

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”



**MECANISMOS BIOLÓGICOS RELACIONADOS CON ACTIVIDAD
ANTICANCERÍGENA MEDIADOS POR PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE
COCODRILOS**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE
BACHILLER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA**

AUTOR:

ALONSO GUILLERMO QUISPE LARREA

ASESORA:

CLAUDIA MACHICADO RIVERO

LIMA - PERÚ

2022

ÍNDICE:

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
ESTADO DEL ARTE... ..	3
1. Peptidos antimicrobianos (AMPs)...	2
1.1 Definición y origen de los AMPs	3
1.2 Propiedades fisicoquímicas y estructurales	4
2. Actividad anticancerígena de los ACPs	5
2.1 Interacción con la membrana	5
2.2 Apoptosis	6
2.3 Inhibición de la angiogénesis	8
2.4 Mecanismos biológicos asociados con propiedades estructurales y fisicoquímicas	8
3. Estudios computacionales en ACPs y su actividad anticancerígena	9
4. Descubrimiento de AMPs y ACPs de cocodrilos	10
4.1 Características y tipos	10
4.2 KT2... ..	11
4.3 RT2... ..	11
4.4 ACPs candidatos de cocodrilo... ..	12
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	12
ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	14
REFERENCIAS	16

RESUMEN

Se ha postulado que ciertas moléculas encontradas en los tejidos de cocodrilos, se relacionan con su poderoso sistema inmune (1). Una fuente de dichas sustancias sería la microbiota, la cual produce metabolitos y péptidos que se vinculan con la longevidad de la especie y la protección inmune contra ciertas patologías como infecciones y cáncer (2). Por su lado, otras sustancias que son secretadas en la piel o circulantes en sangre de los cocodrilos, poseen actividad antimicrobiana y anticancerígena. En este grupo se encuentran péptidos bioactivos, que son cadenas cortas de aminoácidos, con propiedades anticancerígenas, antimicrobianas y anti fúngicas. (3) En particular, aquellos que tienen actividad antimicrobiana reciben el nombre de Péptidos antimicrobianos (AMPs), algunos de los cuales tienen también actividad anticancerígena (ACPs). Por ejemplo, se han descrito péptidos catiónicos como KT2 y RT2 del extracto de leucocitos de cocodrilos de agua dulce, los cuales tienen actividad anticancerígena. En estudios *in vitro*, se ha descrito que dichos ACPs interactúan con componentes de la membrana de células cancerosas, como fosfolípidos, en un reconocimiento no mediado por receptores. (4,5) Una vez endocitados, los ACPs inducen la apoptosis en la célula cancerosa, y también afectan el potencial de membrana mitocondrial, que da inicio a la cascada de caspasas.

(6) En este sentido, sería ventajoso emplear ACPs contra el cáncer, ya que su interacción con células cancerosas no depende de receptores en membrana, siendo menos probable de desarrollar resistencia en comparación con las inmunoterapias. Recientemente se ha predicho, mediante inteligencia artificial, la presencia de más de 200 AMPs de tejidos de cocodrilo (*Crocodylus porosus*) que tendrían actividad anticancerígena. Sin embargo, sus propiedades y potenciales mecanismos biológicos regulados por ellos aún no han sido explorados (7). En este estudio, buscamos determinar los mecanismos biológicos asociados con actividad anticancerígena que podrían regular estos AMPs, aplicando métodos bioinformáticos que consideren sus propiedades fisicoquímicas y estructurales. En un futuro, aquellos AMPs podrían ser evaluados *in vitro* y validar su acción anticancerígena experimentalmente.

Palabras clave: Péptidos, antimicrobiano, cáncer, *in silico*.

ABSTRACT

It has been postulated that certain molecules found in crocodilian tissues are related to their powerful immune system (1). One source of these substances would be the microbiota, which produces metabolites and peptides that are linked to the longevity of the species and immune protection against certain pathologies such as infections and cancer (2). On the other hand, other substances that are secreted in the skin or circulate in the blood of crocodiles, have antimicrobial and anticancer activity. In this group are bioactive peptides, which are short chains of amino acids, with anticancer, antimicrobial and antifungal properties. (3) In particular, those that have antimicrobial activity are called antimicrobial peptides (AMPs), some of which also have anticancer activity (ACPs). For example, cationic peptides such as KT2 and RT2 from freshwater crocodile leukocyte extract have been described as having anticancer activity. In *in vitro* studies, it has been described that these ACPs interact with components of the membrane of cancer cells, such as phospholipids, in a recognition not mediated by receptors. (4,5) Once endocytosed, ACPs induce apoptosis in the cancer cell, and also affect the mitochondrial membrane potential, which initiates the caspase cascade.

(6) In this sense, it would be advantageous to use ACPs against cancer, since their interaction with cancer cells does not depend on membrane receptors, being less likely to develop resistance compared to immunotherapies. Artificial intelligence has recently predicted the presence of more than 200 AMPs from crocodile tissues (*Crocodylus porosus*) that would have anticancer activity. However, their properties and potential biological mechanisms regulated by them have not yet been explored (7). In this study, we seek to determine the biological mechanisms associated with anticancer activity that could regulate these AMPs, applying bioinformatic methods that consider their physicochemical and structural properties. In the future, those AMPs could be evaluated *in vitro* and their anticancer action experimentally validated.

Keywords: Peptides, Antimicrobial, Cancer, *In silico*.

ESTADO DEL ARTE

1.- PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (AMPS)

1.1. DEFINICIÓN Y ORIGEN DE LOS AMPS

Los AMPs son oligopéptidos que están naturalmente presentes en el sistema inmune innato de la mayoría de especies, desde bacterias, plantas, vertebrados e invertebrados (1, 8,9). La mayoría de AMPs (76%) proceden de especies animales como los anfibios, insectos, mamíferos y peces, mientras que el resto provienen de plantas (14%) y bacterias (10%) (10). Los AMPs tienen la función de reconocer y destruir células u organismos completos, incluidos virus, bacterias y hongos (1,8). Los AMPs no sólo se eliminan microorganismos, también han mostrado tener actividad citotóxica en células cancerosas. Así, un 6% de los AMPs están clasificados como péptidos con actividad anticancerígena (10). Este grupo recibe el nombre de Péptidos anticancerígenos (ACPs) que los distingue de aquellos que sólo tienen actividad antimicrobiana.

El descubrimiento de los AMP se remonta a 1922 cuando Alexander Fleming descubrió la actividad antimicrobiana de la lisozima humana en la saliva. Desde entonces, se han descubierto nuevos péptidos de diferentes fuentes de origen. Por ejemplo, RK1 es un ACP proveniente de escorpión común (*Buthus Occitanus*), que presenta actividad anticancerígena reduciendo la proliferación celular e inhibiendo la angiogénesis (9). Por su parte, la AAP-H es un péptido antitumoral proveniente de la anémona marina (*Anthopleura anjunae*), que causa muerte celular induciendo la apoptosis. Los humanos también poseen ACPs, como las Cathelicidinas LL37 provenientes de la saliva, las cuales presentan actividad anticancerígena por medio de la permeabilización de la membrana e inducción de la apoptosis (13).

El gran interés por los AMPs anticancerígenos o ACPs ha generado una considerable cantidad de datos provenientes de dichas investigaciones, existiendo hoy en día bases de datos donde se almacena la información acerca de la actividad antimicrobiana y estructural de estos péptidos (14,15).

1.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y ESTRUCTURALES

Los AMPs están compuestos por entre 5 a 50 aminoácidos, con un peso molecular menor a 10 KDa. La longitud de la cadena parece contribuir al mecanismo de acción antimicrobiano, ya que con un mayor tamaño, se dificultará la inserción del péptido en la membrana (1,16). En particular, los ACPs poseen un elevado punto isoeléctrico (pI), especialmente en el extremo C-terminal, lo que indica que son péptidos altamente catiónicos a pH neutro, facilitando la interacción electrostática con la membrana de la célula cancerosa (16).

Otra característica es que tienen un bajo valor (≤ 1) en el índice de Boman, el cual es un indicador del potencial de proteínas y péptidos de interactuar con otras proteínas. Un valor bajo indica que tienen menos probabilidades de causar efectos secundarios por interacción con otras proteínas (16).

También es común que los ACPs presenten aminoácidos básicos como la arginina, lisina o histidina (11). Dichos residuos presentan un átomo de nitrógeno en su cadena lateral que se puede protonar para adquirir una carga neta positiva (12). Con relación a ello, los ACPs son frecuentemente péptidos catiónicos, es decir, tienen una carga neta positiva. De hecho, más del 85% de ACPs poseen una carga neta de al menos +2 (16). Dicha característica es esencial para su actividad ya que su naturaleza catiónica les permite interactuar de forma inespecífica con la membrana celular cargada negativamente de las células cancerosas, causada por los cambios en algunos fosfolípidos en las células neoplásicas. (1, 8, 9,13).

Por otro lado, ciertos aminoácidos favorecen ciertas conformaciones espaciales que aumentan la posibilidad de desplegar su actividad anticancerígena (13). Así, tanto los AMPs como los ACPs pueden presentar 4 tipos de conformaciones: β - plegada, α - hélices, extendidas y cíclicas (1, 8, 12). De estas conformaciones, las α - hélices son las más estudiadas y presentan propiedades catiónicas y antipáticas, Por otro lado, los ACPs de conformación β - plegadas presentan 2 o más enlaces disulfuro, lo que les da una buena estabilidad. En general, la actividad antitumoral de las ACP plegadas en β es más baja

que la de las helicoidales α , pero las ACP plegadas en β son menos tóxicas para las células normales; por lo tanto, tienen buenas perspectivas para un futuro desarrollo como agentes anticancerígenos (11).

La anfipaticidad también es una propiedad importante de varios ACPs, donde los aminoácidos hidrofóbicos y los aminoácidos hidrofílicos tienden a ubicarse en lugares opuestos (1,8,11). Además, se ha demostrado que la hidrofobicidad influye en el transporte extracelular de los péptidos bioactivos (11,12). La capacidad de oligomerización es otra característica fundamental en estos péptidos. De hecho, la interacción con la membrana entre dímeros o trímeros de AMPs hace más eficiente la formación de poros en la superficie de la célula cancerosa objetivo (9).

Estas características influyen mucho en la biodisponibilidad y estabilidad fisiológica de los péptidos. Ciertos residuos de aminoácidos

La biodisponibilidad y estabilidad de los AMPs en condiciones fisiológicas dependerá mucho de las propiedades fisicoquímicas como la cantidad y posición de residuos de aminoácidos contenga el péptido, ya que esto también definirá la conformación secundaria que presentara el AMP.

2. ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE LOS ACPS

2.1. INTERACCIÓN CON LA MEMBRANA

La interacción de ACPs con la membrana plasmática ocurre a través de interacciones débiles, entre los ACPs y los componentes de membrana (diferentes a receptores). En particular, los ACPs reconocen con mayor afinidad a las células cancerosas que a las células normales. Ello tendría su explicación en los cambios de los componentes lipídicos en la célula neoplásica. Por ejemplo, la membrana de las células cancerosas posee una naturaleza fuertemente aniónica debido a la abundancia de ciertos fosfolípidos como la fosfatidilserina y de otras moléculas de naturaleza aniónica como las mucinas O-glicosiladas, los gangliósidos sialilados y el sulfato de heparina. Dichos componentes normalmente se encuentran en la parte interna de la membrana, pero son trasladados a la superficie celular en las células cancerosas (13, 17). Como consecuencia, los ACPs de naturaleza catiónica tienen gran afinidad por las células cancerosas, donde debido a esta

interacción desestabilizan la membrana, causando la lisis de la célula cancerosa (17). De hecho, la permeabilización de membrana es uno de los mecanismos citotóxicos más comunes mediados por los ACPs y puede desencadenar necrosis de la célula transformada (9).

Se han planteado tres modelos para describir la interacción de los ACPs con la membrana celular. El primero es el modelo de barril-vara, que consiste en que los ACPs se posicionan de manera paralela a la membrana, pero a medida que se agrupan cambian a una posición perpendicular a la membrana. En este modelo los residuos hidrofóbicos de los péptidos interactúan con los lípidos de la membrana, produciendo un poro en la superficie que la desestabiliza. Algunos ACPs son capaces de ingresar al citoplasma usando este mecanismo, esto les permite interactuar con objetivos intracelulares (9).

El segundo es el modelo tipo alfombra, que consiste en la agrupación de una gran cantidad de ACPs, generalmente α -helicoidales, de manera paralela a la membrana, sin penetrar en las bicapas lipídicas. Cuando los péptidos alcanzan una alta concentración, los monómeros giran y se reorientan a la zona hidrofóbica de la membrana, como consecuencia provocan la formación de micelas y la desintegración de la membrana. (9,18).

El tercer modelo descrito es el modelo de poro toroidal, en el que al principio también los ACPs están posicionados de manera paralela en la membrana. Sin embargo, cuando su abundancia aumenta, se posicionan de forma perpendicular a la membrana, lo cual permite que se forme el complejo dinámico supramolecular péptido – lípido. Este último forma poros, con la característica que la parte exterior del poro se encuentra conformada por los residuos hidrofílicos del péptido junto con las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos de la membrana. Este modelo también permite el paso de algunos ACPs al medio intracelular (9,18).

2.2. APOPTOSIS

Las células cancerosas, independientemente de la causa o el tipo, tienden a tener como característica la evasión de la apoptosis, lo que ocasiona este crecimiento descontrolado. Esta pérdida del control apoptótico permite que las células cancerosas sobrevivan más tiempo y da más tiempo para la acumulación de mutaciones que pueden aumentar la

invasividad durante la progresión tumoral, estimular la angiogénesis, desregular la proliferación celular e interferir con la diferenciación (19).

Algunos ACPs pueden afectar los factores reguladores de la apoptosis en las células cancerosas, activando así la muerte celular programada. Los ACPs pueden activar la apoptosis tanto por vías extrínsecas como intrínsecas (19).

La vía extrínseca utiliza señales extracelulares para inducir la apoptosis, conocidas como ligandos de muerte, los cuales se unen a los receptores de muerte de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). Algunos ligandos de muerte incluyen el ligando Fas (Fas-L), el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) y el factor de necrosis tumoral (TNF). Se recluta una proteína adaptadora para el receptor de muerte; como el dominio de muerte asociado a Fas (FADD) y el dominio de muerte asociado al receptor de TNF (TRADD). Las procaspasas 8 y 10 del iniciador se unen a la proteína adaptadora y forman el complejo de señalización que induce la muerte (DISC). Las procaspasas tienen un dominio efector de muerte (DED) que se une a la proteína adaptadora en su DED. Las procaspasas -8 y -10 son activadas por DISC. Las caspasas -3, -6 y -7 se activan y comienzan la escisión de las proteínas y el cito esqueleto que conduce a la muerte celular (19). Se sabe que algunos ACPs pueden actuar como ligandos de los receptores de muerte, al interactuar con la membrana de la célula cancerosa (4,5,6). Por ejemplo variantes de la Leucrocina I (NGVQPKY), proveniente de la sangre de cocodrilos, con un PM de 804.91 Da activan la vía extrínseca de apoptosis (20).

Por otra parte, la ruta intrínseca se encuentra regulada por las proteínas de la familia Bcl-2. Esta vía promueve la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, efecto conocido como MOMP. La permeabilización permite la liberación de factores pro apoptóticos como el citocromo c y el segundo activador de caspasa derivado de mitocondrias (SMAC) y Omi. Tras la liberación de citocromo c se forma el apoptosoma que conduce a la muerte celular (19).

Los ACPs que pueden activar la vía intrínseca son generalmente los que siguen el modelo de poro toroidal, el cual les permite a los péptidos ingresar al interior de la célula e interactuar con la membrana mitocondrial, activando la muerte celular programada (9). La interacción de los péptidos catiónicos con la mitocondria también es posible, debido a

que las mitocondrias también poseen una membrana con fosfolípidos aniónicos, como lo son el fosfatidilglicerol y la cardiolipina (21). Un péptido estimulador de la vía intrínseca es la CecropinXJ (WKIFKKIEKMGRNIRDGIVKAGPAIEVLGSAKAIGK), proveniente de gusanos de seda de *Bombyx mori* (21).

2.3. INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS

Por su parte, otros ACPs presentan actividad antiangiogénica, es decir, impiden o retardan la creación de nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis es un proceso muy activo en las células cancerosas, que les permite recibir nutrientes y oxígeno para su supervivencia. La angiogénesis en una etapa más avanzada del cáncer también facilita la metástasis del tumor, que consiste en el transporte por sangre de células cancerosas, del órgano afectado a otro (17).

Uno de los ACPs con efecto antiangiogénico es el péptido KV11, el cual está presente en la apolipoproteína A humana. KV11 presenta 11 residuos de aminoácidos que puede inhibir la angiogénesis, suprimiendo la migración de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) inducidas por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la formación de microtúbulos (22). Si bien la propiedad antiangiogénica de los ACPs no induce directamente a la muerte de las células cancerosas, sí es capaz de detener su expansión, lo cual a la larga es útil reducir la carga de células cancerosas.

2.4 MECANISMOS BIOLÓGICOS ASOCIADOS CON PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FÍSICOQUÍMICAS.

Ciertas propiedades estructurales y fisicoquímicas de los AMPs son determinantes para la actividad anticancerígena. Los péptidos catiónicos de estructura alfa hélice, han demostrado tener actividad anticancerígena contra ciertos tipos de células. Por ejemplo, el Mastoparan es un péptido alfa hélice catiónico, de carga +4, procedente del veneno de las avispas. Este ACP puede interactuar con la fase de fosfolípidos de la membrana mitocondrial, que se ha implicado como la causa principal de la inducción de la apoptosis en las células de melanoma B16F10-Nex2 (23). La magainina II, que también posee una estructura de alfa hélice, tiene una alta eficacia citotóxica y antiproliferativa mediante la formación de poros en las células cancerosas de la vejiga (24).

Entre los péptidos catiónicos con estructura beta plegada tenemos la Lactoferrina-B (LfcinB) con una carga neta de +8, que induce la apoptosis en líneas celulares leucémicas y de carcinoma humano. Dicha acción ocurre por medio de una internalización del péptido en el citoplasma, desestabilizando la membrana citoplasmática y generando la despolarización de la membrana mitocondrial y activación de caspasas 6,7 y 9 (25).

La naturaleza de los aminoácidos también influye en la actividad biológica que despliegan los ACPs. Así, ciertos aminoácidos presentan una acción directa en las células cancerosas, debido a las diferentes propiedades que presentan estos. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos con carga positiva, como las Lisinas y argininas, alteran la integridad de la membrana celular, permitiendo que algunos péptidos logren ingresar al medio intracelular, aumentando la citotoxicidad en la célula (26). Otros aminoácidos cargados como las histidinas, inducen la citotoxicidad a través de la permeabilidad de la membrana en condiciones ácidas (27). También, la combinación de residuos de aminoácidos cargados negativamente en los ACPs, como el ácido glutámico o ácido aspártico, se asocian con actividad anti proliferativa en las células tumorales (28). Las prolinas y glicinas son residuos alifáticos no polares que son clave para la flexibilidad conformacional de los péptidos, lo que permitiría una mejor interacción con la membrana y una mayor actividad citotóxica (13).

La cantidad y posición de los residuos de aminoácidos que posea el péptido tendrán una gran influencia en la biodisponibilidad y estabilidad fisiológica de los ACPs. Es por esta razón que muchos ACPs naturales mejoran su actividad anticancerígena, cuando se modifica artificialmente la cadena de aminoácidos (9,13).

3. ESTUDIOS COMPUTACIONALES EN ACPS Y SU ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

Los estudios *in silico* en los ACPs se han conducido para descifrar el mecanismo de acción, o el tipo de interacciones establecidas por estos péptidos con sus dianas celulares, usando simulaciones por medio de aproximaciones computacionales.

Por ejemplo, en el estudio de Ramos Martin y col (2019) caracterizaron la interacción de la Cecropina XJ, un ACP encontrado en las larvas de los gusanos de seda (*Bombyx mori*), con las membranas celulares. Para ello se simuló, mediante dinámica molecular, la interacción del péptido con los fosfolípidos aniónicos, característicos de las membranas de células cancerosas. Como resultado, se describió la conformación de Cecropina XJ en complejo con componentes de la membrana celular, incluida fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina. Además, se reportó la presencia de 3 dominios conservados que serían determinantes en el reconocimiento de las membranas celulares (21).

Así mismo, en el estudio de Queme Peña y col. (2021), usando vesículas endocíticas y simulaciones computacionales, revelaron la forma de interacción de 5 ACPs helicoidales con componentes de la membrana. Los autores concluyeron que su estructura helicoidal, orientación y área de interacción con la superficie celular es determinante para su acción anticancerígena. (29)

4. DESCUBRIMIENTO DE AMPS Y ACPS DE COCODRILOS

4,1, CARACTERÍSTICAS Y TIPOS.

Los AMPs y ACPs se encuentran en todas las especies, de estas los cocodrilos han sido objetivo de búsqueda como fuente de péptidos, debido a su potente sistema inmune y a que son uno de los reptiles más longevos en la tierra. (30).

Se ha descrito un AMP catiónicos en cocodrilos, cOT2, derivado de la ovotransferina y presentes en los huevos de cocodrilo siamés (*Crocodylus siamensis*) (31). Esta molécula mostró una fuerte actividad antimicrobiana contra *Vibrio cholerae*. Otros péptidos identificados de cocodrilos son las β - defensinas, que si bien no presentan actividad anticancerígena, inhiben el crecimiento bacteriano y la formación de biofilm (30).

Por su parte, las leucocinas (NGVQPKY-NH₂) son AMPs y también son ACPs. Estas han sido aisladas de leucocitos de estos animales, exhibiendo fuerte actividad contra *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae*, la cual está asociada tanto a su carga positiva (+1) como a su alto nivel de hidrofobicidad (5). Dado el interés

por las leucocinas, se crearon artificialmente nuevas formas de estos AMPs para mejorar sus propiedades fisicoquímicas y estructurales, agregando residuos de aminoácidos catiónicos y alterando su estructura. Estas formas son las KT2 y RT2, que presentan actividad anticancerígena y antibacteriana (14,15,16).

4.2. KT2

La KT2 (NGVQPKYKWWKWWKKWW-NH₂) es una leucocina modificada, en la que aminoácidos catiónicos como la lisina se han añadido para aumentar la carga neta positiva y otros apolares como el triptófano, para alargar la cadena peptídica. Como consecuencia, la conformación espacial del ACP cambia, dándose una conformación de alfa hélice, permitiendo así una mejor interacción con la membrana y aumentando la hidrofobicidad y anfipaticidad.

La KT2 ha presentado actividad anticancerígena en células de cáncer de colon HCT-116, produciendo apoptosis por medio de la vía extrínseca. Estos presentan una carga neta positiva de +7 y muestran una atracción natural por la carga negativa de fosfatidilserina en la superficie de las células cancerosas. Los KT2 funcionan como ligandos de muerte, activando los receptores de muerte como los Fas y TRAIL R2. Lo que en consecuencia activa las procaspasas 8, permitiendo que el factor proapoptótico HTRA2 se filtre de las mitocondrias y se produzca la apoptosis (4, 5,6).

4.3. RT2

La RT2 (NGVQPKYRWWRWRRWW-NH₂) al igual que las KT2 son basadas en leucocinas, pero a diferencia de las KT2, donde se agregan residuos de aminoácidos de triptófano y lisina, las RT2 contienen residuos de arginina intercalados entre los residuos de triptófano. Como consecuencia, aumenta considerablemente la carga neta positiva del ACP y también cambia la conformación espacial, donde presenta dos estructuras de alfa hélice no continuas unidas por una cadena de estructura lineal.

Los RT2 también presentan actividad anticancerígena por medio de la vía apoptótica extrínseca. Por lo que también funcionan como ligandos de muerte con los receptores de muerte celular en la membrana. Sin embargo, a diferencia de las KT2, hay receptores que interactúan específicamente con RT2, como los TNFRI. Si bien no está clara esta interacción específica, podría atribuirse a la diferencia en la conformación espacial (5,20).

4.4. ACPS CANDIDATOS DE COCODRILO

En 2020, Jeyamejang y col., identificaron un grupo de 207 AMPs, en un extracto de varios órganos de *Cocodrilus porosus*, en los cuales fue predicha una actividad anticancerígena, aplicando métodos de *Machine Learning* (7). El método globalmente se denominó *Machine Learning of Anticancer Peptides* (MLACP). Los tejidos analizados incluían intestinos, ojos, riñones, pulmones, estómago, tráquea y corazón. También se demostró que hubo una diferencia en la expresión de genes cuando se usó el suero de cocodrilo, en células Hela, MCF7 y PC3 a comparación de las células control (7).

Los métodos de Predicción de péptidos anticancerígenos basados en máquinas vectoriales (SVMACP) y Predicción aleatoria de péptidos anticancerígenos basada en bosques (RFACP) fueron aplicados con éxito en dicha investigación. Ambos métodos aplican un análisis basado en composición y en propiedades fisicoquímicas, para detectar la actividad anticancerígena. El primero usa un análisis de la composición de aminoácidos, dipéptidos, y la composición atómica (C, H, O, N). Mientras que el segundo computa propiedades fisicoquímicas como la carga neta, la alifaticidad, aromaticidad, polaridad, hidrofobicidad, cargas, tamaño, largo y masa de los residuos de aminoácidos (32). En conjunto, los 207 AMPs fueron propuestos como ACPs candidatos mediante técnicas computacionales.

PROBLEMA

El cáncer es una enfermedad muy prevalente a nivel mundial, con más de 19 millones de personas diagnosticadas anualmente. Representa también la principal causa de muerte en muchos países, causando el deceso de más de 10 millones de personas en el mundo (33). A pesar de que existen más de un centenar de fármacos anticancerígenos aprobados, la

búsqueda de nuevos compuestos antitumorales es continua y persiste. Sin embargo, el descubrimiento de nuevos tratamientos no es sencillo y demanda esfuerzos multidisciplinarios.

La necesidad de contar con nuevos fármacos anticancerígenos es inminente. En parte, ello es debido al desarrollo de farmacorresistencia, que es un efecto inevitable de la administración de fármacos anticancerígenos como los quimioterapéuticos. Además, los efectos secundarios ligados a la administración de drogas anticancerígenas, complica el manejo medicamentoso de la enfermedad. Dichos eventos aumentan la posibilidad de recurrencia, siendo necesarios nuevos esquemas farmacológicos incluso más agresivos (34). Con ese escenario, es razonable que se busquen nuevas alternativas de tratamiento, incluyendo moléculas de origen natural.

Las especies vegetales han sido tradicionalmente fuente de bioactivos anticancerígenos. Sin embargo, los microorganismos y animales también representan fuentes naturales de compuestos con principios antimicrobianos y antineoplásicos. El descubrimiento de que ciertos AMPs eran capaces de destruir células neoplásicas, abrió una nueva línea de desarrollo de compuestos activos frente a células transformadas. De hecho, más de 20 AMPs han sido aprobados por la FDA y EMA para indicaciones como tumores neuroendocrinos y mieloma múltiple, lo que demuestra el interés y potencial de estas moléculas (35). Ningún AMP/ACP de cocodrilo ha sido investigado aún en ensayos clínicos, aunque RT2 ha sido testeado recientemente en injertos de cáncer de colon en modelos de ratón, mostrando buena actividad anticancerígena y óptimo perfil de seguridad (36).

Varios grupos han descrito la acción de ACPs frente a células transformadas, siendo común la disrupción de la membrana plasmática, a la cual se unen interactuando con fosfolípidos aniónicos o bien, en algunos casos, con receptores de membrana. Ello sugiere que el reconocimiento de ACPs por células cancerosas no está mayormente mediado por receptores y puede ejercer su efecto formando complejos con componentes lipídicos de las membranas. Esto representa una ventaja frente a la terapia dirigida, cuyo efecto está mediado por factores proteicos que, a largo plazo, sufren mutaciones y conllevan a la farmacorresistencia (37).

Recientemente se determinó que más de 200 AMPs presentes en tejidos de cocodrilo tenían características compatibles con moléculas anticancerígenas. Dicho estudio predijo la actividad anticancerígena mediante algoritmos de Machine learning, basados en algunas propiedades fisicoquímicas y secuencia de los AMPs y contrastándolos con moléculas que tenían actividad antineoplásica. Si bien este análisis con MLACP pudo discriminar péptidos con actividad anticancerígena, no precisó los procesos biológicos ni la acción a nivel de la célula mediada por los ACPs candidatos. Por ejemplo, no se sabe si los ACPs candidatos eran promotores de apoptosis o disruptores de membranas, lo cual contribuiría a describir el mecanismo de acción de estas moléculas. Considerando que la apoptosis es un hallmark del cáncer, es decir, un proceso alterado en todos los tipos de cáncer, la acción de los ACPs podría ser significativa en tejidos transformados. También queda por determinarse la biodisponibilidad y estabilidad en condiciones fisiológicas de los ACPs candidatos, criterios relevantes para estimar su eficacia y tolerancia.

Por lo antes expuesto, en este proyecto buscamos predecir los procesos biológicos y acción sobre las células cancerosas que podrían mediar los 207 ACPs candidatos de cocodrilo, considerando sus propiedades fisicoquímicas y estructurales. Dichas características son derivadas de la secuencia peptídica y computen un grupo de parámetros que describen de forma precisa los ACPs. Esta información complementará el conocimiento actual sobre AMPs de cocodrilos e incrementaría el interés por estos compuestos y su investigación como candidatos anticancerígenos.

ESTRATEGIA

La investigación es enteramente *in silico* y empleará herramientas computacionales dirigidas, primero, a describir las propiedades fisicoquímicas y estructurales de los 207 AMPs y luego, a predecir los mecanismos biológicos.

En la primera etapa, se reconocerán secuencias consenso, presentes comúnmente en los ACPs, en los 207 candidatos, a través de los programas AntiCP 2.0 e iDACP. En aquellos que tengan resultado positivo, se describirán sus propiedades fisicoquímicas y estructurales. Para ello, se obtendrán los nombres de los candidatos del artículo de Jeyamogan (7) y sus secuencias serán descargadas de Uniprot. A continuación,

empleando los programas ProtParam ToxinPred y modlAMP's, se calcularán las propiedades fisicoquímicas más relevantes, incluyendo peso molecular, propensión de agregación, índice de aromaticidad, pI, carga, índice alifático, índice de inestabilidad, ratio de hidrofobicidad, área expuesta al solvente, entre otras. También se obtendrá el índice de Boman y la probabilidad de oligomerización. . Adicionalmente, empleando los programas PEP Fold y ProteinPredict, se estimarán algunas características estructurales de interés incluyendo elementos de estructura secundaria, puentes disulfuro, entre otras. Todos estos datos serán tabulados en hojas de Excel, por cada ACP de estudio, para su evaluación en la segunda fase del trabajo

En una segunda etapa, se estimarán los mecanismos biológicos o acción de los ACPs candidatos sobre las células, vinculando sus propiedades determinadas en la primera etapa. Para ello, primero se consultará la literatura disponible, donde se asocian dichas propiedades (incluyendo secuencias consenso, estructuras secundarias, etc.) con los mecanismos desplegados por ACPs (9,13). Luego, se estimará su capacidad de atravesar la membrana celular, a través del programa BChemRF-CPPred (38). Para determinar los mecanismos involucrados en su acción, también se consultarán las bases de datos de AMPs más conocidas: ADP3, Cancer PPD y SATPdb. En caso un ACP no esté disponible en las bases de datos, se omitirá de los siguientes pasos de estudio.

De esa forma, podrá predecirse si el ACP actúa a nivel de la membrana o su acción está mediada por interacción con receptores. Para demostrar dicho mecanismo, se obtendrá primero la estructura 3D del ACP de interés. En caso no esté disponible, se modelará por homología usando Robetta o AlphaFold. En casi el mecanismo se base en interacciones con la membrana, se simulará por dinámica molecular la interacción de 1-2 ACPs candidatos con un sistema membranoso. Si fuera por interacción con receptores, se simulará la interacción usando el programa Autodock. Finalmente, se calculará teóricamente la biodisponibilidad y estabilidad en condiciones fisiológicas de los ACPs candidatos, mediante herramientas de cómputo de ADMET como ICDrug, PredMS y vNN-ADMET. También se evaluará su similitud con otros AMPs bioactivos, a través del recurso SATPdb (39).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Wang L, Dong C, Li X, Han W, Su X. Anticancer potential of bioactive peptides from animal sources *Oncol Rep* [Internet]. 2017 [citado el 28 de enero de 2022];38(2):637–51. Disponible en: <https://www.spandidospublications.com/or/38/2/637>
2. Siddiqui R, Macice S, Elmoselhi A, Soares NC, Khan NA. Longevity, cellular senescence and the gut microbiome: lessons to be learned from crocodiles. *Heliyon* [Internet]. 2021;7(12):e08594. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844021026979>
3. Lohner K, Hilpert K. Antimicrobial peptides: Cell Membrane and Microbial Surface Interactions. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2016;1858(5):915–7. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273616300827>
4. Maraming P, Klaynongsruang S, Boonsiri P, Peng S-F, Daduang S, Leelayuwat C, et al. The cationic cell-penetrating KT2 peptide promotes cell membrane defects and apoptosis with autophagy inhibition in human HCT 116 colon cancer cells. *J Cell Physiol* [Internet]. 2019 [citado el 16 de febrero de 2022];234(12):22116–29. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31073999/>
5. Maijaroen S, Jangpromma N, Daduang J, Klaynongsruang S. KT2 and RT2 modified antimicrobial peptides derived from *Crocodylus siamensis* Leucrocine I show activity against human colon cancer HCT-116 cells. *Environ Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2018;62:164–76. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2018.07.007>
6. Maraming P, Maijaroen S, Klaynongsruang S, Boonsiri P, Daduang S, Chung JG, et al. Antitumor ability of KT2 peptide derived from leukocyte peptide of crocodile against human HCT116 colon cancer xenografts. *In Vivo* [Internet]. 2018;32(5):1137–44. Disponible en: <https://iv.iijournals.org/content/invivo/32/5/1137.full.pdf>
7. Jeyamogan S, Khan NA, Sagathevan K, Siddiqui R. *Crocodylus porosus*: a potential source of anticancer molecules. *BMJ open sci* [Internet]. 2020 [citado el 16 de febrero de 2022]; 4(1):e100040. Disponible en: <https://opscience.bmj.com/content/4/1/e100040.full>
8. Kumar P, Kizhakkedathu J, Straus S. Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo.

- Biomolecules [Internet]. 2018;8(1):4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/biom8010004>
9. Tornesello AL, Borrelli A, Buonaguro L, Buonaguro FM, Tornesello ML. Antimicrobial peptides as anticancer agents: Functional properties and biological activities. *Molecules* [Internet]. 2020;25(12):2850. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25122850>
 10. Ramazi S, Mohammadi N, Allahverdi A, Khalili E, Abdolmaleki P. A review on antimicrobial peptides databases and the computational tools. *Database (Oxford)* [Internet]. 2022;2022. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/database/baac011>
 11. Trinidad-Calderón PA, Varela-Chinchilla CD, García-Lara S. Natural peptides inducing cancer cell death: Mechanisms and properties of specific candidates for cancer therapeutics. *Molecules* [Internet]. 2021;26(24):7453. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26247453>
 12. Wade L. *Organic Chemistry: International Edition*. 7a ed. Upper Saddle River, NJ, Estados Unidos de América: Pearson; 2010
 13. Chiangjong W, Chutipongtanate S, Hongeng S. Anticancer peptide: Physicochemical property, functional aspect and trend in clinical application (Review). *Int J Oncol* [Internet]. 2020;57(3):678–96. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2020.5099>
 14. Pirtskhalava M, Amstronng AA, Grigolava M, Chubinidze M, Alimbarashvili E, Vishnepolsky B, et al. DBAASP v3: database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2021;49(D1):D288–97. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaa991>
 15. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016;44(D1):D1087-93. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv1278>
 16. Huang K-Y, Tseng Y-J, Kao H-J, Chen C-H, Yang H-H, Weng S-L. Identification of subtypes of anticancer peptides based on sequential features and physicochemical properties. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-93124-9>
 17. Xie M, Liu D, Yang Y. Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification. *Open Biol* [Internet]. 2020;10(7):200004. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.200004>
 18. E. J, A. Aguilar AO-ZJ, D. P. *Antimicrobial Peptides: Diversity and Perspectives for*

Their Biomedical Application. En: Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies. InTech; 2011

19. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018;19(2). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19020448>
20. Theansungnoen T, Maijaroen S, Jangpromma N, Yaraksa N, Daduang S, Temsiripong T, et al. Cationic antimicrobial peptides derived from *Crocodylus siamensis* leukocyte extract, revealing anticancer activity and apoptotic induction on human cervical cancer cells. *Protein J* [Internet]. 2016;35(3):202–11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s10930-016-9662-1>
21. Ramos-Martín F, D'Amelio N. Molecular basis of the anticancer and antibacterial properties of CecropinXJ peptide: An in silico study. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021;22(2):691. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22020691>
22. Yi Z-F, Cho S-G, Zhao H, Wu Y-Y, Luo J, Li D, et al. A novel peptide from human apolipoprotein(a) inhibits angiogenesis and tumor growth by targeting c-Src phosphorylation in VEGF-induced human umbilical endothelial cells. *Int J Cancer* [Internet]. 2009;124(4):843–52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.24027>
23. Chen X, Zhang L, Wu Y, Wang L, Ma C, Xi X, et al. Evaluation of the bioactivity of a mastoparan peptide from wasp venom and of its analogues designed through targeted engineering. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2018;14(6):599–607. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.23419>
24. Lehmann J, Retz M, Sidhu SS, Suttman H, Sell M, Paulsen F, et al. Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines. *Eur Urol* [Internet]. 2006;50(1):141–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2005.12.043>
25. Eliassen LT, Berge G, Leknessund A, Wikman M, Lindin I, Løkke C, et al. The antimicrobial peptide, lactoferricin B, is cytotoxic to neuroblastoma cells in vitro and inhibits xenograft growth in vivo. *Int J Cancer* [Internet]. 2006;119(3):493–500. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.21886>
26. Dai Y, Cai X, Shi W, Bi X, Su X, Pan M, et al. Pro-apoptotic cationic host defense peptides rich in lysine or arginine to reverse drug resistance by disrupting tumor cell membrane. *Amino Acids* [Internet]. 2017;49(9):1601–10. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-017-2453-y>
27. Mihailescu M, Sorci M, Seckute J, Silin VI, Hammer J, Perrin BS Jr, et al. Structure and function in antimicrobial piscidins: Histidine position, directionality of membrane insertion, and pH-dependent permeabilization. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2019;141(25):9837–53. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/jacs.9b00440>

28. Yamaguchi Y, Yamamoto K, Sato Y, Inoue S, Morinaga T, Hirano E. Combination of aspartic acid and glutamic acid inhibits tumor cell proliferation. *Biomed Res* [Internet]. 2016;37(2):153–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2220/biomedres.37.153>

29. Quemé-Peña M, Juhász T, Kohut G, Ricci M, Singh P, Szigyártó IC, et al. Membrane association modes of natural anticancer peptides: Mechanistic details on helicity, orientation, and surface coverage. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021;22(16):8613. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22168613>

30. Santana FL, Arenas I, Haney EF, Estrada K, Hancock REW, Corzo G. Identification of a crocodylian β -defensin variant from Alligator mississippiensis with antimicrobial and antibiofilm activity. *Peptides* [Internet]. 2021;141(170549):170549. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170549>

31. Prajanban B-O, Jangpromma N, Araki T, Klaynongsruang S. Antimicrobial effects of novel peptides cOT2 and sOT2 derived from *Crocodylus siamensis* and *Pelodiscus sinensis* ovotransferrins. *Biochim Biophys Acta Biomembr* [Internet]. 2017;1859(5):860–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.01.035>

32. Manavalan B, Basith S, Shin TH, Choi S, Kim MO, Lee G. MLACP: machinelearning-based prediction of anticancer peptides. *Oncotarget* [Internet]. 2017;8(44):77121–36. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.20365>

33. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2021;71(3):209–49. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21660>

34. Yu W-D, Sun G, Li J, Xu J, Wang X. Mechanisms and therapeutic potentials of cancer immunotherapy in combination with radiotherapy and/or chemotherapy. *Cancer Lett* [Internet]. 2019;452:66–70. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2019.02.048>

35. Gaspar D, Veiga AS, Castanho MARB. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Front Microbiol* [Internet]. 2013;4:294. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2013.00294>

36. Maijaroen S, Klaynongsruang S, Reabroi S, Chairoungdua A, Roytrakul S, Daduang J, et al. Proteomic profiling reveals antitumor effects of RT2 peptide on a human colon carcinoma xenograft mouse model. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2022;917(174753):174753. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174753>

37. Seebacher NA, Stacy AE, Porter GM, Merlot AM. Clinical development of targeted and immune based anti-cancer therapies. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2019;38(1):156. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-019-1094-2>
38. de Oliveira ECL, Santana K, Josino L, Lima E Lima AH, de Souza de Sales Júnior C. Predicting cell-penetrating peptides using machine learning algorithms and navigating in their chemical space. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):7628. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-87134-w>
39. Singh S, Chaudhary K, Dhanda SK, Bhalla S, Usmani SS, Gautam A, et al. SATPdb: a database of structurally annotated therapeutic peptides. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016;44(D1):D1119-26. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv1114>