *in vitro* e *in vivo* dos conjugados con interferón- α 2b humano (IFN), uno con PEG (PEG-IFN) y otro con polisarcosina (PSar-IFN). Ambos conjugados mostraron una resistencia similar a la degradación proteolítica y un mismo incremento de la vida media en la circulación sanguínea respecto al IFN. Sin embargo, en relación a PEG-IFN, PSar-IFN retuvo más actividad *in vitro* y se acumuló en mayor cantidad en los tumores tras administración sistémica. Con este trabajo se evidenció que PSar es un excelente candidato para la conjugación de proteínas terapéuticas ya que PSar-IFN demostró ser un inhibidor más potente del crecimiento del tumor y elicó una respuesta inmune en ratón mucho menor que PEG-IFN.

7.2 Tratamientos combinados de Doxorubicina y PGA-HydDox con conjugados del péptido TcPaSK en células MDA-MB-231

La Dra. Vicent dispone de un conjugado de doxorubicina con PGA (PGA-HydDox), sintetizado en su laboratorio, que posee un “linker” de hidrazona sensible al pH que promueve la liberación específica de doxorubicina desde el esqueleto polimérico dentro de un microambiente tumoral y cuya actividad antiproliferativa y antimetastásica se ha demostrado en la línea celular 4T1 de TNBC de ratón (Arroyo-Crespo *et al.*, 2018).

El conjugado Psar-NHS-TcPaSK que mostró una actividad antiproliferativa superior a la del péptido TcPaSK en células MDA-MB-231 se seleccionó para realizar ensayos de viabilidad celular en combinación con PGA-HydDox, observándose una disminución estadísticamente significativa de la actividad citotóxica (Figura 50B). Este efecto se detectó a partir de concentraciones equivalentes de doxorubicina de 0,10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 50B), mientras que en los tratamientos de Psar-NHS-TcPaSK en combinación con doxorubicina sin conjugar se observó a concentraciones superiores a 0,5 μM (Figura 50A). La EC_{50} de Psar-NHS-TcPaSK en combinación con PGA-HydDox disminuyó de $0,258 \pm 0,039 \mu\text{g/mL}$ a $0,176 \pm 0,046 \mu\text{g/mL}$.

En la actualidad estamos realizando ensayos para caracterizar la actividad del polímero Psar-NHS-TcPaSK, prometedor candidato para el uso terapéutico del péptido TcPaSK.

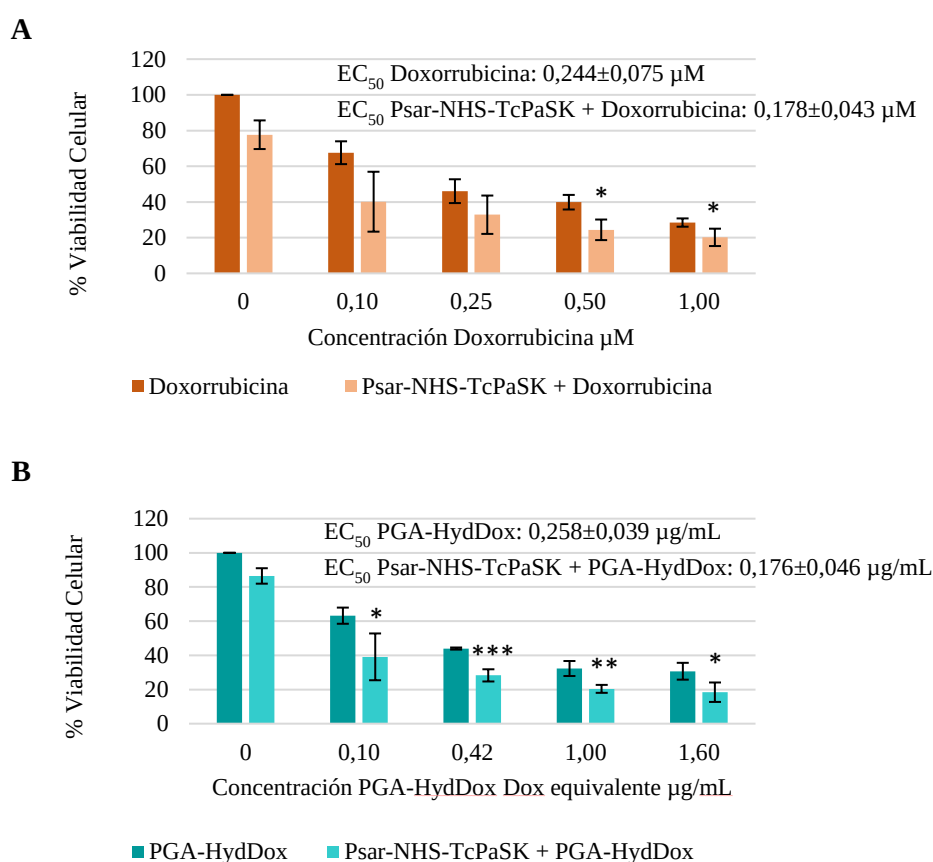


Figura 50. Evaluación de la actividad citotóxica de Psar-NHS-TcPaSK en combinación con doxorubicina o PGA-HydDox en células MDA-MB-231. Viabilidad celular de células MDA-MB-231 tratadas durante 72 h con combinaciones del polímero Psar-NHS-TcPaSK (100 $\mu\text{g/mL}$) con diferentes concentraciones de: A) doxorubicina y B) PGA-HydDox. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Las gráficas representan la media $\pm$ SE de tres réplicas biológicas. (Test *t-Student*, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). La EC_{50} se calculó con la herramienta Quest Graph™ EC_{50} Calculator. AAT Bioquest. <https://www.aatbio.com/tools/ec50-calculator>.

Actualmente, la terapia combinada se ha convertido en un estándar en oncología con la finalidad de combatir la resistencia a la quimioterapia que obstaculiza el tratamiento de tumores metastásicos. En la literatura encontramos diversos polímeros conjugados con quimioterapéuticos o combinaciones de estos, en diferentes fases de ensayos clínicos o preclínicos contra distintos tipos de cáncer (revisado en Melnyk *et al.*, 2020). Como resultado de la investigación realizada en esta tesis se ha desarrollado el conjugado polimérico Psar-NHS-TcPaSK, basado en el péptido con actividad antimicrobiana y anticancerígena TcPaSK. El uso combinado del polímero PGA-HydDox junto con Psar-NHS-TcPaSK, con modos de acción complementarios, merece ser explorado *in vivo* en modelos animales para validar su aplicación clínica en el tratamiento del cáncer.

Eldar-Boock *et al.* (2011) sintetizaron un conjugado de paclitaxel con PGA (PGA-PTX) conjugado a su vez con un peptidomimético RGD cíclico dirigido a la integrina $\alpha\beta3$ (conjugado PGA-PTX-E-[c(RGDfK)₂]). En células epiteliales y endoteliales de tumor que presentan elevados niveles de expresión de la integrina $\alpha\beta3$, demostraron que el efecto de PGA-PTX-E-[c(RGDfK)₂] en la inhibición de la proliferación, migración y angiogénesis era mayor que el de PGA-PTX. Además, en ratones observaron una acumulación tumoral preferencial del conjugado portador de RGD que conllevó una mayor eficacia antitumoral y una disminución de los efectos tóxicos secundarios, en comparación con los ratones tratados con PTX.

Los resultados obtenidos por Eldar-Boock *et al.* (2011) ponen de manifiesto el interés de la posible funcionalización del polímero Psar-NHS-TcPaSK para su unión con doxorubicina, y disponer así de una única molécula con selectividad tumoral (contiene el motivo RGG de reconocimiento de la integrina $\alpha\beta3$ del péptido TcPaSK) que presentaría una mayor eficacia anticancerígena que cada uno de los dos principios activos antitumorales que la integran (péptido TcPaSK y doxorubicina).

Conclusiones

1. El péptido antimicrobiano TcPaSK posee efecto citotóxico dependiente de concentración en la línea celular de cáncer de mama triple negativo humano MDA-MB-231, así como en células de ratón, tanto de carcinoma mamario (4T1) como no tumorales (HC-11). A concentraciones subcitotóxicas, el péptido TcPaSK posee efecto antiproliferativo y citolítico, produce alteración metabólica y causa muerte celular por necrosis en células MDA-MD-231.
2. La acción del péptido TcPaSK en células tumorales MDA-MB-231 y en células no microcíticas de pulmón A549 se inicia con su unión a la membrana y su internalización vía endocitosis mediante vesículas cuyo destino son los lisomas.
3. El péptido TcPaSK reduce los niveles del factor HIF-1 α en condiciones de hipoxia y posee capacidad antiangiogénica y antimetastásica, inhibiendo la adhesión, la migración y la invasión de las células MDA-MB-231 y A549.
4. El péptido TcPaSK altera el programa de transición epitelio-mesénquima (EMT) en células tumorales MDA-MB-231 y A549, sin producir la reversión a un fenotipo epitelial. En respuesta al tratamiento con el péptido se reprime la expresión de factores de transcripción de EMT, de marcadores mesenquimales y de la proteína CD44 y algunas de sus isoformas, mientras que la expresión de los miARNs reguladores de la EMT de la familia miR-200 está inducida.
5. El péptido TcPaSK interacciona específicamente con la superficie de las membranas de células MDA-MB-231 y A549 a través de la integrina $\alpha\text{v}\beta\text{3}$. Proponemos que dicha interacción se produce a través de un motivo *RGD-like* correspondiente a los aminoácidos RGG de las posiciones 17 a 19 de la secuencia del péptido.
6. El péptido TcPaSK disminuye la expresión de biomarcadores de resistencia a quimioterapéuticos en células tumorales MDA-MB-231 y A549, y aumenta la sensibilidad de las células a los fármacos antineoplásicos doxorrubicina y cisplatino.
7. En colaboración con el Laboratorio de Polímeros Terapéuticos del Centro de Investigación Príncipe Felipe, se han sintetizado varios conjugados poliméricos del péptido TcPaSK. El conjugado Psar-NHS-TcPaSK muestra una actividad antiproliferativa superior a la del péptido TcPaSK en células MDA-MB-231 y disminuye significativamente la viabilidad celular en combinación con un polímero de doxorrubicina conjugado con PGA, desarrollado en el Laboratorio de Polímeros Terapéuticos. La traslación de estas investigaciones *in vitro* al ámbito clínico requerirá la validación en modelos animales del alcance terapéutico del péptido TcPaSK y de su conjugado en el tratamiento del cáncer.

Bibliografía

- AAT Bioquest, Inc. (2023). *Quest GraphTM EC50 Calculator*. AAT Bioquest. <https://www.aatbio.com/tools/ec50-calculator>.
- Adams, J.C., Chiquet-Ehrismann, R. y Tucker, R.P. (2015). The evolution of tenascins and fibronectin. *Cell Adh Migr*. 9(1-2):22-33.
- Alexander, M., Kim, S. Y. y Cheng, H. (2020). Update 2020: Management of non-small cell lung cancer. *Lung*. 198(6):897–907.
- Alhmoud J.F., Woolley J.F., Al Moustafa A.E. y Malki M.I. (2020). DNA damage/repair management in cancers. *Cancers*. 12(4):1050.
- Alzahrani S.M., Al Doghaither H.A. y Al-Ghafari A.B. (2021). General insight into cancer: An overview of colorectal cancer (Review). *Mol Clin Oncol*. 15(6):271.
- American Cancer Society. (2023). *American Cancer Society: Cancer Facts & Figures 2023*. Último acceso mayo 2023.
- Arneth, B. (2019). Tumor Microenvironment. *Medicina*, 56(1):15.
- Arroyo-Crespo, J. J., Armiñán, A., Charbonnier, D., Balzano-Nogueira, L., Huertas-López, F., Martí, C., Tarazona, S., Forteza, J., Conesa, A. y Vicent, M. J. (2018). Tumor microenvironment-targeted poly-L-glutamic acid-based combination conjugate for enhanced triple negative breast cancer treatment. *Biomaterials*. 186:8–21.
- Auvynet, C. y Rosenstein, Y. (2009). Multifunctional host defense peptides: Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *FEBS J*. 276(22):6497–6508.
- Avand, A., Akbari, V. y Shafizadegan, S. (2018). *In vitro* cytotoxic activity of a *Lactococcus lactis* antimicrobial peptide against breast cancer cells. *Iran J Biotechnol*. 16(3):e1867.
- Balcells, I., Cirera, S. y Busk, P. K. (2011). Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol*. 11:70.
- Barosova, H., Meldrum, K., Karakocak, B. B., Balog, S., Doak, S. H., Petri-Fink, A., Clift, M. J. D. y Rothen-Rutishauser, B. (2021). Inter-laboratory variability of A549 epithelial cells grown under submerged and air-liquid interface conditions. *Toxicol in Vitro*. 75:105178.
- Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., Safari, E. y Farahmand, L. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol*. 84:106535.
- Borah, A., Deb, B. y Chakraborty, S. A. (2021). Crosstalk on antimicrobial peptides. *Int J Pept Res Ther*. 27:229–244.
- Bin Hafeez, A., Jiang, X., Bergen, P. J. y Zhu, Y. (2021). Antimicrobial peptides: An update on classifications and databases. *Int J Mol Sci*. 22(21):11691.
- Boparai, J. K. y Sharma, P. K. (2020). Mini review on antimicrobial peptides, sources, mechanism and recent applications. *Protein Pept Lett*. 27(1):4–16.
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A. y Weinberg, R. A. (2018). EMT in cancer. *Nat Rev Cancer*. 18(2):128–134.
- Brassart-Pasco, S., Brézillon, S., Brassart, B., Ramont, L., Oudart, J.-B. y Monboisse, J. C. (2020). Tumor microenvironment: Extracellular matrix alterations influence tumor progression. *Front Oncol*., 10:397.

- Bright, N. A., Davis, L. J. y Luzio, J. P. (2016). Endolysosomes are the principal intracellular sites of acid hydrolase activity. *Curr Biol.* 26(17):2233–2245.
- Brooks, P. C., Clark, R. A. F. y Chersesh, D. A. (1994). Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. *Science.* 264(5158):569–571.
- Brown, N. F. y Marshall, J. F. (2019). Integrin-mediated TGF- β activation modulates the tumour microenvironment. *Cancers.* 11(9):1221.
- Brown, R. L., Reinke, L. M., Damerow, M. S., Perez, D., Chodosh, L. A., Yang, J. y Cheng, C. (2011). CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *J Clin Invest.* 121(3):1064–1074.
- Büyükkiraz, E. M., y Kesmen, Z. (2022). Antimicrobial peptides (AMPs): A promising class of antimicrobial compounds. *J Appl Microbiol.* 132(3):1573–1596.
- Cao J., De la Fuente-Nunez C., Ou R.W., Torres M.T., Pande S.G., Sinskey A.J. y Lu T.K. (2018). Yeast-based synthetic biology platform for antimicrobial peptide production. *ACS Synth Biol.* 7(3):896-902.
- Cavallari, I., Ciccicarese, F., Sharova, E., Urso, L., Raimondi, V., Silic-Benussi, M., D'Agostino, D. M. y Ciminale, V. (2021). The miR-200 family of microRNAs: Fine tuners of epithelial-mesenchymal transition and circulating cancer biomarkers. *Cancers.* 13(23):5874.
- Chaffer, C. L., San Juan, B. P., Lim, E. y Weinberg, R. A. (2016). EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 35(4):645–654.
- Chen, C., Zhao, S., Karnad, A. y Freeman, J. W. (2018). The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J Hematol Oncol.* 11(1):64.
- Chen, L., Yao, Y., Sun, L., Zhou, J., Miao, M., Luo, S., Deng, G., Li, J., Wang, J. y Tang, J. (2017). Snail driving alternative splicing of CD44 by ESRP1 enhances invasion and migration in epithelial ovarian cancer. *Cell Physiol Biochem.* 43(6):2489–2504.
- Cheng, T.-M., Chang, W.-J., Chu, H.-Y., De Luca, R., Pedersen, J. Z., Incerpi, S., Li, Z.-L., Shih, Y.-J., Lin, H.-Y., Wang, K., y Whang-Peng, J. (2021). Nano-strategies targeting the integrin $\alpha_v\beta_3$ network for cancer therapy. *Cells,* 10(7):1684.
- Chi, Y.-H., Hsiao, J.-K., Lin, M.-H., Chang, C., Lan, C.-H. y Wu, H.-C. (2017). Lung cancer-targeting peptides with multi-subtype indication for combinational drug delivery and molecular imaging. *Theranostics.* 7(6):1612–1632.
- Chiangjong, W., Chutipongtanate, S. y Hongeng, S. (2020). Anticancer peptide: Physicochemical property, functional aspect and trend in clinical application (Review). *Int J Oncol.* 57(3):678–696.
- Contreras, E., Benito-Jardón, M., López-Galiano, M. J., Real, M. D. y Rausell, C. (2015). *Tribolium castaneum* immune defense genes are differentially expressed in response to *Bacillus thuringiensis* toxins sharing common receptor molecules and exhibiting disparate toxicity. *Dev Comp Immunol.* 50(2):139–145.
- Cooper, J. y Giancotti, F. G. (2019). Integrin signaling in cancer: mechanotransduction, stemness, epithelial plasticity, and therapeutic resistance. *Cancer Cell.* 35(3):347–367.
- Cui, Z., Luo, Q., Bannon, M. S., Gray, V. P., Bloom, T. G., Clore, M. F., Hughes, M. A., Crawford, M. A. y Letteri, R. A. (2021). Molecular engineering of antimicrobial peptide (AMP)–polymer conjugates. *Biomater Sci.* 9(15):5069–5091.

- Daghero, H., Fernández Massó, J. R., Astrada, S., Guerra Vallespi, M. y Bollati-Fogolín, M. (2020). The anticancer peptide CIGB-552 exerts anti-inflammatory and anti-angiogenic effects through COMMD1. *Molecules*. 26(1):152
- Dai, W., Yang, F., Ma, L., Fan, Y., He, B., He, Q., Wang, X., Zhang, H. y Zhang, Q. (2014). Combined mTOR inhibitor rapamycin and doxorubicin-loaded cyclic octapeptide modified liposomes for targeting integrin $\alpha 3$ in triple-negative breast cancer. *Biomaterials*. 35(20):5347–5358.
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 43(6):582–592.
- De Heer, E. C., Jalving, M. y Harris, A. L. (2020). HIFs, angiogenesis, and metabolism: elusive enemies in breast cancer. *J Clin Invest*. 130(10):5074–5087.
- De Palma, M., Biziato, D. y Petrova, T. V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 17(8):457–474.
- Debnath, P., Huiem, R. S., Dutta, P. y Palchaudhuri, S. (2022). Epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors. In *Biosci Rep*. 42(1):BSR20211754.
- Del Pozo Martin, Y., Park, D., Ramachandran, A., Ombrato, L., Calvo, F., Chakravarty, P., Spencer-Dene, B., Derzsi, S., Hill, C. S., Sahai, E. y Malanchi, I. (2015). Mesenchymal cancer cell-stroma crosstalk promotes niche activation, epithelial reversion, and metastatic colonization. *Cell Rep*. 13(11):2456–2469.
- Deslouches, B. y Di, Y. P. (2017). Antimicrobial peptides with selective antitumor mechanisms: Prospect for anticancer applications. *Oncotarget*. 8(28):46635–46651.
- De Sousa, V. M. L. y Carvalho, L. (2018). Heterogeneity in lung cancer. *Pathobiology*. 85(1–2):96–107.
- Duma, N., Santana-Davila, R. y Molina, J. R. (2019). Non-small cell lung cancer: Epidemiology, screening, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc*. 94(8):1623–1640.
- Duro-Castano, A., Conejos-Sánchez, I. y Vicent, M. (2014). Peptide-Based polymer therapeutics. *Polymers*. 6(2):515–551.
- Ekladios, I., Colson, Y. L. y Grinstaff, M. W. (2019). Polymer–drug conjugate therapeutics: Advances, insights and prospects. *Nat Rev Drug Discov*. 18(4):273–294.
- Eldar-Boock, A., Miller, K., Sanchis, J., Lupu, R., Vicent, M. J. y Satchi-Fainaro, R. (2011). Integrin-assisted drug delivery of nano-scaled polymer therapeutics bearing paclitaxel. *Biomaterials*. 32(15):3862–3874.
- Emami N. A., Najafgholian, S., Rostami, A., Sistani, A., Shojaeifar, S., Esparvarinha, M., Nedaeinia, R., Haghjooy J. S., Taherian, M., Ahmadlou, M., Salehi, R., Sadeghi, B. y Manian, M. (2021). The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment. *Cancer Cell Int*. 21(1):62.
- Evan, G. I., y Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411(6835):342–348.
- Fang, J., Morsalin, S., Rao, VeenaN. y Reddy, E. ShyamP. (2017). Decoding of non-coding DNA and non-coding RNA: Pri-micro RNA-encoded novel peptides regulate migration of cancer cells. *J Pharma Sci Pharmacol*. 3(1):23–27.

- Faye, I., Pye, A., Rasmuson, T., Boman, H. G. y Boman, I. A. (1975). Insect immunity. 11. Simultaneous induction of antibacterial activity and selection synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of *Hyalophora cecropia* and *Samia cynthia*. *Infect Immun.* 12(6):1426–1438.
- Feijtel, D., de Jong, M. y Nonnekens, J. (2020). Peptide receptor radionuclide therapy: Looking back, looking forward. *Curr Top Med Chem.* 20(32):2959–2969.
- Felício, M. R., Silva, O. N., Gonçalves, S., Santos, N. C. y Franco, O. L. (2017). Peptides with dual antimicrobial and anticancer activities. *Front Chem.* 5:5.
- Fougner, C., Bergholtz, H., Norum, J. H. y Sørli, T. (2020). Re-definition of claudin-low as a breast cancer phenotype. *Nat Commun*, 11(1):1787.
- Fridrichova, I. y Zmetakova, I. (2019). MicroRNAs contribute to breast cancer invasiveness. *Cells.* 8(11):1361.
- Furlanetto, J. y Loibl, S. (2020). Optimal systemic treatment for early triple-negative breast cancer. *Breast Care.* 15(3):217–226.
- Gabernet, G., Müller, A. T., Hiss, J. A. y Schneider, G. (2016). Membranolytic anticancer peptides. *MedChemComm*, 7(12):2232–2245.
- Garinet, S., Didelot, A., Denize, T., Perrier, A., Beinse, G., Leclere, J.-B., Oudart, J.-B., Gibault, L., Badoual, C., Le Pimpec-Barthes, F., Laurent-Puig, P., Legras, A. y Blons, H. (2021). Clinical assessment of the miR-34, miR-200, ZEB1 and SNAIL EMT regulation hub underlines the differential prognostic value of EMT miRs to drive mesenchymal transition and prognosis in resected NSCLC. *Br J Cancer.* 125(11):1544–1551.
- Gaspar, D., Veiga, A. S. y Castanho, M. A. R. B. (2013). From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Front Microbiol.* 4:294.
- Ghaly, G., Tallima, H., Dabbish, E., Badr ElDin, N., Abd El-Rahman, M. K., Ibrahim, M. A. A. y Shoeib, T. (2023). Anti-cancer peptides: Status and future prospects. *Molecules*, 28(3):1148.
- Gregory, P. A., Bracken, C. P., Smith, E., Bert, A. G., Wright, J. A., Roslan, S., Morris, M., Wyatt, L., Farshid, G., Lim, Y.-Y., Lindeman, G. J., Shannon, M. F., Drew, P. A., Khew-Goodall, Y. y Goodall, G. J. (2011). An autocrine TGF- β /ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell.* 22(10):1686–1698.
- Grose, R. P. y Senga, S. S. (2021). Hallmarks of cancer-the new testament. *Open Biol*, 11(1):200358.
- Hadianamrei, R., Tomeh, M. A., Brown, S., Wang, J. y Zhao, X. (2022). Rationally designed short cationic α -helical peptides with selective anticancer activity. *J Colloid Interface Sci.* 607(1):488–501.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discov.* 12(1):31–46.
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J. y Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 5(66).
- Hassn Mesrati, M., Syafruddin, S. E., Mohtar, M. A., y Syahir, A. (2021). CD44: A multifunctional mediator of cancer progression. *Biomolecules.* 11(12):1850.
- Hemmingsson. (2009). Increased sensitivity to platinating agents and arsenite in human ovarian cancer by downregulation of ASNA1. *Oncol Rep.* 22(4):869.

- Herbst, R. S., Morgensztern, D. y Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 553(7689):446–454.
- Heß, K., Böger, C., Behrens, H.-M. y Röcken, C. (2014). Correlation between the expression of integrins in prostate cancer and clinical outcome in 1284 patients. *Ann Diagn Pathol.* 18(6):343–350.
- Hilchie, A. L., Doucette, C. D., Pinto, D. M., Patrzykat, A., Douglas, S. y Hoskin, D. W. (2011). Pleurocidin-family cationic antimicrobial peptides are cytolytic for breast carcinoma cells and prevent growth of tumor xenografts. *Breast Cancer Res.* 13(5):R102.
- Hill, B., Sarnella, A., Capasso, D., Comegna, D., Del Gatto, A., Gramanzini, M., Albanese, S., Saviano, M., Zaccaro, L. y Zannetti, A. (2019). Therapeutic potential of a novel $\alpha v \beta 3$ antagonist to hamper the aggressiveness of mesenchymal triple negative breast cancer sub-type. *Cancers.* 11(2):139.
- Hopkins, T. G., Mura, M., Al-Ashtal, H. A., Lahr, R. M., Abd-Latip, N., Sweeney, K., Lu, H., Weir, J., El-Bahrawy, M., Steel, J. H., Ghaem-Maghami, S., Aboagye, E. O., Berman, A. J. y Blagden, S. P. (2016). The RNA-binding protein LARP1 is a post-transcriptional regulator of survival and tumorigenesis in ovarian cancer. *Nucleic Acids Res.* 44(3):1227–1246.
- Hosotani, R., Kawaguchi, M., Masui, T., Koshihara, T., Ida, J., Fujimoto, K., Wada, M., Doi, R. y Imamura, M. (2002). Expression of integrin $\alpha V \beta 3$ in pancreatic carcinoma: relation to MMP-2 activation and lymph node metastasis. *Pancreas.* 25(2):30–35.
- Hu B., Ma Y., Yang Y., Zhang L., Han H y Chen J. (2018a). CD44 promotes cell proliferation in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett.* 15(4):5627-5633.
- Hu, Q., Gu, G., Liu, Z., Jiang, M., Kang, T., Miao, D., Tu, Y., Pang, Z., Song, Q., Yao, L., Xia, H., Chen, H., Jiang, X., Gao, X. y Chen, J. (2013). F3 peptide-functionalized PEG-PLA nanoparticles co-administrated with tLyp-1 peptide for anti-glioma drug delivery. *Biomaterials.* 34(4):1135–1145.
- Hu, Y., Hou, Y., Wang, H. y Lu, H. (2018b). Polysarcosine as an alternative to PEG for therapeutic protein conjugation. *Bioconjug Chem.* 29(7):2232–2238.
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H. y Yi, H. (2020). Antimicrobial peptides: Classification, design, application and research progress in multiple fields. *Front Microbiol.* 11:582779.
- Huang, C.-Y., Huang, H.-Y., Forrest, M. D., Pan, Y.-R., Wu, W.-J., & Chen, H.-M. (2014). Inhibition effect of a custom peptide on lung tumors. *PLoS ONE.* 9(10):e109174.
- Huang, Y., Hong, W. y Wei, X. (2022). The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis. *J Hematol Oncol.* 15(1):129.
- Ito, E., Yue, S., Moriyama, E. H., Hui, A. B., Kim, I., Shi, W., Alajez, N. M., Bhogal, N., Li, G., Datti, A., Schimmer, A. D., Wilson, B. C., Liu, P. P., Durocher, D., Neel, B. G., O’Sullivan, B., Cummings, B., Bristow, R., Wrana, J. y Liu, F.-F. (2011). Uroporphyrinogen decarboxylase is a radiosensitizing target for head and neck cancer. *Sci Transl Med.* 3(67):67ra7.
- Jafari, A., Babajani, A., Sarrami Forooshani, R., Yazdani, M. y Rezaei-Tavirani, M. (2022). Clinical applications and anticancer effects of antimicrobial peptides: From bench to bedside. *Front Oncol.* 12: 819563.
- Jenssen, H., Hamill, P. y Hancock, R.E.W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 19(3):491-511

- Jhong, J.-H., Yao, L., Pang, Y., Li, Z., Chung, C.-R., Wang, R., Li, S., Li, W., Luo, M., Ma, R., Huang, Y., Zhu, X., Zhang, J., Feng, H., Cheng, Q., Wang, C., Xi, K., Wu, L.-C., Chang, T.-H. y Lee, T.-Y. (2022). dbAMP 2.0: updated resource for antimicrobial peptides with an enhanced scanning method for genomic and proteomic data. *Nucleic Acids Res.* 50(1):460–470.
- Jin, Y., Tong, D., Chen, J., Feng, Z., Yang, J., Shao, C. y Li, J. (2012). Overexpression of osteopontin, $\alpha v \beta 3$ and pim-1 associated with prognostically important clinicopathologic variables in non-small cell lung cancer. *PLoS ONE*. 7(10):e48575.
- Jin, Y., Wang, H., Zhu, Y., Feng, H., Wang, G. y Wang, S. (2020). miR-199a-5p is involved in doxorubicin resistance of non-small cell lung cancer cells (NSCLC). *Eur J Pharmacol.* 878:173105.
- Jing, X., Yang, F., Shao, C., Wei, K., Xie, M., Shen, H. y Shu, Y. (2019). Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Mol Cancer*. 18(1):157.
- Jolly, M. K., Marcelo, B., Bin, H., Dongya, J., Mingyang, L., Eshel, B.-J., José N, O. y Herbert, L. (2015). Implications of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype in metastasis. *Front Oncol.* 5:155.
- Kang, H.-K., Kim, C., Seo, C. H. y Park, Y. (2017). The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): A patent review. *J Microbiol.* 55(1):1–12.
- Kapp, T. G., Rechenmacher, F., Neubauer, S., Maltsev, O. V., Cavalcanti-Adam, E. A., Zarka, R., Reuning, U., Notni, J., Wester, H. J., Mas-Moruno, C., Spatz, J., Geiger, B. y Kessler, H. (2017). A comprehensive evaluation of the activity and selectivity profile of ligands for RGD-binding integrins. *Sci Rep.* 7:39805.
- Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Piperigkou, Z., Manou, D., Passi, A., Skandalis, S. S., Vynios, D. H., Orian-Rousseau, V., Ricard-Blum, S., Schmelzer, C. E. H., Duca, L., Durbeej, M., Afratis, N. A., Troeberg, L., Franchi, M., Masola, V. y Onisto, M. (2021). A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *FEBS J.* 288(24):6850–6912.
- Kariya, Y., Oyama, M., Suzuki, T. y Kariya, Y. (2021). $\alpha v \beta 3$ Integrin induces partial EMT independent of TGF- β signaling. *Commun Biol.* 4(1):490.
- Keane, C., Petersen, H., Reynolds, K., Newman, D. K., Cox, D., Jenkinson, H. F., Newman, P. J. y Kerrigan, S. W. (2010). Mechanism of outside-in $\alpha_{IIb} \beta_3$ -mediated activation of human platelets by the colonizing bacterium, *Streptococcus gordonii*. *Arterioscler, Thromb, Vasc Biol.* 30(12):2408–2415.
- Kechagia, J. Z., Ivaska, J. y Roca-Cusachs, P. (2019). Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 20(8):457–473.
- Knudson A.G. Jr. (1971). Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 68:820-823.
- Koehbach, J. y Craik, D. J. (2019). The vast structural diversity of antimicrobial peptides. *Trends Pharmacol Sci.* 40(7):517–528.
- Kohnno, M., Horibe, T., Ohara, K., Ito, S. y Kawakami, K. (2014). The membrane-lytic peptides K8L9 and melittin enter cancer cells via receptor endocytosis following subcytotoxic exposure. *Chem Biol.* 21(11):1522–1532.
- Kumai, T., Kobayashi, H., Harabuchi, Y. y Celis, E. (2017). Peptide vaccines in cancer — old concept revisited. *Curr Opin Immunol.* 45:1–7.

- Kumar, C. (2003). Integrin $\alpha\beta_3$ as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis. *Curr Drug Targets*. 4(2):123–131.
- Kumar, P., y Aggarwal, R. (2016). An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 293(2):247–269.
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J. y Straus, S. (2018). Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*. 8(1):4.
- Lauressergues, D., Couzigou, J.-M., Clemente, H. S., Martinez, Y., Dunand, C., Bécard, G. y Combier, J.-P. (2015). Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides. *Nature*. 520(7545):90–93.
- Lazzaro, B. P., Zasloff, M. y Rolff, J. (2020). Antimicrobial peptides: Application informed by evolution. *Science*. 368(6490):eaau5480.
- Lee, S. S. y Cheah, Y. K. (2019). The interplay between microRNAs and cellular components of tumour microenvironment (TME) on non-small-cell lung cancer (NSCLC) progression. *J Immunol Res*. 2019:3046379.
- Li, L., Liu, C., Qin, Y., Gao, F., Wang, Q. y Zhu, Y. (2023). Identification of cancer protein biomarker based on cell specific peptide and its potential role in predicting tumor metastasis. *J Proteomics*. 275:104826.
- Lim, B., Woodward, W. A., Wang, X., Reuben, J. M. y Ueno, N. T. (2018). Inflammatory breast cancer biology: the tumour microenvironment is key. *Nat Rev Cancer*. 18(8):485–499.
- Liscano, Y., Oñate-Garzón, J. y Delgado, J. P. (2020). Peptides with dual antimicrobial–anticancer activity: strategies to overcome peptide limitations and rational design of anticancer peptides. *Molecules*. 25(18):4245.
- Liu, J., Fu, M., Wang, M., Wan, D., Wei, Y. y Wei, X. (2022a). Cancer vaccines as promising immunotherapeutics: platforms and current progress. *J Hematol Oncol*. 15(1):28.
- Liu, Q., Guan, C., Liu, C., Li, H., Wu, J. y Sun, C. (2022b). Targeting hypoxia-inducible factor-1 α : A new strategy for triple-negative breast cancer therapy. *Biomed Pharmacother*. 156:113861.
- Liu, Z., Wang, F. y Chen, X. (2008). Integrin $\alpha\beta_3$ -targeted cancer therapy. *Drug Dev Res*. 69(6):329–339.
- Lozupone, F., Borghi, M., Marzoli, F., Azzarito, T., Matarrese, P., Iessi, E., Venturi, G., Meschini, S., Canitano, A., Bona, R., Cara, A. y Fais, S. (2015). TM9SF4 is a novel V-ATPase-interacting protein that modulates tumor pH alterations associated with drug resistance and invasiveness of colon cancer cells. *Oncogene*. 34(40):5163–5174.
- Ludwig, B. S., Kessler, H., Kossatz, S. y Reuning, U. (2021). RGD-binding integrins revisited: How recently discovered functions and novel synthetic ligands (re-)shape an ever-evolving field. *Cancers*. 13(7):1711.
- Löönd, F., Sugiyama, N., Bill, R., Bornes, L., Hager, C., Tang, F., Santacroce, N., Beisel, C., Ivanek, R., Bürglin, T., Tiede, S., van Rheenen, J. y Christofori, G. (2021). Distinct contributions of partial and full EMT to breast cancer malignancy. *Dev Cell*. 56(23):3203–3221.
- Mabjeesh, N. J. y Amir, S. (2007). Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis. *Histol Histopathol*. 22(4–6):559–572.

- Malanovic, N. y Lohner, K. (2016). Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*. 1858(5):936–946.
- Mamuya, F. A. y Duncan, M. K. (2012). α V integrins and TGF- β -induced EMT: A circle of regulation. *J Cell Mol Med*. 16(3):445–455.
- Manniello M.D., Moretta A., Salvia R., Scieuzo C., Lucchetti D., Vogel H., Sgambato A. y Falabella P. (2021). Insect antimicrobial peptides: potential weapons to counteract the antibiotic resistance. *Cell Mol Life Sci*. 78(9):4259-4282.
- Manrique-Moreno, M., Santa-González, G. A., y Gallego, V. (2021). Bioactive cationic peptides as potential agents for breast cancer treatment. *Biosci Rep*. 22;41(12):BSR20211218C.
- Margadant, C., & Sonnenberg, A. (2010). Integrin–TGF- β crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Reports*. 11(2), 97–105.
- Melnyk, T., Đorđević, S., Conejos-Sánchez, I. y Vicent, M. J. (2020). Therapeutic potential of polypeptide-based conjugates: Rational design and analytical tools that can boost clinical translation. *Adv Drug Deliv Rev*. 160:136–169.
- Mendes, B. B., Sousa, D. P., Coniot, J., y Conde, J. (2021). Nanomedicine-based strategies to target and modulate the tumor microenvironment. *Trends Cancer*. 7(9):847–862.
- Micallef, I. y Baron, B. (2020). Doxorubicin: An overview of the anti-cancer and chemoresistance mechanisms. *Ann Clin Toxicol*. 3(2):1031.
- Mohideen, H. S. y Louis, H. P. (2021). Insect antimicrobial peptides - therapeutic and agriculture perspective. *J Applied Biotech Rep*. 8(3):193–202.
- Morales, X., Cortés-Domínguez, I. y Ortiz-de-Solorzano, C. (2021). Modeling the mechanobiology of cancer cell migration using 3D biomimetic hydrogels. *Gels*. 7(1):17.
- Moretta, A., Scieuzo, C., Petrone, A. M., Salvia, R., Manniello, M. D., Franco, A., Lucchetti, D., Vassallo, A., Vogel, H., Sgambato, A. y Falabella, P. (2021). Antimicrobial peptides: A new hope in biomedical and pharmaceutical fields. *Front Cell Infect Microbiol*. 11:668632.
- Mori, S., Kodaira, M., Ito, A., Okazaki, M., Kawaguchi, N., Hamada, Y., Takada, Y. y Matsuura, N. (2015). Enhanced expression of integrin α v β 3 induced by TGF- β is required for the enhancing effect of fibroblast growth factor 1 (FGF1) in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in mammary epithelial cells. *PLOS ONE*. 10(9):e0137486.
- Naci, D., Vuori, K. y Aoudjit, F. (2015). Alpha2beta1 integrin in cancer development and chemoresistance. *Semin Cancer Biol*. 35:145–153.
- Nedeljković, M. y Damjanović, A. (2019). Mechanisms of chemotherapy resistance in triple-negative breast cancer—how we can rise to the challenge. *Cells*. 8(9):957.
- Nieberler, M., Reuning, U., Reichart, F., Notni, J., Wester, H.-J., Schwaiger, M., Weinmüller, M., Räder, A., Steiger, K. y Kessler, H. (2017). Exploring the role of RGD-recognizing integrins in cancer. *Cancers*. 9(9):116.
- Nordling C.O. (1953). A new theory on the cancer-inducing mechanism. *Br J Cancer*. 7:68-72.
- Norouzi, P., Mirmohammadi, M. y Houshdar Tehrani, M. H. (2022). Anticancer peptides mechanisms, simple and complex. *Chem Biol Interac*. 368:110194.
- Ormancey, M., Guillotin, B., San Clemente, H., Thuleau, P., Plaza, S. y Combier, J. (2021). Use of microRNA-encoded peptides to improve agronomic traits. *Plant Biotechnol J*. 19(9):1687–1689.

- Paramanantham, A., Jung, E., Kim, H., Jeong, B., Jung, J.-M., Kim, G., Hong, S. y Lee, W. S. (2021). Doxorubicin-resistant TNBC cells exhibit rapid growth with cancer stem cell-like properties and EMT phenotype, which can be transferred to parental cells through autocrine signaling. *Int J Mol Sci.* 22(22):12438.
- Patocka J., Nepovimova E., Klimova B., Wu Q. y Kuca K. (2019). Antimicrobial peptides: amphibian host defense peptides. *Curr Med Chem.* 26(32):5924-5946.
- Pelegri-O'Day, E. M., Lin, E.-W. y Maynard, H. D. (2014). Therapeutic protein-polymer conjugates: advancing beyond PEGylation. *J Am Chem Soc.* 136(41):14323-14332.
- Pérez-Calixto, M., Anaya-Rubio, I., Mota-López, C. y Macías-Silva, M. (2022). Melanoma: mecanismos de acción y de secreción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). *Rev Educ Bioquímica.* 41(1):18-27.
- Platten, M., Wick, W. y Weller, M. (2001). Malignant glioma biology: Role for TGF- β in growth, motility, angiogenesis, and immune escape. *Microsc Res Tech.* 52(4):401-410.
- Prel, A., Dozier, C., Combier, J.-P., Plaza, S. y Besson, A. (2021). Evidence that regulation of pri-miRNA/miRNA expression is not a general rule of miPeps function in humans. *Int J Mol Sci.* 22(7):3432.
- Quail, D. F., y Joyce, J. A. (2014). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 19(11):1423-1437.
- Quemé-Peña, M., Juhász, T., Kohut, G., Ricci, M., Singh, P., Szigyártó, I. Cs., Papp, Z. I., Fülöp, L. y Beke-Somfai, T. (2021). Membrane association modes of natural anticancer peptides: mechanistic details on helicity, orientation, and surface coverage. *Int J Mol Sci.* 22(16):8613.
- Ramazi, S., Mohammadi, N., Allahverdi, A., Khalili, E. y Abdolmaleki, P. (2022). A review on antimicrobial peptides databases and the computational tools. *Database*, 2022:baac011.
- Reinke, L. M., Xu, Y. y Cheng, C. (2012). Snail represses the splicing regulator epithelial splicing regulatory protein 1 to promote epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 287(43):36435-36442.
- Ribatti, D., Tamma, R. y Annese, T. (2020). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: A historical overview. *Transl Oncol.* 13(6):100773.
- Robles-Fort, A., García-Robles, I., Fernando, W., Hoskin, D. W., Rausell, C. y Real, M. D. (2021b). Dual antimicrobial and antiproliferative activity of TcPaSK peptide derived from a *Tribolium castaneum* insect defensin. *Microorganisms.* 9(2):1-24.
- Rodriguez-Canales, J., Parra-Cuentas, E. y Wistuba, I. I. (2016). Diagnosis and molecular classification of lung cancer. *Cancer Treat. Res.* 170:25-46.
- Romaszko, A. y Doboszyńska, A. (2018). Multiple primary lung cancer: A literature review. *Adv Clin Exp Med.* 27(5):725-730.
- Rubtsova, S. N., Zhitnyak, I. Y. y Gloushankova, N. A. (2022). Dual role of E-cadherin in cancer cells. *Tissue Barriers.* 10(4):2005420.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B. y Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37(6):e45.

- Russo, M. A., Paolillo, M., Sanchez-Hernandez, Y., Curti, D., Ciusani, E., Serra, M., Colombo, L. y Schinelli, S. (2013). A small-molecule RGD-integrin antagonist inhibits cell adhesion, cell migration and induces anoikis in glioblastoma cells. *Int J Oncol.* 42(1):83–92.
- Salas C.E., Badillo-Corona J.A., Ramírez-Sotelo G. y Oliver-Salvador C. (2015). Biologically active and antimicrobial peptides from plants. *Biomed Res Int.* 2015:102129.
- Samec, T., Alatise, K. L., Boulos, J., Gilmore, S., Hazelton, A., Coffin, C. y Alexander-Bryant, A. (2022). Fusogenic peptide delivery of bioactive siRNAs targeting CSNK2A1 for treatment of ovarian cancer. *Mol Ther Nucleic Acids.* 30:95–111.
- Sani, M.-A., Henriques, S. T., Weber, D. y Separovic, F. (2015). Bacteria may cope differently from similar membrane damage caused by the Australian tree frog antimicrobial peptide Maculatin 1.1. *J Biol Chem.* 290(32):19853–19862.
- Sani, S., Messe, M., Fuchs, Q., Pierrevelcin, M., Laquerriere, P., Entz-Werle, N., Reita, D., Etienne-Selloum, N., Bruban, V., Choulier, L., Martin, S. y Dontenwill, M. (2021). Biological relevance of RGD-integrin subtype-specific ligands in cancer. *ChemBioChem.* 22(7):1151–1160.
- Santos Ramos, F., Wons, L., João Cavalli, I., y Ribeiro, E. (2017). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: An overview. *Integr Cancer Sci Therap.* 4(3):1-5.
- Sarkar S., Horn G., Moulton K., Oza A., Byler S., Kokolus S. y Longacre M. (2013). Cancer development, progression, and therapy: An epigenetic overview. *Int J Mol Sci.* 14:21087-21113.
- Schally A. V., Block N. L. y Rick F. G. (2017). Discovery of LHRH and development of LHRH analogs for prostate cancer treatment. *Prostate.* 77(9):1036-1054.
- Sebestyén, A., Kopper, L., Dankó, T. y Tímár, J. (2021). Hypoxia signaling in cancer: From basics to clinical practice. *Pathol Oncol Res.* 3(27):1609802.
- Seyfried, T. N. y Huysentruyt, L. C. (2013). On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Onco.* 18(1–2):43–73.
- Sharma, A., Badola, P. K., Bhatia, C., Sharma, D. y Trivedi, P. K. (2020). Primary transcript of miR858 encodes regulatory peptide and controls flavonoid biosynthesis and development in *Arabidopsis*. *Nat Plants.* 6(10):1262–1274.
- Sheldrake, H. M. y Patterson, L. H. (2014). Strategies to inhibit tumor associated integrin receptors: rationale for dual and multi-antagonists. *J Med Chem.* 57(15):6301–6315.
- Shen, M., Xu, Z., Xu, W., Jiang, K., Zhang, F., Ding, Q., Xu, Z. y Chen, Y. (2019). Inhibition of ATM reverses EMT and decreases metastatic potential of cisplatin-resistant lung cancer cells through JAK/STAT3/PD-L1 pathway. *J Exp Clin Cancer Res.* 38(1):149.
- Shoari, A., Khodabakhsh, F., Ahangari Cohan, R., Salimian, M. y Karami, E. (2021). Anti-angiogenic peptides application in cancer therapy; a review. *Res Pharm Sci.* 16(6):559.
- Skuli, N., Monferran, S., Delmas, C., Favre, G., Bonnet, J., Toulas, C. y Cohen-Jonathan Moyal, E. (2009). $\alpha\beta 3/\alpha\beta 5$ Integrins-FAK-RhoB: A novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. *Cancer Res.* 69(8):3308–3316.
- Sloan, E. K., Pouliot, N., Stanley, K. L., Chia, J., Moseley, J. M., Hards, D. K. y Anderson, R. L. (2006). Tumor-specific expression of $\alpha\beta 3$ integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone. *Breast Cancer Res.* 8(2):R20.

- Smith, S. J., Li, C. M., Lingeman, R. G., Hickey, R. J., Liu, Y., Malkas, L. H. y Raoof, M. (2020). Molecular targeting of cancer-associated pcna interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma using a cell-penetrating peptide. *Mol. Ther. Oncolytics*. 17:250–256.
- Sobierajska, K., Ciszewski, W. M., Sacewicz-Hofman, I. y Niewiarowska, J. (2020). Endothelial cells in the tumor microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 1234:71-86.
- Song, N., Zhao, L., Zhu, M. y Zhao, J. (2019). Recent progress in LyP-1-based strategies for targeted imaging and therapy. *Drug Deliv*. 26(1):363–375.
- Spicer, J., Marabelle, A., Baurain, J.-F., Jebsen, N. L., Jøssang, D. E., Awada, A., Kristeleit, R., Loirat, D., Lazaridis, G., Jungels, C., Brunsvig, P., Nicolaisen, B., Saunders, A., Patel, H., Galon, J., Hermitte, F., Camilio, K. A., Mauser, B., Sundvold, V. y Rekdal, Ø. (2021). Safety, antitumor activity, and T-cell responses in a dose-ranging phase I trial of the oncolytic peptide LTX-315 in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res*. 27(10):2755–2763.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engström, Å., Bennich, H. y Boman, H. G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*. 292(5820):246–248.
- Stojanović, N., Dekanić, A., Paradžik, M., Majhen, D., Ferencak, K., Ruščić, J., Bardak, I., Supina, C., Tomicic, M. T., Christmann, M., Osmak, M. y Ambriović-Ristov, A. (2018). Differential effects of integrin αv knockdown and cilengitide on sensitization of triple-negative breast cancer and melanoma cells to microtubule poisons. *Mol Pharmacol*. 94(6):1334–1351.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., y Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer J Clin*. 71(3):209–249.
- Swithenbank, L., Cox, P., Harris, L. G., Dudley, E., Sinclair, K., Lewis, P., Cappiello, F. y Morgan, C. (2020). Temporin A and bombinin H2 antimicrobial peptides exhibit selective cytotoxicity to lung cancer cells. *Scientifica*. 2020:3526286.
- Tang, N., Wang, L., Esko, J., Giordano, F. J., Huang, Y., Gerber, H.-P., Ferrara, N. y Johnson, R. S. (2004). Loss of HIF-1 α in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell*. 6(5):485–495.
- Tao, Z. Q., Shi, A., Lu, C., Song, T., Zhang, Z. y Zhao, J. (2015). Breast cancer: Epidemiology and etiology. *Cell Biochem Biophys*. 72(2):333–338.
- Teixeira V., Feio M. J. y Bastos M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog Lipid Res*. 51(2):149-77.
- Téllez, A. y Castaño, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*. 14(1):55-67.
- Thayer, A. M. (2011). Improving Peptides. *C&EN News*. 89(22):13–20.
- Thundimadathil, J. (2012). Cancer treatment using peptides: Current therapies and future prospects. *J Amino Acids*, 2012:967347.
- Tian, W., Li, B., Zhang, X., Dang, W., Wang, X., Tang, H., Wang, L., Cao, H. y Chen, T. (2012). Suppression of tumor invasion and migration in breast cancer cells following delivery of siRNA against Stat3 with the antimicrobial peptide PR39. *Oncol Rep*. 28(4):1362–1368.
- Ting, C.-H., Chen, Y.-C., Wu, C.-J. y Chen, J.-Y. (2016). Targeting FOSB with a cationic antimicrobial peptide, TP4, for treatment of triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 7(26):40329–40347.

- Tolkach, Y., Joniau, S. y Van Poppel, H. (2013). Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptor agonists vs antagonists: A matter of the receptors? *BJU Int.* 111(7):1021–1030.
- Tornesello, A. L., Borrelli, A., Buonaguro, L., Buonaguro, F. M. y Tornesello, M. L. (2020). Antimicrobial peptides as anticancer agents: Functional properties and biological activities. *Molecules.* 25(12):2850.
- Tripathi, A. K., Kumari, T., Tandon, A., Sayeed, Mohd., Afshan, T., Kathuria, M., Shukla, P. K., Mitra, K., y Ghosh, J. K. (2017). Selective phenylalanine to proline substitution for improved antimicrobial and anticancer activities of peptides designed on phenylalanine heptad repeat. *Acta Biomater.* 57:170–186.
- Vale, N., Duarte, D., Silva, S., Correia, A. S., Costa, B., Gouveia, M. J. y Ferreira, A. (2020). Cell-penetrating peptides in oncologic pharmacotherapy: A review. *Pharmacol Res.* 162:105231.
- Vallespi, M. G., Pimentel, G., Cabrales-Rico, A., Garza, J., Oliva, B., Mendoza, O., Gomez, Y., Basaco, T., Sánchez, I., Calderón, C., Rodriguez, J. C., Markelova, M. R., Fichtner, I., Astrada, S., Bollati-Fogolin, M., Garay, H. E. y Reyes, O. (2014). Antitumor efficacy, pharmacokinetic and biodistribution studies of the anticancer peptide CIGB-552 in mouse models. *J Pept Sci.* 20(11):850–859.
- Vilcinskas A. (2013). Evolutionary plasticity of insect immunity. *J Insect Physiol.* 59(2):123-129.
- Vito, A., El-Sayes, N., y Mossman, K. (2020). Hypoxia-driven immune escape in the tumor microenvironment. *Cells.* 9(4):992.
- Wang, C., Hong, T., Cui, P., Wang, J. y Xia, J. (2021a). Antimicrobial peptides towards clinical application: Delivery and formulation. *Adv Drug Deliv Rev.* 175:113818.
- Wang, C., Huang, L., Li, R., Wang, Y., Wu, X. y Shang, D. (2021b). Synergistic therapy of doxorubicin with cationic anticancer peptide L-K6 reverses multidrug resistance in MCF-7/ADR cancer cells in vitro via p-glycoprotein inhibition. *Int J Pept Res Ther.* 27(4):2291–2301.
- Wang, G. (2014). Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals.* 7(5):545–594.
- Wang, J.-J., Lei, K.-F. y Han, F. (2018). Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 22(12):3855-3864.
- Wang, S., Zeng, X., Yang, Q. y Qiao, S. (2016). Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in food animal industry. *Int J Mol Sci.* 17(5):603.
- Weber, B., Seidl, C., Schwiertz, D., Scherer, M., Bleher, S., Süß, R. y Barz, M. (2016). Polysarcosine-based lipids: from lipopolyptoid micelles to stealth-like lipids in langmuir blodgett monolayers. *Polymers,* 8(12):427.
- Wellner, U., Schubert, J., Burk, U. C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., Waldvogel, B., Vannier, C., Darling, D., Hausen, A. zur, Brunton, V. G., Morton, J., Sansom, O., Schüler, J., Stemmler, M. P., Herzberger, C., Hopt, U., Keck, T., Brabletz, S. y Brabletz, T. (2009). The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol.* 11(12):1487–1495.
- Wicks, E. E. y Semenza, G. L. (2022). Hypoxia-inducible factors: Cancer progression and clinical translation. *J Clin Invest.* 132(11): e159839.
- Wild, C.P., Weiderpass E. y Stewart B.W. (2020). World cancer report: Cancer research for cancer development. World Health Organization: regional office for europe. IARC. ISBN:9283204476, pp 612.

- Xiao, Y. y Yu, D. (2021). Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther.* 221:107753.
- Xie, J., Xiao, Y., Zhu, X., Ning, Z., Xu, H. y Wu, H. (2016). Hypoxia regulates stemness of breast cancer MDA-MB-231 cells. *Med Oncol.* 33(5):42.
- Xu, D. y Lu, W. (2020). Defensins: A double-edged sword in host immunity. *Front Immunol.* 7(11):764.
- Yang, N., Strøm, M. B., Mekonnen, S. M., Svendsen, J. S. y Rekdal, Ø. (2004). The effects of shortening lactoferrin derived peptides against tumour cells, bacteria and normal human cells. *J Pept Sci.* 10(1):37–46.
- Yin, L., Duan, J.-J., Bian, X.-W. y Yu, S. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res.* 22(1):61.
- Zaravinos, A. (2015). The regulatory role of microRNAs in EMT and cancer. *J Oncol.* 2015:865816.
- Zasloff, M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *PNAS.* 84(15):5449–5453.
- Zhang, Q.-Y., Yan, Z.-B., Meng, Y.-M., Hong, X.-Y., Shao, G., Ma, J.-J., Cheng, X.-R., Liu, J., Kang, J. y Fu, C.-Y. (2021). Antimicrobial peptides: Mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Med Res.* 8(1):48.
- Zhang, Y., Zhang, H., Wang, M., Schmid, T., Xin, Z., Kozhuharova, L., Yu, W.-K., Huang, Y., Cai, F. y Biskup, E. (2021). Hypoxia in breast cancer-scientific translation to therapeutic and diagnostic clinical applications. *Front Oncol.* 11:652266.
- Zhao, J., Santino, F., Giacomini, D. y Gentilucci, L. (2020). Integrin-targeting peptides for the design of functional cell-responsive biomaterials. *Biomedicines.* 8(9):307.
- Ziółkowska-Suchanek, I. (2021). Mimicking tumor hypoxia in non-small cell lung cancer employing three-dimensional *in vitro* models. *Cells.* 10(1):141.

