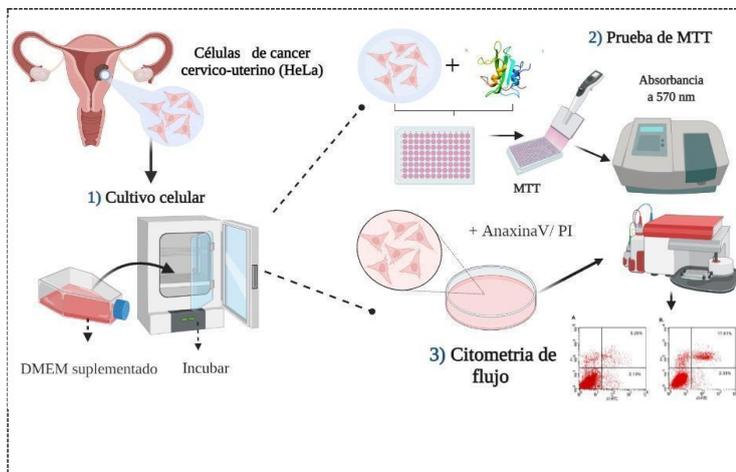


Evaluación de la actividad anticancerígena de una proteína hipotética recombinante (PHP-1) de *Polaromonas sp.*

Evaluation of the anticancer activity of a hypothetical recombinant protein (PHP-1) from *Polaromonas sp.*

Graphical Abstract (GA)



Se evaluó la actividad citotóxica y el mecanismo de muerte celular de la PHP-1 al interactuar con células de cáncer cuello-uterino (HeLa)

**Evaluación de la actividad anticancerígena de una proteína hipotética recombinante (PHP-1) de
*Polaromonas sp.***

**Evaluation of the anticancer activity of a hypothetical recombinant protein (PHP-1) from
*Polaromonas sp.***

Valeria Torres Viñuela*

** Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

*Dirigido por: Monica Losada
Barragán MSc, Dra.*

Resumen

El cáncer del cuello uterino presenta un alto índice de mortalidad entre las mujeres, siendo una de las neoplasias malignas con mayor incidencia. Las opciones terapéuticas actuales son altamente invasivas; por esto son necesarias alternativas de tratamiento con menores efectos secundarios e invasividad. Entre las nuevas posibles opciones terapéuticas se encuentran los péptidos y proteínas anticancerígenas derivadas de péptidos antimicrobianos. El propósito de este estudio fue evaluar el efecto citotóxico y el mecanismo de muerte celular de la proteína hipotética PHP-1 del microorganismo psicrófilo *Polaromonas sp.* en la línea celular de cáncer cérvico-uterino. Por medio de análisis bioinformáticos, se demostró que la PHP-1 exhibe características estructurales propias de los péptidos y proteínas anticancerígenas. La citotoxicidad de la PHP-1 fue evaluada mediante un ensayo MTT que mostró un efecto dosis y tiempo dependiente. Los efectos generados fueron complementariamente analizados por medio de una marcación de anexina V/PI, indicando que la proteína hipotética induce apoptosis, lo cual correlaciona con los cambios morfológicos observados. Los resultados de este trabajo representan el primer estudio funcional de la proteína hipotética PHP-1 y sugieren que la PHP-1 es citotóxica para la línea celular HeLa mediante la inducción de apoptosis celular, destacando su potencial como agente anticancerígeno.

**Evaluación de la actividad anticancerígena de una proteína hipotética recombinante (PHP-1) de
*Polaromonas sp.***

**Evaluation of the anticancer activity of a hypothetical recombinant protein (PHP-1) from
*Polaromonas sp.***

Abstract

Cervical cancer has a high mortality rate among women, being one of the malignant neoplasms with the highest incidence. Current therapeutic options are highly invasive; For this reason, treatment alternatives with fewer side effects and invasiveness are necessary. Potential new therapeutic options include anticancer peptides and proteins derived from antimicrobial peptides. The purpose of this study was to evaluate the cytotoxic effect and the cell death mechanism of the hypothetical protein PHP-1 of the psychrophilic microorganism *Polaromonas sp.* in the cervical cancer cell line. Through bioinformatic analysis, it was shown that PHP-1 exhibits structural characteristics typical of anti-cancer peptides and proteins. The cytotoxicity of PHP-1 was evaluated by an MTT test that showed a dose and time-dependent effect. The effects generated were additionally analyzed by means of an annexin V / PI labeling, indicating that the hypothetical protein induces apoptosis, which correlates with the observed morphological changes. The results of this work represent the first functional study of the hypothetical protein PHP-1 and suggest that PHP-1 is cytotoxic for the HeLa cell line by inducing cell apoptosis, highlighting its potential as an anticancer agent.

Keywords: *Polaromonas sp.*, antimicrobial peptide, anticancer peptide, PHP-1, cervical cancer, cytotoxicity, apoptosis

Introducción

El cáncer se considera como una de las enfermedades crónicas no transmisibles con mayor incidencia en el mundo con una gran tasa de mortalidad; tomando el segundo puesto seguida de las enfermedades cardiovasculares que se encuentran en primer lugar (You & Henneberg, 2017). El cáncer consiste en la alteración del material genético, provocando una falta de control en la división celular y una proliferación anormal. Eventualmente, estas células pueden invadir otros tejidos externos. El cáncer representa un gran problema de salud a nivel mundial, generando un fuerte impacto en las últimas décadas en la salud humana y en la expectativa de crear una cura (Ke & Shen, 2017). Debido a esto el cáncer ha sido uno de los focos centrales de investigación en cuanto a enfermedades se refiere (Ke & Shen, 2017).

En Colombia, el cáncer es una de las principales causas de muerte por enfermedades no transmisibles (Bravo, 2016). Entre los que presentan una mayor morbimortalidad en la población colombiana se encuentran el cáncer de estómago, mama, cuello uterino y colorrectal (Pardo & de Vries, 2017). El cáncer de cuello uterino constituye una de las primeras causas de muerte por cáncer en mujeres en el país, seguida por el cáncer de mama y representa una de las neoplasias malignas de mayor incidencia y mortalidad entre las mujeres de todas partes del mundo (Bravo, 2016) (Gatti et al., 2020).

Este tipo de cáncer es una neoplasia formada generalmente en la parte inferior del útero, teniendo un mayor índice de detección en mujeres entre los 35 y 45 años de edad (Momenimovahed & Salehiniya, 2017). El cáncer de cuello uterino comienza como una lesión displásica o intraepitelial cervical que logra desarrollarse progresivamente hasta llegar a ser un carcinoma. Como principal factor de riesgo se encuentra el virus del papiloma humano (VPH) seguido de otras enfermedades de transmisión sexual como la *Clamidia* y el VIH entre otros factores también se encuentra la multiparidad, el uso de algunos anticonceptivos orales y el tabaquismo (Chao et al., 2014).

Las opciones terapéuticas ofrecidas a los pacientes con este tipo de cáncer cuando se encuentra en un estado metastásico tienden a ser altamente invasivos, incluyendo histerectomías (remoción de todo el el

útero dejando infértiles a las mujeres), entre otras cirugías que pueden provocar pequeños riesgos de infección, hemorragias etc. También se encuentran otros tratamientos como la radio y quimioterapia que traen consigo diversos efectos secundarios que afectan a las células no cancerosas, así como menopausia prematura, malestar general, infertilidad, dolor coital y posibles cambios intestinales o vesicales (Castro-Jiménez et al., 2006) (OPS 2016). Por estas razones es necesaria la implementación de nuevos tratamientos menos invasivos, que tengan una mayor efectividad, más económicos y con menores efectos colaterales, generando así una mejor calidad de vida en el paciente y la disminución de la mortalidad generada por este tipo de cáncer (Cibula et al., 2018).

Una estrategia para la generación de nuevos agentes terapéuticos anticancerígenos deriva del estudio de los péptidos antimicrobianos (AMPs), también conocidos como péptidos de defensa contra diversos patógenos. Estos péptidos hacen parte de la inmunidad innata de diferentes organismos tales como bacterias, hongos, virus y diversos animales. Los AMPs están constituidos por secuencias cortas de aminoácidos siendo pequeñas moléculas catiónicas o anfipáticas (de la Fuente-Núñez, Silva, Lu, & Franco, 2017) (Raheem & Straus, 2019). Los AMP típicos se componen de residuos cargados positivamente, como arginina, lisina e histidina (Koo & Seo, 2019). Debido a sus características anfipáticas y a los residuos con cargas netas positivas se suelen producir interacciones indeterminadas entre fosfolípidos con cargas negativas, donde en caso de encontrarse en la membrana plasmática van a tener repercusiones como aumento en la permeabilidad, liberación de algunos componentes citoplasmáticos y muerte celular (Hancock & Lehrer, 1998) (Travkova, Moehwald, & Brezesinski, 2017). Estas interacciones dan como consecuencia la ruptura de la membrana debido a la formación de poros dada por estructuras de barril y poros toroidales, disminución del grosor de la bicapa lipídica y disolución de la membrana (Brogden, 2005).

El descubrimiento de los AMPs ha permitido a través de los años su implementación como agentes antimicrobianos, siendo focos terapéuticos para diversas enfermedades virales y bacterianas. Recientemente, los AMPs han demostrado tener distintas actividades antiinflamatorias y anticancerígenas. Se ha identificado que la actividad anticancerígena de los AMPs se debe a su

capacidad de dirigirse de forma selectiva a células tumorales humanas, por medio de la capacidad de unión a fosfolípidos como la fosfatidilserina (PS) la cual se ve expuesta en la hemicapa externa de la membrana plasmática de las células cancerígenas (Tornesello, Borrelli, Buonaguro, Buonaguro, & Tornesello, 2020).

A estos AMPs con actividad anticancerígena se les conoce como péptidos y/o proteínas anticancerígenas (ACPs), los cuales suelen caracterizarse por ser altamente catiónicos y anfipáticos. En cuanto a su estructura en solución acuosa estos no adoptan una estructura definida. Sin embargo, suelen tener predisposición a adoptar estructuras α -helicoidales y de hojas plegadas β (Baindara et al., 2018) (Felício et al., 2017) (Hoskin & Ramamoorthy, 2008). Se ha descubierto que las células blanco de los ACP se pueden dividir en dos grupos: (1) los péptidos activos que actúan contra células microbianas y cancerígenas pero que no tienen efecto contra células normales en mamíferos y (2) los ACP que actúan contra células microbianas, cancerígenas y normales (Hancock & Lehrer, 1998) (Papo & Shai, 2005).

El género de bacterias Gram-negativas *Polaromonas*, abarca especies psicrófilas con un metabolismo adaptable, originarias de ecosistemas acuáticos tales como agua marina, glaciares o suelos glaciares. Este género contiene actualmente diez especies, entre las que se encuentran *P. vacuolata*, *P. naphthalenivorans* y *P. rogenivorans*. De las diez especies una de las menos estudiadas es la *Polaromonas sp.* (Wang et al., 2014) (Darcy et al., 2011), la cual representa una interesante fuente de nuevas proteínas de interés biomédico.

Empleando la base de datos de la secuencia genómica anotada para *Polaromonas sp.* fue posible predecir proteínas hipotéticas con potencial actividad biológica (datos no publicados). Las proteínas hipotéticas son proteínas predichas con base en la secuencia génica que las codifican, pero no cuentan una caracterización funcional y/o bioquímica experimental. Una de las proteínas hipotéticas predichas *in silico* fue la proteína denominada PHP-1 (datos no publicados). La PHP-1 presenta un tamaño de 216 aa y ostenta características de un AMP, por lo que es posible que presente también una actividad anticancerígena, actuando, así como un ACP. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto citotóxico de la PHP-1 de *Polaromonas sp.* en una línea celular de cáncer cuello-uterino e

identificar el mecanismo de muerte celular inducido por la PHP-1, con la perspectiva de emplear esta proteína como alternativa terapéutica en el tratamiento del cáncer de cuello uterino.

1. Materiales y Métodos

1.1 Uso de herramientas bioinformáticas

Con el objetivo de comparar la secuencia de aminoácidos de la PHP-1 con otros ACP, se realizó una recopilación de ACPs reportadas en la base de datos de péptidos y proteínas anticancerígenas CancerPPD (<http://crdd.osdd.net/raghava/cancerppd/>). La búsqueda se hizo a partir de las 121 entradas de ACP verificadas en Cáncer PPD. Se seleccionaron tres proteínas con base en el tamaño y el tipo de línea celular en los que tienen actividad, centrándose principalmente en aquellas que tienen actividad en el cáncer de cuello uterino; entre estos se escogieron la Aegerolysin Aa-Pri1 (Uniprot: O42717), Actinoxanthin (Uniprot: P01551) e Interferón gamma (Uniprot: Q865W6). En el caso de la PHP-1, se empleó la secuencia reportada en un estudio previo comparativo con el precursor de ciclótidos 6 de *Viola baoshanensis* (Uniprot: B5B3Z5). Las secuencias en formato FASTA fueron obtenidas del repositorio de proteínas Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) y posteriormente, fueron alineadas por medio de la herramienta T-coffee (<http://tcoffee.crg.cat/>). Se utilizó el tipo de alineamiento PSI-Coffee basada en la extensión de homología, el cual utiliza como plantillas perfiles de proteínas para la alineación de secuencias lejanamente relacionadas sin tener en cuenta su parte estructural (Di Tommaso et al., 2011).

1.2 Cultivo celular

La línea celular de cáncer cuello-uterino humano (HeLa) fue mantenida de forma rutinaria en DMEM (medio esencial mínimo Dulbecco) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%. Las células fueron cultivadas en matraces estériles de 75 cm² con tapa de filtro ventilado (ThermoFisher Scientific™) en una incubadora de cultivo celular a 37 ° C en CO₂ al 5% y aire humidificado. Los cultivos con 70-80% de confluencia se tripsinizaron realizando el pase celular correspondiente según la proporción de siembra.

1.3 Viabilidad celular

Con el fin de evaluar la viabilidad de los cultivos celulares se realizó un conteo por azul de tripán. Este método permite diferenciar las células viables de las no viables, debido a que, en el caso de las células viables estas tienen su membrana citoplasmática intacta, por tanto, no van a incorporar el colorante. Mientras que en el caso de las células no viables internalizan el colorante debido a que presentan lesiones y/o rupturas en la membrana citoplasmática permitiendo la entrada del colorante a la célula.

Una vez obtenido el cultivo celular con una confluencia \geq al 80% las células se trataron con tripsina, durante 7 minutos, a 37°C. Donde se realizó una suspensión celular con una relación 1:4 de 10 μ L de células, 10 μ L de PBS y 20 μ L de azul de tripán. Posteriormente, se realizó el conteo en cámara de Neubauer calculando el número total de células. A partir del conteo se calculó el porcentaje de células viables $(1.00 - (\text{Número de células azules (células muertas)} \div \text{Número total de células}) \times 100)$. Este método fue empleado antes del inicio de cada uno de los ensayos descritos, con el propósito de valorar la celularidad y garantizar que los cultivos celulares se encontraran en condiciones óptimas.

1.4 Activación de PHP-1

La PHP-1 fue sintetizada comercialmente y re-suspendida de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GenScript). Para la activación proteolítica, la PHP-1 se trató con proteinasa K a una concentración final de 0.3 mg/mL durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se adicionó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Wako Pure Chemicals, Japón) a una concentración final de 1 mM para detener la reacción proteolítica. Las muestras activadas se esterilizaron por filtración empleando membranas de 0,22 μ m (Nalgene, Thermo Scientific).

1.5 Evaluación de la actividad citotóxica de la PHP-1

Para evaluar la citotoxicidad de la PHP-1 se utilizó la prueba MTT, que se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazol (MTT) por las enzimas reductoras mitocondriales presentes en células viables mediante la formación de cristales de formazán

(compuesto coloreado de un tono azul) (Kumar et al., 2018). En placas de microtitulación de 96 pocillos, se sembraron 2×10^4 células por pocillo en medio DMEM sin suplementar y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada de CO_2 al 5%. La citotoxicidad de la PHP-1 fue evaluada en un rango de concentraciones entre 5-200 $\mu\text{g/mL}$ en un período de tiempo de 24 h. Una vez transcurrido el tiempo a evaluar, fueron adicionados 10 μl del reactivo MTT a cada pocillo y se incubó durante 4 horas hasta la formación de cristales de formazán bajo el microscopio invertido. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se agregaron 100 μl de DMSO, con una incubación de 30 min para disolver los cristales. Finalmente, se midió la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 570 nm en un lector de microplacas (Multiskan GO de Thermo Scientific). Esta prueba incluyó un control positivo con doxorrubicina, un antibiótico empleado para el tratamiento del cáncer, a una concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ en DMEM no suplementado y un control negativo de células sin tratamiento. Cada una de estas pruebas fue realizada por cuadruplicado.

Para la determinación de la concentración de PHP-1 que causó una inhibición del crecimiento celular del 50% (IC_{50}), se hizo una transformación de los datos de absorbancia obtenidos en las diferentes concentraciones de PHP-1 evaluadas, seguido de una normalización para realizar a una regresión lineal, utilizando el software de GraphPad Prism. Una vez calculado el valor de IC_{50} , se determinó el efecto de exposición a la PHP-1 en periodos de tiempo de 0, 24, 48 y 72 horas empleando la prueba MTT previamente descrita.

1.6 Determinación del mecanismo de muerte celular inducido por PHP-1

Con el fin de evaluar el mecanismo de acción de la PHP-1 en la muerte celular, se utilizó la medición de los marcadores anexina V y yoduro de propidio (PI) mediante citometría de flujo. El yoduro de propidio se usa ampliamente junto con la anexina V para determinar si las células son viables, apoptóticas y/o necróticas a través de diferencias en la integridad y permeabilidad de la membrana celular. En el caso de la anexina V, se une al marcador de apoptosis fosfatidilserina. Mientras que el PI

se intercala entre las dos cadenas de ADN, al cual solo tendrá acceso en las células necróticas y en apoptosis tardía donde la integridad de la membrana plasmática se encuentra comprometida.

Para realizar el ensayo se utilizó el kit de marcación Anexina V-FITC y PI según las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific). Las células fueron cultivadas y tratadas con la PHP-1 en la dosis y tiempo previamente establecidos. Luego, fueron tripsinizadas y lavadas con tampón fosfato salino (PBS). 1×10^6 células fueron marcadas añadiendo 20 μ l de tampón de unión y 1 μ l de anexina V-FITC a cada muestra. Las muestras se mezclaron suavemente y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 minutos. Posteriormente, se añadió 1 μ l de PI a cada muestra para su lectura en el citómetro de flujo (BD Accuri™ C6). Cada condición experimental fue analizada por duplicado y cada prueba incluyó un control negativo con células sin tratamiento y un control positivo con células tratadas con doxorubicina a una concentración de 2 μ g/mL. También se incluyeron células sin marcación y sin tratamiento para realizar ajuste de los ejes. El análisis se realizó a partir de un flujo suave con un número de eventos de entre 70.000 y 80.000. Los datos obtenidos fueron analizados por el software BD CSampler perteneciente al citómetro de flujo BD Accuri™ C6.

1.7 Análisis estadístico.

El análisis estadístico de las pruebas de citotoxicidad se realizó mediante el programa GraphPad Prism versión 8. Los datos de citotoxicidad en diferentes periodos de tiempo y de muerte celular se presentan como la media \pm desvío estándar de la media (SEM). Las diferencias entre los grupos fueron analizadas mediante la prueba *t*-student con un nivel de confianza del 95% aceptando como una diferencia estadística significativa cuando $p < 0,005$.

2. Resultados y Discusión

2.1 Alineamiento múltiple de diversas secuencias comparadas con la PHP-1

En una aproximación inicial al rol de la PHP-1 como potencial ACP en cáncer de cuello uterino, se empleó un repositorio de proteínas y péptidos anticancerígenos (CancerPPD) para llevar a cabo una comparación entre las secuencias de proteínas ya identificadas y verificadas que cuentan con una

actividad anticancerígena en este tipo de cáncer. Se realizó la comparación de la posible secuencia proteica de la PHP-1 con tres proteínas por medio del programa de alineamiento múltiple de T-coffee. El alineamiento fue basado en la extensión de la homología para proteínas regulares y proteínas transmembrana. Este alineamiento tiene como finalidad revelar la similitud de las propiedades fisicoquímicas de las cadenas laterales asociada con una de las secuencias a analizar, basado en un esquema de colores que nos indica la consistencia entre cada región (Floden et al., 2016). De acuerdo con los resultados obtenidos, se manifiestan diversas regiones con secuencias altamente consistentes entre las proteínas evaluadas, lo cual es identificado por el color rosado (**Fig. 1**). A partir del score de cada una de las secuencias comparadas se identificó que todas las secuencias presentan una consistencia alta con la PHP-1 a diferencia del interferón gama presentando una consistencia media dada por un score de 61, teniendo esto en cuenta en primer lugar la secuencia que presenta una homología con mayor consistencia con un score de 74; es la proteína Aa-Pri1 (**O42717**) del hongo *Agrocybe aegerita* la cual exhibe una actividad hemolítica por medio de la formación de poros, de igual forma ha demostrado actividad anti-tumoral donde su mecanismo es similar al de las DNAsas promoviendo la apoptosis en células cancerígenas (Chen et al., 2012) (Yamaji-Hasegawa et al., 2016) (**Fig. 1**).



Fig. 1 Alineamiento múltiple de la PHP-1 con secuencias proteicas anticancerígenas de la base de datos CancerPPD. A partir de la herramienta T-coffee por medio de la extensión de homología que utiliza el servidor PSI-Coffee se realizó el alineamiento múltiple de la PHP-1 con proteínas anticancerígenas verificadas en la base de datos CancerPPD ((Aegerolysin Aa-Pri1 (**O42717**), Actinoxanthin (**P01551**), e Interferón gamma (**Q865W6**)). Las regiones coloreadas en rosado son aquellas que tienen una consistencia alta, las regiones amarillas corresponden a una consistencia media, mientras que las regiones en verde y azul tienen la consistencia más baja. **Asterisco (*)**, indica que en dicha posición los aminoácidos están 100% conservados. **Dos puntos (:)**, indican posiciones donde los aminoácidos son distintos, pero tienen propiedades fisicoquímicas parecidas. **Punto**

(.), indica una semi-conservación en los aminoácidos. Evidenciándose una consistencia alta en la mayoría de las proteínas anticancerígenas menos con el Interferón gamma (**Q865W6**) la cual indica una consistencia media al ser comparada con la PHP-1 (**ACI29322.1**).

Partiendo de los resultados se puede sugerir que la PHP-1 tiene una consistencia alta con respecto a la mayoría de las proteínas anticancerígenas con las que se realizó el alineamiento. En consecuencia, es posible que la proteína hipotética PHP-1 pueda también presentar una actividad anticancerígena cuyo blanco sean células de cáncer de cuello uterino. Adicionalmente, la consistencia en la secuencia sugiere que hay similitudes en las propiedades fisicoquímicas en las cadenas laterales de las secuencias, por tanto, se puede considerar que la PHP-1 puede tener un mecanismo de acción similar a los ACP con los que se realizó el alineamiento; presentando una expectativa en cuanto a su modo de acción al realizar los ensayos *in vitro*.

2.2 Identificación de cambios morfológicos en HeLa inducidos por PHP-1

A partir de cultivos celulares con un porcentaje de confluencia \geq al 80%, se evaluó la viabilidad por medio del método de azul de tripán, previo a la realización de cada ensayo; esto con el fin de evitar falsos positivos en los resultados. Los cultivos empleados para todos los ensayos presentaron una viabilidad entre el 85-98%.

Para estudiar el efecto de la PHP-1 sobre las células de cáncer de cuello uterino, se observaron las características morfológicas de las células tratadas mediante un microscopio invertido durante un ensayo de citotoxicidad (MTT) (**Fig. 2**). Primero, se observaron células sin tratamiento que mantuvieron su morfología epitelial característica, que se basa en células con una forma alargada, adherente, estrechamente unidas entre sí (**Fig. 2A**). En el caso del control positivo, las células tratadas con doxorubicina, un fármaco quimioterápico, presentaron una pérdida de adherencia y una forma redondeada (**Fig. 2B**). Al incubar las células con la PHP-1 se evidenciaron cambios característicos de muerte celular apoptótica, tales como una reducción en el volumen celular, redondeamiento de la célula, donde no se evidencia una pérdida de la integridad de la membrana nuclear (**Fig. 2C**). No se observaron cambios morfológicos que indican necrosis, como hinchazón celular, lisis, pérdida de la integridad de

la membrana y desintegración de los organelos que inducen a la formación de ampollas. De estos cambios morfológicos se puede deducir que la PHP-1 puede potencialmente inducir la muerte celular activando vías apoptóticas.

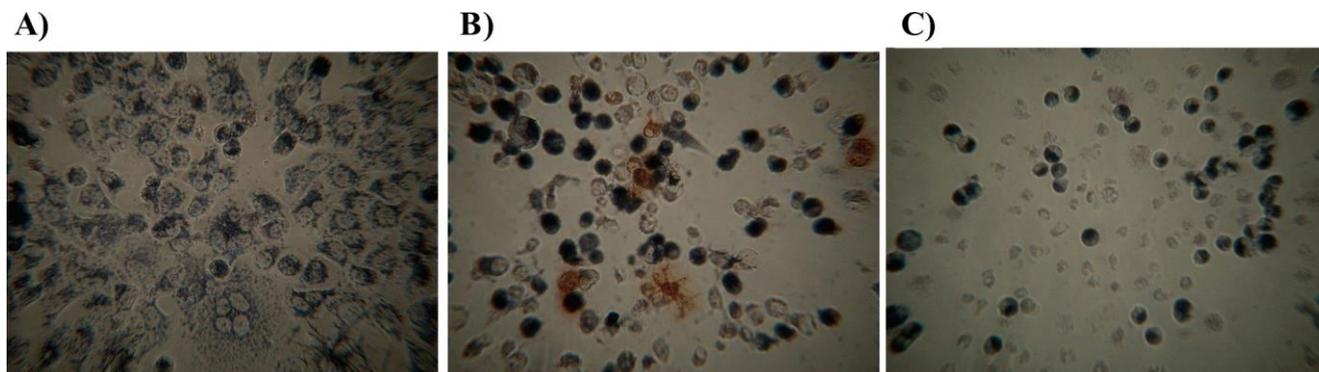


Fig. 2. Características morfológicas de las células tras el tratamiento con PHP-1 de *Polaromonas sp.* Imágenes representativas de células HeLa tratadas con PHP-1 de *Polaromonas sp.* durante un ensayo de MTT. Las células se observaron en diferentes campos mediante microscopía óptica con un aumento de 10X. (A) Células sin tratamiento. (B) Control positivo, células tratadas con doxorubicina a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (C) Células HeLa tratadas con PHP-1 a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las fotografías mostradas representan un ensayo MTT para evaluación de citotoxicidad.

2.3 Actividad citotóxica de PHP-1 en células HeLa

Para evaluar el potencial citotóxico de PHP-1 contra células de cáncer de cuello uterino, se utilizó la prueba de MTT, empleando diferentes dosis de la proteína para determinar la citotoxicidad. Inicialmente, se realizó un tratamiento de 24 horas empleando diversos rangos de concentraciones entre 5-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicando un aumento progresivo en el porcentaje de citotoxicidad dependiente de la dosis (**Fig. 3**). A partir de estos resultados, se calculó el IC50 con una concentración de 12,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Una vez identificado el valor de IC50, se realizaron ensayos de tiempo-respuesta a partir de tratamientos con esta concentración de PHP-1 en periodos de tiempo de 0, 24, 48 y 72 h (**Fig. 4**). Los porcentajes de citotoxicidad fueron aumentando en los diferentes lapsos de tiempo analizados. En el ensayo de dosis vs tiempo se corroboró que a las 24 h de incubación con la PHP-1 se generó una inhibición de la proliferación celular del 54,56% a las 24 h, a las 48 h de 75,58% y a las 72 h la proliferación celular disminuyó considerablemente presentando un porcentaje de citotoxicidad del 91,08% (**Fig. 4**). Estos

hallazgos, indican que la PHP-1 posee efectos citotóxicos en células de cáncer de cuello uterino dependiente de la dosis y del tiempo de incubación.

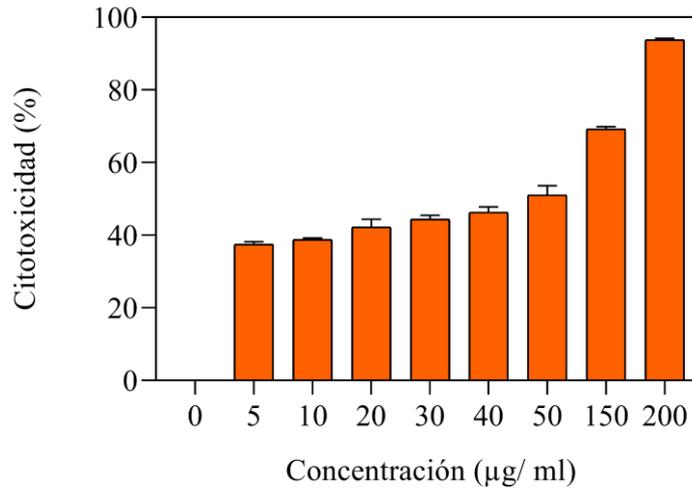


Fig. 3 Actividad citotóxica de PHP-1 de *Polaromonas sp.* en células HeLa. Se evaluó la actividad citotóxica en células de cáncer de cuello uterino (2×10^4 células) a diferentes concentraciones (5, 10, 20, 30, 40, 50, 150 y 200 µg/mL) que se incubaron a 37 °C durante 24 h. La PHP-1 fue tratada previamente con proteinasa K (0,3 µg/ml) y con PMSF (1 mM). Los datos representan la media \pm SEM (n=4).

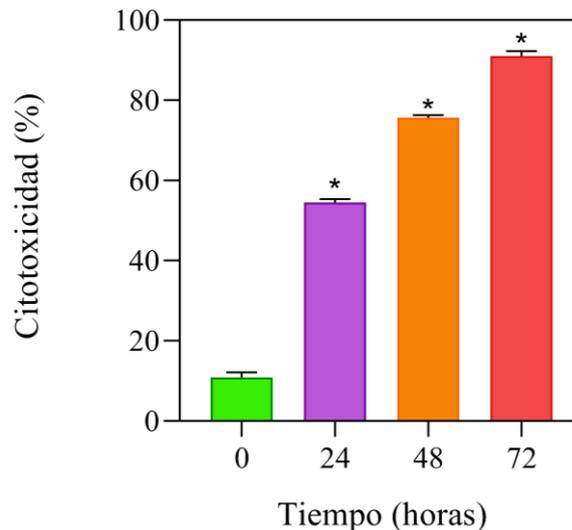


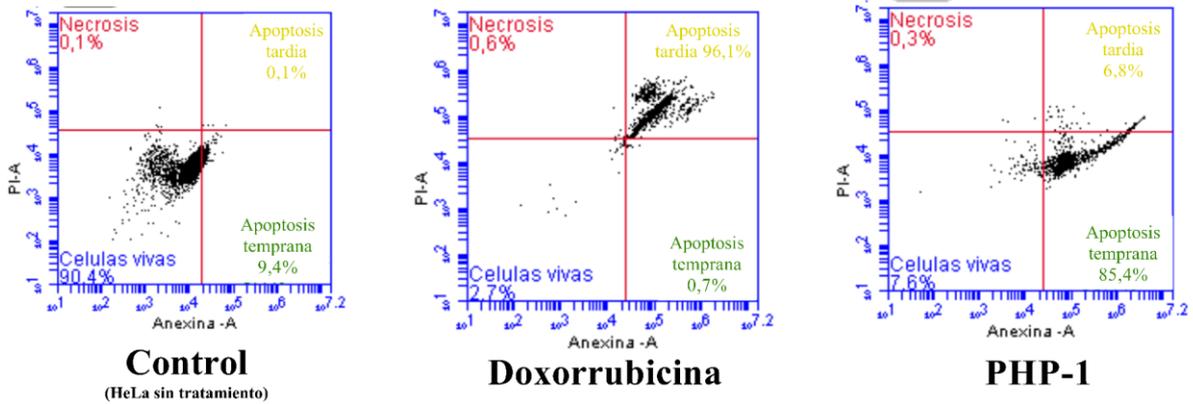
Fig. 4 Ensayo tiempo-respuesta de PHP-1 en células HeLa. Porcentaje de citotoxicidad inducido por la PHP-1 con una concentración de 12,6 µg/mL en periodos de tiempo de 0, 24, 48 y 72 horas. Los datos representan la media \pm SEM (n=4). Los tiempos de 24, 48 y 72 horas fueron analizados en comparación con el tiempo de 0h mediante una prueba *t*-student. * $p < 0,0001$.

La PHP-1 induce la muerte celular en células HeLa por vía apoptótica

Teniendo en cuenta las observaciones sobre los cambios morfológicos que ocurrieron en las células de cáncer de cuello uterino tras el tratamiento con la PHP-1 en el que se evidenció una morfología relacionada con la apoptosis y los efectos citotóxicos observados en los ensayos MTT (**Fig. 2**), se realizó un análisis con marcaje de anexina V/PI en las células tratadas con la proteína hipotética. La anexina V tiene la capacidad de unirse a la PS (marcador de apoptosis), un fosfolípido que permanece en la monocapa lipídica del lado citosólico de la membrana plasmática. Cuando la célula está en apoptosis, la enzima flipasa deja de actuar, generando que la PS no se encuentre solo en la hemicapa lipídica citosólica, sino también en la hemicapa externa de la membrana plasmática. Por tanto, un marcaje positivo es indicativo de apoptosis. Adicionalmente, el PI puede intercalarse entre las dos hebras de ADN, debido a que penetra la membrana de células deterioradas, señalando necrosis y/o apoptosis tardía.

Las células tratadas con doxorubicina presentaron un marcaje positivo para Anexina V y PI, exhibiendo un alto porcentaje de células en estado de apoptosis tardía (96,1%) (**Fig. 5**). Notablemente, después de un tratamiento de 24 h con la PHP-1 a una concentración de 12,6 $\mu\text{g/mL}$ se indujo un aumento significativo en el porcentaje de células en apoptosis temprana (85,4%) y apoptosis tardía (6,8%) en comparación con las células sin PHP-1 (9,5%) (**Fig. 5**). Por tanto, la proteína hipotética PHP-1 es capaz de inducir la muerte celular programada en la línea celular de cáncer de cuello uterino HeLa. Este hallazgo sugiere que la PHP-1 puede presentar un mecanismo de acción específico para este tipo de muerte celular, el cual requiere ser evaluado mediante posteriores estudios que profundicen en su mecanismo de acción.

A)



B)

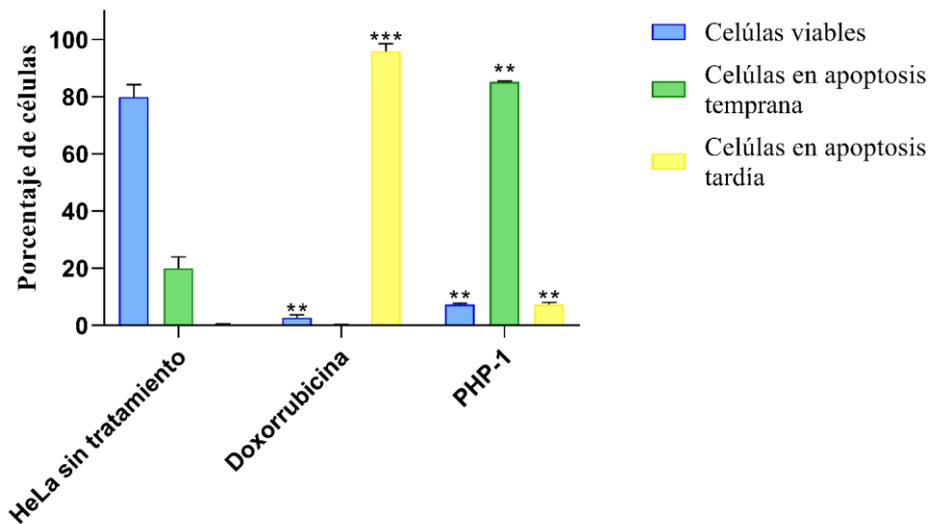


Fig. 5 La proteína hipotética PHP-1 de *Polaromonas sp.* induce la apoptosis en células de cáncer de cuello uterino. Análisis por citometría de flujo de células de cáncer cervicouterino (HeLa) implementando un marcaje de Annexina V/ PI en un lapso de 24 h. (A) Diagramas de puntos representativo de los grupos experimentales: células sin tratamiento, células tratadas con doxorubicina a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 h, y células tratadas con PHP-1 a una concentración de 12,6 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 h. (B) Los datos representan la media \pm SEM (n=2). Los grupos fueron analizados en comparación con las células sin tratamiento mediante una prueba t-student, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$.

Las proteínas hipotéticas son aquellas que no presentan una función bioquímica conocida, así como tampoco poseen una estructura tridimensional determinada, representando un gran desafío a nivel biológico con el fin de determinar su función; por tanto, se buscan herramientas para tener un poco más de comprensión sobre estas proteínas (Srinivasan et al., 2015). En las *Polaromonas sp.* bacterias gram-negativas, psicrófilas (organismos que tienen la capacidad de vivir en temperaturas menores a 5°C), las

cuales se encuentran en ecosistemas acuáticos como mares, glaciares y suelos; se detectó una proteína recombinante a partir de diversas herramientas bioinformáticas, correspondiendo a una proteína hipotética denominada PHP-1, evidenciándose una semejanza con péptidos antimicrobianos.

Los resultados de este trabajo representan el primer estudio funcional de la proteína hipotética PHP-1 y proporcionan información relevante en cuanto a la actividad de esta proteína. Es de resaltar la necesidad de realizar estudios bioquímicos que validen su estructura y brinden una aproximación de los posibles mecanismos de acción de esta proteína. Así mismo, este estudio destaca la importancia de los estudios bioinformáticos que analicen bioquímicamente y funcionalmente proteínas de microorganismos poco estudiados y que puedan ser empleados con diferentes aplicaciones biomédicas. A partir de un modelamiento bioinformático basado en la secuencia de aminoácidos de la PHP-1 se proporcionó una aproximación de su estructura (datos no publicados). Estos análisis revelaron conformaciones propias de los ACP como α -hélices y láminas- β , que pueden llegar a formar estructuras que lleven a la formación de porosidades en las células cancerígenas. De este modo se tendría un indicio en cuanto a su mecanismo de acción al interactuar con la membrana plasmática de estas células.

3. Conclusiones

- La PHP-1 de la *Polaromonas sp.* presentó una consistencia alta al ser comparada homológamente con otros ACP que tienen actividad en el cáncer de cuello uterino, lo cual sugiere que pueden tener mecanismos de acción homólogos.
- La proteína PHP-1 muestra un efecto citotóxico en la línea celular presentando un notable cambio en su morfología característica de células epiteliales, manifestando una morfología redondeada, granulosa y con pérdida de adherencia. Este cambio fue acompañado por una disminución en la proliferación celular evidenciada en los ensayos de MTT; demostrando de esta forma un efecto citotóxico de la PHP-1 dependiente de la dosis en las células HeLa.
- La PHP-1 ostenta una actividad pro-apoptótica, con una mínima, casi nula actividad necrótica, siendo menor al 1%.

- Este estudio sugiere que la PHP-1 puede actuar como un ACP teniendo características relevantes para actuar como un agente terapéutico para el cáncer de cuello-uterino. Es necesario realizar más estudios debido al poco conocimiento que se tiene sobre esta proteína y sobre la *Polaromonas sp.* Siendo necesario llevar a cabo ensayos en células no tumorales con el objetivo de validar la especificidad de la PHP-1 para células de cáncer de cuello uterino. También es necesaria una caracterización bioquímica de la proteína que permita abordar su mecanismo de acción.

Agradecimientos

Quiero agradecer al grupo de investigación de biología celular y funcional e ingeniería de biomoléculas de la Universidad Antonio Nariño y al proyecto con código de contrato CT 802-2018 de MinCiencias por brindarme los recursos necesarios para llevar a cabo este proyecto. De igual forma quiero agradecer a la Dra. Monica Losada Barragán por su paciencia, por ser un gran apoyo y guía en este proyecto y por darme fuerzas a través de su conocimiento para seguir adelante de la mejor forma posible. También quiero agradecer a mis padres Ramón Torres y Cenciona Viñuela y a mi padrino Eduienberto Torres porque ellos son la luz de mi vida y los que me ayudan a no rendirme ante las adversidades. A mi segunda familia, mis amigos, a los de mi infancia y a los que conocí en este proceso porque dan diferentes matices a mi vida y me han enseñado que no todo es blanco y negro ayudándome a continuar, aunque el camino sea difícil y por último a los profesores de la facultad de ciencias que hicieron parte de mi formación académica ya que sin ellos esto sería un logro incompleto.

Referencias

- Baindara, P., Korpole, S., & Grover, V. (2018). Bacteriocins: Perspective for the development of novel anticancer drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(24), 10393–10408.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9420-8>
- Bravo, L. E. (2016). Estimating the incidence and mortality of cancer in Colombia: What are the best data for public policies? *Colombia Medica*, 71–73.
<https://doi.org/10.25100/cm.v47i2.2381>

- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
- Castro-Jiménez, M. Á., Vera-Cala, L. M., & Posso-Valencia, H. J. (2006). Epidemiología del cáncer de cuello uterino: Estado del arte. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(3), 182–189. <https://doi.org/10.18597/rcog.489>
- Chao, A., Yen, T.-C., & Lai, C.-H. (2014). Diagnosis and staging of cervical cancer. *Advances in Cervical Cancer Management*, 56–67. <https://doi.org/10.2217/fmeb2013.13.71>
- Chen, Y., Jiang, S., Jin, Y., Yin, Y., Yu, G., Lan, X., Cui, M., Liang, Y., Wong, B. H. C., Guo, L., & Sun, H. (2012). Purification and characterization of an antitumor protein with deoxyribonuclease activity from edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(11), 1729–1738. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200316>
- Cibula, Pötter, Planchamp, Avall-Lundqvist, Fischerova, Haie-Meder, Köhler, Landoni, Lax, Lindegaard, Mahantshetty, Mathevet, McCluggage, McCormack, Naik, Nout, Pignata, Ponce, Querleu, ... Raspollini. (2018). The european society of gynaecological oncology/european society for radiotherapy and oncology/european society of pathology guidelines for the management of patients with cervical cancer. *Virchows Archiv*, 472(6), 919–936. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2362-9>
- Darcy, J. L., Lynch, R. C., King, A. J., Robeson, M. S., & Schmidt, S. K. (2011). Global distribution of polaromonas phylotypes - Evidence for a highly successful dispersal capacity. *PLoS ONE*, 6(8), e23742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023742>
- de la Fuente-Núñez, C., Silva, O. N., Lu, T. K., & Franco, O. L. (2017). Antimicrobial peptides: Role in human disease and potential as immunotherapies. *Pharmacology & Therapeutics*, 178, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.04.002>
- Di Tommaso, P., Moretti, S., Xenarios, I., Orobítg, M., Montanyola, A., Chang, J.-M., Taly, J.-F., & Notredame, C. (2011). T-Coffee: A web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic*

Acids Research, 39(suppl), W13–W17. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr245>

Felício, M. R., Silva, O. N., Gonçalves, S., Santos, N. C., & Franco, O. L. (2017). Peptides with dual antimicrobial and anticancer activities. *Frontiers in Chemistry*, 5.

<https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00005>

Floden, E. W., Tommaso, P. D., Chatzou, M., Magis, C., Notredame, C., & Chang, J.-M.

(2016). PSI/TM-Coffee: A web server for fast and accurate multiple sequence alignments of regular and transmembrane proteins using homology extension on reduced databases. *Nucleic*

Acids Research, 44(W1), W339–W343. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw300>

Flores Choque, C. M. (2015). CÁNCER DE CUELLO UTERINO: SITUACIÓN,

ABORDAJE INTEGRAL EN PERÚ Y EN AMÉRICA LATINA. *SCIENTIARVM*, 1(1), 3–5.

<https://doi.org/10.26696/sci.epg.0027>

G Capote Negrin, L. (2015). Epidemiology of cervical cancer in Latin America.

Ecancermedicalscience, 9. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2015.577>

Galperin, M. Y. (2004). “Conserved hypothetical” proteins: Prioritization of targets for experimental study. *Nucleic Acids Research*, 32(18), 5452–5463.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkh885>

Gatti, A., Haruyama, R., Elit, L., Howard, S. C., Lam, C. G., Ilbawi, A., Angioli, R., Cao, X.,

& Fidarova, E. (2020). How to reduce the impact of cervical cancer worldwide: Gaps and priority areas identified through the essential cancer and primary care packages: An analysis of

effective interventions. *Cancer*, 126(21), 4697–4705. <https://doi.org/10.1002/cncr.33116>

Hancock, R. E. W., & Lehrer, R. (1998). Cationic peptides: A new source of antibiotics.

Trends in Biotechnology, 16(2), 82–88. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(97\)01156-6](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(97)01156-6)

Hoskin, D. W., & Ramamoorthy, A. (2008). Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(2), 357–375.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.11.008>

Ke, X., & Shen, L. (2017). Molecular targeted therapy of cancer: The progress and future

prospect. *Frontiers in Laboratory Medicine*, 1(2), 69–75.

<https://doi.org/10.1016/j.flm.2017.06.001>

Koo, H. B., & Seo, J. (2019). Antimicrobial peptides under clinical investigation. *Peptide Science*, 111(5). <https://doi.org/10.1002/pep2.24122>

Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), pdb.prot095505.

<https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>

Momenimovahed, Z., & Salehiniya, H. (2017). Incidence, mortality and risk factors of cervical cancer in the world. *Biomedical Research and Therapy*, 4(12), 1795.

<https://doi.org/10.15419/bmrat.v4i12.386>

Papo, N., & Shai, Y. (2005). Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(7–8), 784–790.

<https://doi.org/10.1007/s00018-005-4560-2>

Pardo, C., & de Vries, E. (2017). Supervivencia global de pacientes con cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología (INC). *Revista Colombiana de Cancerología*, 21(1), 12–18.

<https://doi.org/10.1016/j.rccan.2017.01.003>

Pardo, C., & de Vries, E. (2018). Breast and cervical cancer survival at Instituto Nacional de Cancerología, Colombia. *Colombia Médica*, 102–108. <https://doi.org/10.25100/cm.v49i1.2840>

Raheem, N., & Straus, S. K. (2019). Mechanisms of action for antimicrobial peptides with antibacterial and antibiofilm functions. *Frontiers in Microbiology*, 10.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02866>

Sasco, A. J. (2002). Epidemiología del cáncer de cuello uterino. *EMC - Ginecología-Obstetricia*, 38(3), 1–6. [https://doi.org/10.1016/s1283-081x\(02\)71900-0](https://doi.org/10.1016/s1283-081x(02)71900-0)

Savini, F., Loffredo, M. R., Troiano, C., Bobone, S., Malanovic, N., Eichmann, T. O., Caprio, L., Canale, V. C., Park, Y., Mangoni, M. L., & Stella, L. (2020). Binding of an antimicrobial peptide to bacterial cells: Interaction with different species, strains and cellular components.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1862(8), 183291.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183291>

Serrano, R. O., Pérez, C. J. U., Martínez, L. A. D., & Romero, Y. R. D. (n.d.-a). Factores de riesgo para cáncer de cuello uterino. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 55(2), 146–160.

Serrano, R. O., Pérez, C. J. U., Martínez, L. A. D., & Romero, Y. R. D. (n.d.-b). Factores de riesgo para cáncer de cuello uterino. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 55(2), 146–160.

Srinivasan, B., Kempaiah Nagappa, L., Shukla, A., & Balaram, H. (2015). Prediction of substrate specificity and preliminary kinetic characterization of the hypothetical protein PVX_123945 from *Plasmodium vivax*. *Experimental Parasitology*, 151–152, 56–63.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.01.013>

Thomas, G. H. (1999). Completing the *E. coli* proteome: A database of gene products characterised since the completion of the genome sequence. *Bioinformatics*, 15(10), 860–861.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/15.10.860>

Tornesello, A. L., Borrelli, A., Buonaguro, L., Buonaguro, F. M., & Tornesello, M. L. (2020). Antimicrobial peptides as anticancer agents: Functional properties and biological activities. *Molecules*, 25(12), 2850. <https://doi.org/10.3390/molecules25122850>

Travkova, O. G., Moehwald, H., & Brezesinski, G. (2017). The interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 247, 521–532.

<https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.06.001>

Valdivia Ponce, E., Galdós, R., Pinedo, T., & Canales, L. (2015). Contribución a la epidemiología del cáncer de cuello uterino en el Perú. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 15(1), 9–34. <https://doi.org/10.31403/rpgo.v15i829>

Wang, Z., Chang, X., Yang, X., Pan, L., & Dai, J. (2014). Draft Genome Sequence of

Polaromonas glacialis Strain R3-9, a Psychrotolerant Bacterium Isolated from Arctic Glacial

Foreland. *Genome Announcements*, 2(4). <https://doi.org/10.1128/genomea.00695-14>

Yamaji-Hasegawa, A., Hullin-Matsuda, F., Greimel, P., & Kobayashi, T. (2016). Pore-forming toxins: Properties, diversity, and uses as tools to image sphingomyelin and ceramide phosphoethanolamine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(3), 576–592. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.012>

You, W., & Henneberg, M. (2017). Cancer incidence increasing globally: The role of relaxed natural selection. *Evolutionary Applications*, 11(2), 140–152. <https://doi.org/10.1111/eva.125>

