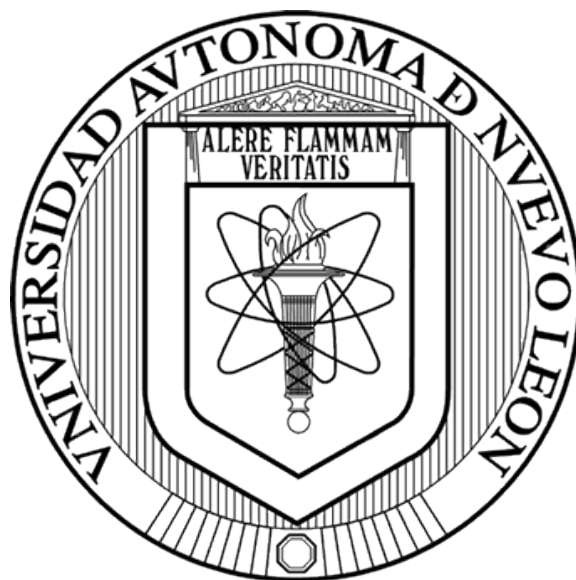


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA TAT-PTEN-LTV Y SU
EFECTO CITOTÓXICO BIODIRIGIDO A CÉLULAS DE CÁNCER
DE MAMA HER2-POSITIVO**

POR

L.B.G. ALDO OMAR GONZÁLEZ CRUZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

MARZO, 2022

“PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA TAT-PTEN-LTV Y SU EFECTO CITOTÓXICO BIODIRIGIDO A CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HER2-POSITIVO”

Aprobación de la tesis:



DR. EDER UBALDO ARREDONDO ESPINOZA

Presidente



DRA. MÓNICA AZUCENA RAMÍREZ CABRERA

Secretaria



DR. OMAR GONZÁLEZ SANTIAGO

Vocal



DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS

Sub-Directora de Posgrado

“PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA TAT-PTEN-LTV Y SU EFECTO CITOTÓXICO BIODIRIGIDO A CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HER2-POSITIVO”

Revisión de la tesis:



DR. EDER UBALDO ARREDONDO ESPINOZA

Asesor



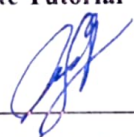
DR. MARCOS JAIR GUERRERO MUÑOZ

Co-Asesor



DRA. MÓNICA AZUCENA RAMÍREZ CABRERA

Comité Tutorial



DR. OMAR GONZÁLEZ SANTIAGO

Comité Tutorial



DRA. MARÍA DEL ROSARIO GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Comité Tutorial



DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS

Sub-Directora de Posgrado

RESUMEN

L.B.G. Aldo Omar González Cruz

Fecha de Graduación: Marzo, 2022

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA TAT-PTEN-LTV Y SU EFECTO CITOTÓXICO BIODIRIGIDO A CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HER2-POSITIVO

Número de páginas: 66

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Farmacia

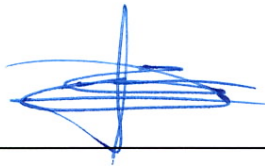
Área de Estudio: Biotecnología Farmacéutica

Propósito y Método de Estudio: Actualmente, el cáncer de mama es aquel con mayor incidencia en la población femenina a nivel mundial y destaca como la primera causa de muerte por tumores malignos en México, causando cerca de 8 mil fallecimientos en el año 2020. Alrededor del 20% de los cánceres de mama sobreexpresan el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), por lo tanto, tienden a ser más agresivos debido a la desregulación del control del ciclo celular y supervivencia. Por ello, se han desarrollado terapias contra cáncer de mama dirigidas al receptor HER2, sin embargo no son completamente efectivas y algunas pueden provocar graves efectos adversos al paciente. Para resolver estas problemáticas, la implementación de péptidos penetrantes de células (CPP), puede potenciar la efectividad de las terapias actuales. De igual manera, el acoplamiento de péptidos *tumor-homing* mejoraría la selectividad, reduciendo efectos adversos.

Por lo antes mencionado, se propone como alternativa en el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos a cáncer de mama HER2-positivo: a la proteína quimérica TAT-PTEN-LTV. Conformada por el CPP TAT, el péptido *tumor-homing* LTV (específico para HER2) y la proteína supresora de tumor, PTEN, capaz de inhibir la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR. La secuencia codificante para la proteína quimérica TAT-PTEN-LTV fue diseñada y posteriormente analizada por medio de los servidores I-TASSER y Cluspro 2.0 para predecir sus características estructurales. Al obtener el vector recombinante, se realizó la transformación de *Escherichia coli* DH5 α y la transfección de células HEK293T para amplificar la secuencia y expresar la proteína respectivamente, esto para proceder a los ensayos de co-cultivo sin contacto y viabilidad celular por WST-1.

Contribuciones y Conclusiones: En este proyecto, ha sido posible el diseño racional, la predicción y análisis de la proteína quimérica TAT-PTEN-LTV por métodos bioinformáticos, datos que permiten inferir su potencial de acción anticancerígena y selectiva a células de cáncer de mama HER2-positivo. A su vez, se ha obtenido el vector de expresión pCEFL que integra la secuencia codificante de TAT-PTEN-LTV, usado para transfectar células HEK293T, mismas que permitieron evaluar el efecto de esta proteína sobre células MCF7 y HCC1954 por medio de un ensayo de co-cultivo sin contacto. Los resultados obtenidos con el ensayo de WST-1, confirman el efecto anticancerígeno y selectivo de TAT-PTEN-LTV sobre las células de cáncer de mama HER2-positivo.

Firma del asesor: _____



Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza

DEDICATORIA

A Mi Amada Esposa

A Mi Mamá y Mi Papá

A Mis Hermanos

A Mis Suegros

A Mis Amigos

AGRADECIMIENTOS

Al **Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos** por brindarme el espacio y recursos necesarios para trabajar durante mis dos años de maestría.

A la **Facultad de Ciencias Químicas** por aceptarme y permitir que realizara mis estudios de posgrado en esta institución.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo económico brindado durante mis estudios.

Al **Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza** por permitirme ser su alumno, por compartir sus consejos y conocimientos, por todo el apoyo que me ha brindado y por servir como guía durante esta etapa de mi vida. Muchas gracias Doc.

Al **Dr. Marcos Jair Guerrero Muñoz** por todos los consejos que me ha brindado para la realización de mi proyecto de tesis. Gracias por compartir su experiencia conmigo.

A Mi Comité Tutorial: **Dr. Omar González Santiago, Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera y Dra. María del Rosario González González** por todos sus comentarios y consejos brindados que han sido de gran ayuda para este proyecto y para mí como estudiante.

A Mis profesores: **Dr. Isaías Balderas, Dr. Xristo Zárate, Dra. Lucía Cantú** por enriquecer mi conocimiento en las áreas de biotecnología y farmacia. Gracias por sus consejos y experiencias.

A **Mis compañeros de laboratorio** por todo el apoyo, consejos y convivencia compartida durante este tiempo. Gracias chicos.

A Mi gran amigo **Carlos Puente** por convencerme de seguir mi sueño de realizar mis estudios de posgrado y en general por ser un excelente amigo y colega de la ciencia. Muchas gracias Carlos.

A **Mis amigos** por apoyarme en mis distintos proyectos, por compartir conocimientos y vivencias que me permiten crecer como persona y como profesionalista. Gracias a Todos.

A **Mi familia** por todo el apoyo incondicional que me ha brindado durante cada etapa de mi vida. Gracias, no los defraudaré.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
RESUMEN.....	iv
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
TABLA DE CONTENIDO.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
NOMENCLATURA.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. EL CÁNCER.....	1
1.1.1. Cáncer de mama.....	5
1.1.2. Tratamientos actuales contra el cáncer de mama.....	7
1.1.3. Cáncer de mama HER2-positivo.....	8
1.2. Vía PI3K como blanco terapéutico contra el cáncer.....	10
1.3. Proteína homólogo de fosfatasa y tensina PTEN.....	13
1.4. Péptidos para el mejoramiento de terapias.....	15
1.4.1. Péptidos penetrantes de células (CPPs).....	16
1.4.2. Péptidos <i>tumor-homing</i>	18
1.5. ANTECEDENTES.....	19

1.5.1.	Estudios del potencial anticancerígeno de PTEN.....	19
1.5.2.	Estudios de CPPs y su aplicación contra el cáncer	21
1.5.3.	Estudios de selectividad contra el cáncer de los péptidos tumor-homing.....	23
1.6.	JUSTIFICACIÓN	25
1.7.	HIPÓTESIS	26
1.8.	OBJETIVOS.....	26
1.8.1.	Objetivo General	26
1.8.2.	Objetivos Específicos	26
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1.	PRODUCCIÓN DE TAT-PTEN-LTV.....	28
2.1.1.	Obtención, construcción y análisis de secuencias.....	28
2.1.2.	Transformación de <i>Escherichia coli</i> con vector de clonación	29
2.1.3.	Preparación de vector de expresión.....	30
2.1.4.	Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α con vector pCEFL-TatPtenLtv	31
2.1.5.	Transfección de células HEK293T	33
2.2.	EVALUACIÓN BIOLÓGICA.....	35
2.2.1.	Ensayo de co-cultivo sin contacto y determinación de viabilidad celular por el método de WST-1.....	35
2.2.2.	Disposición de residuos generados.....	36
3.	RESULTADOS	37
3.1.	PRODUCCIÓN DE TAT-PTEN-LTV.....	37
3.1.1.	Obtención, construcción y análisis de secuencias.....	37
3.1.2.	Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α con vector de clonación	42
3.1.3.	Preparación de vector de expresión.....	43
3.1.4.	Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α con vector pCEFL-TatPtenLtv	43
3.1.5.	Transfección de células HEK293T	44
3.2.	EVALUACIÓN BIOLÓGICA.....	46
3.2.1.	Ensayo de co-cultivo sin contacto y determinación de viabilidad celular por el método de WST-1.....	46
4.	DISCUSIÓN	48
5.	CONCLUSIONES.....	51
6.	PERSPECTIVAS	52

REFERENCIAS..... 53

APÉNDICE A..... 64

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Subtipos de cáncer de mama.....	6
2. Tratamientos actuales dirigidos a cáncer de mama.....	7
3. Ejemplos de CPPs y su clasificación físico-química.....	17
4. Ejemplos de péptidos <i>tumor-homing</i> y sus respectivas dianas.....	19
5. Reacción de digestión de 1.5 µg de pUC57-TatPtenLtv.....	30
6. Reacción de digestión de 1.5 µg de pCEFL.....	31
7. Reacción de ligación pCEFL + TatPtenLtv (1:7).....	31
8. Reacción de PCR confirmatoria.....	32
9. Condiciones de PCR confirmatoria.....	33
10. Parámetros de transfección Xfect.....	34
11. Resultado del diseño y análisis de los oligonucleótidos.....	42
12. Cuantificación de ADN plasmídico.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Composición del tejido mamario.....	6
2. Sobreexpresión de HER2 en células de cáncer de mama.....	9
3. Esquema general de la vía PI3K-AKT-mTOR.....	12
4. Estructura general de PTEN.....	13
5. Regulación conformacional de PTEN.....	14
6. Construcción de Tat-Pten-Ltv.....	39
7. Modelo tridimensional predictivo de TAT-PTEN-LTV.....	40
8. Comparación de TAT-PTEN-LTV vs PTEN reportada.....	40
9. Predicción de accesibilidad de los péptidos TAT y LTV.....	41
10. <i>Docking</i> proteína – receptor.....	41
11. Productos de la digestión por BglII y BamHI en gel de agarosa 1 %.....	43
12. Productos de amplificación del inserto TatPtenLtv en gel de agarosa al 1%.....	44
13. Gráfica de intensidad de fluorescencia.....	45
14. Fluorescencia emitida por células HEK293T.....	45
15. Gráfica de inhibición celular.....	47

NOMENCLATURA

°C	Grados celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrómetro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ASB	Albúmina de suero bovino
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
CO₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético

EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ER	Receptores de estrógeno
ErbB	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
h	Horas
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
IC₅₀	Concentración inhibitoria media máxima
IMAC	Cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados
IFNα2	Interferón alfa 2
M	Molaridad
MAPK	Proteína quinasa activada a mitógeno
MDR	Multi-fármaco resistencia
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	Bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
nm	Nanómetros

ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfato salino
PTEN	Homólogo de fosfatasa y tensina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato
PR	Receptores de progesterona
rpm	Revoluciones por minuto
RTK	Receptor tirosina quinasa
s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida y dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
V	Voltios
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WST-1	4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. EL CÁNCER

El cáncer es uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial, se estima que en 2020 provocó 9.9 millones de defunciones, y se enlistan 5 tipos de cáncer responsables del mayor número de fallecimientos: cáncer pulmonar, cáncer hepático, cáncer gástrico, cáncer de mama y cáncer colorrectal.¹ En general, el cáncer se define como un desorden de células que proliferan de manera descontrolada, característica que provoca la formación de agregados celulares llamados neoplasias o tumores, y crecen dañando tejidos sanos. Adicionalmente las células cancerosas tienen la capacidad de migrar y colonizar tejidos lejanos donde continúan proliferando, a este proceso se le conoce como metástasis y es la principal causa de muerte por esta enfermedad.²

Al proceso por el que se origina una célula cancerosa se le denomina carcinogénesis u oncogénesis, esto puede ser provocado por errores o mutaciones en el genoma durante la replicación del material genético, reparación de ADN o la mitosis, estos daños también

pueden ocurrir al exponer el material genético a agentes mutagénicos.³ Para que un cáncer pueda desarrollarse, los daños en el genoma deben ubicarse en genes involucrados en la regulación del crecimiento celular y provocar ya sea pérdida o ganancia de función, tal es el caso de las mutaciones en protooncogenes, genes de reparación de ADN y genes supresores de tumores.⁴

En general, las células tumorales exhiben diez características en común, las cuales se estudian a detalle con el fin de comprender la enfermedad y lograr la elaboración de nuevos blancos terapéuticos.^{2,3} Dichas características se enlistan a continuación.

- **Alta proliferación celular independiente de señales de crecimiento.** De manera normal, las células sufren estímulos por señales externas de proliferación como factores de crecimiento, estos activan receptores presentes en la célula y promueven la activación de vías de señalización que regulan el ciclo celular.⁵ En una célula tumoral, ocurren mutaciones en los proto-oncogenes, los cuales están involucrados en la regulación de la división celular, dando lugar a los llamados ‘oncogenes’. Los oncogenes confieren la capacidad de mantener activo el crecimiento y división celular anormal mediante la síntesis de ligandos similares a factores de crecimiento, expresión de nuevos receptores membranales para la respuesta a señales proliferativas, entre otros mecanismos.³
- **Resistencia a estímulos que inhiben el crecimiento.** Existen vías de regulación negativa de la división celular en la que actúan los genes supresores de tumor, limitando la proliferación y crecimiento tumoral. Al ocurrir mutaciones que provocan la pérdida de función en estos genes reguladores, la división celular se lleva a cabo de manera descontrolada.⁶

- **Metástasis.** Esta característica representa la mayor causa de muerte asociada a los tumores sólidos dada la diseminación de los mismos y colonización de otros tejidos distribuidos en el organismo.⁷ La metástasis es un proceso que comprende una serie de eventos consecutivos, iniciando por la invasión local, continuando con la intravasación (en vasos sanguíneos o linfáticos), ingreso a otros tejidos, y finalizando con la formación de nuevos agregados de células cancerosas.²
- **Inhibición de apoptosis.** Un mecanismo normal para mantener la homeostasis tisular conocido como apoptosis o muerte celular programada, es activado mediante diversos estímulos que culminan en la degradación celular, sin embargo, debido a la cantidad de mutaciones acumuladas en una célula tumoral, esta característica se pierde.³
- **Potencial de replicación ilimitado.** En los extremos de los cromosomas se encuentran secuencias repetidas en tándem, conocidas como telómeros, los cuales sufren un acortamiento continuo con el paso de cada división celular; al momento en que estas secuencias llegan a su límite, la célula deja de proliferar y pasa a un estado de senescencia o apoptosis.² Debido a que la mayoría de células tumorales expresan la enzima telomerasa, pueden alargar la secuencia de sus telómeros de manera indefinida, permitiéndoles sobrepasar el límite de división celular.³
- **Inducción de angiogénesis.** Para que un tumor pueda continuar su desarrollo continuo, éste requiere de nutrientes y oxígeno como el resto de los tejidos, el cáncer presenta la característica de inducir la formación de vasos sanguíneos a partir de los presentes en otros tejidos favoreciendo su propio desarrollo y consiguiente metástasis.⁸

- **Reprogramación de metabolismo.** En condiciones aeróbicas, las células normales procesan la glucosa, primero a piruvato a través de la glucólisis en el citosol y luego a dióxido de carbono en la mitocondria; en condiciones anaeróbicas, se favorece la glucólisis y se envía relativamente poco piruvato a las mitocondrias que consumen oxígeno. Incluso en presencia de oxígeno, las células cancerosas pueden reprogramar su metabolismo de la glucosa y, por lo tanto, su producción de energía, limitando su metabolismo energético en gran medida a la glucólisis, lo que lleva a un estado que se ha denominado “glucólisis aeróbica” o “efecto *Warburg*”.³
- **Resistencia a respuesta inmune.** Naturalmente el desarrollo de células tumorales es eliminado por mecanismos del sistema inmune innato y adaptativo, pero, en la mayoría de los casos se presenta cierto grado de inmuno-tolerancia. Además, debido a su inestabilidad genómica, las células cancerosas cambian constantemente su conformación antigénica y pueden producir inmunomoduladores, ocasionando una resistencia a la respuesta inmunológica.²
- **Promoción de la inflamación.** Algunos tumores están densamente infiltrados por células del sistema inmune innato y adaptativo y, por lo tanto, reflejan las condiciones inflamatorias que surgen en tejidos no neoplásicos. Actualmente, está claro que toda lesión neoplásica contiene células inmunes presentes al menos en densidades sutiles.³
- **Inestabilidad genómica y mutación.** Todo lo anterior depende en gran parte del resultado de las alteraciones genómicas de las células de cáncer. Ciertos genotipos mutantes confieren una ventaja que permite su crecimiento y eventual dominio del tejido. En consecuencia, la progresión del tumor puede describirse como una sucesión de expansiones clonales, cada una de las cuales se desencadena por la adquisición

fortuita de un genotipo mutante habilitante.³ Otras alteraciones, como la inactivación de genes supresores de tumores, también pueden producirse mediante mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN y la modificación de histonas.⁹

1.1.1. Cáncer de mama

En el año 2020 el cáncer de mama causó 684,996 defunciones en el mundo. En México, el cáncer de mama destaca como la primera causa de muerte por tumores malignos en la población femenina del país, siendo el causante de 7,931 fallecimientos en el 2020.¹⁰ Al igual que otros, el cáncer de mama empieza con el crecimiento anormal o descontrolado de células, en este caso, de aquellas localizadas en el tejido mamario. Las mamas se conforman de tres partes principales como se muestra en la figura 1: lobulillos (glándulas que producen leche), conductos galactóforos (transportan la leche al pezón) y tejido conectivo (formado por tejido fibroso y adiposo que rodea y sostiene todas las partes de la mama). De acuerdo a el centro para el control y prevención de enfermedades (CDC) de Estados Unidos de América, los tipos más comunes de cáncer de mama son el carcinoma lobulillar infiltrante y el carcinoma ductal infiltrante, originados en los lobulillos y en los conductos respectivamente, a partir de estos tejidos, las células cancerosas pueden diseminarse e invadir tejidos mamaros cercanos y otras partes del cuerpo.¹¹

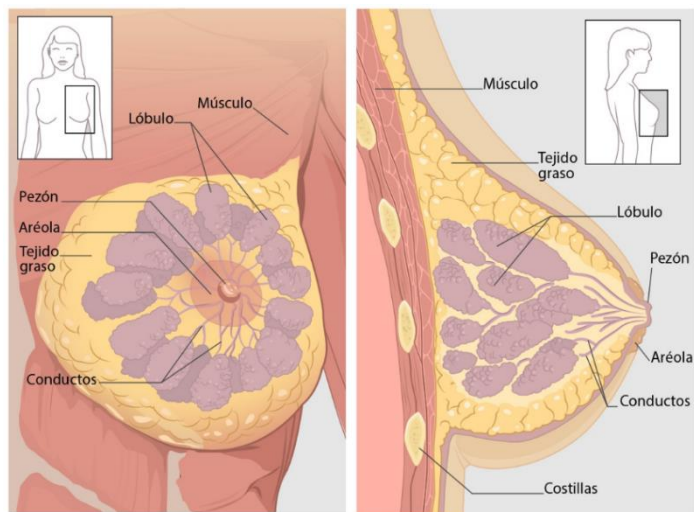


Figura 1. Composición del tejido mamario.¹¹

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea y de acuerdo a sus perfiles de expresión genética se ha clasificado en 4 diferentes subtipos (descritos en la tabla 1): Luminal A, luminal B, tipo basal y sobreexpresión de receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2).^{12,13}

TABLA 1

SUBTIPOS DE CÁNCER DE MAMA

Subtipo	Descripción
Luminal A	Receptores de estrógeno (ER) y/o receptores de progesterona (PR) positivos y HER2 negativo.
Luminal B	Receptores de hormonas (ER y/o PR) positivos y HER2-positivo.
HER2 sobreexpresado	Receptores de hormonas negativos y HER2-positivo.
Tipo basal	Receptores de hormonas negativos y HER2 negativo (también se conoce como fenotipo triple negativo).

1.1.2. Tratamientos actuales contra el cáncer de mama

Los tratamientos dirigidos a cáncer de mama pueden incluir la administración de quimioterapias, y de acuerdo al subtipo al que pertenece, estos pueden requerir terapias dirigidas a los receptores hormonales y/o específicos para HER2 (tabla 2). Las quimioterapias comúnmente usadas son medicamentos antineoplásicos como el paclitaxel, docetaxel y ciclofosfamida, entre las terapias hormonales se menciona el tamoxifeno, letrozol y anastrozol, y en caso de los tratamientos específicos para HER2 se encuentran los anticuerpos monoclonales trastuzumab y pertuzumab. A fin de lograr una mayor efectividad, los tratamientos son administrados en combinaciones específicas de acuerdo a las condiciones del cáncer.¹⁴

TABLA 2

TRATAMIENTOS ACTUALES DIRIGIDOS A CÁNCER DE MAMA

	Luminal A	Luminal B y HER2+	Tipo basal
Terapias típicas	Terapia endocrina: • Tamoxifeno • Letrozol • Anastrozol • Exemestano	Quimioterapia + terapia dirigida a HER2: • Paclitaxel • Adriamicina • Ciclofosfamida • Docetaxel • Carboplatino • Trastuzumab • Pertuzumab • Lapatinib	Quimioterapia: • Adriamicina • Ciclofosfamida • Paclitaxel • Docetaxel
	Quimioterapia: • Adriamicina • Ciclofosfamida • Paclitaxel • Docetaxel	Terapia endocrina: • Tamoxifeno • Letrozol • Anastrozol • Exemestano	

1.1.3. Cáncer de mama HER2-positivo

Los receptores tirosina quinasas son proteínas transmembranales que participan en diversas funciones celulares, como el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular.⁷ Entre estos receptores, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el EGFR 2 humano (HER2) son receptores monoméricos de la superficie celular que forman parte de la familia ErbB de receptores tirosina quinasas.^{15,16} La familia del EGFR juega un papel crucial en el crecimiento de tumores malignos. La sobreexpresión de la proteína EGFR y HER2 se asocia con un pronóstico desfavorable y son importantes dianas terapéuticas en el cáncer de mama.¹⁶

Entre el 15% y 20% de los cánceres de mama son HER2-positivo, por lo tanto exhiben un exceso del receptor HER2 (ver figura 2), tendiendo a ser más agresivos y presentando elevadas tasas de recaídas, esto se debe a que HER2 está involucrado en la regulación de la diferenciación celular, migración y control de ciclo celular, apoptosis y angiogénesis, por medio de la activación de múltiples rutas de señalización incluyendo la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)-AKT-mTOR y cascadas de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK).¹⁷ Por esta razón, el receptor HER2 ha sido estudiado ampliamente con el fin de generar de nuevas terapias para el tratamiento de cáncer de mama. Un elemento clave para el exitoso desarrollo de fármacos dirigidos a HER2 ha sido la selección de candidatos para tratamiento basado en el nivel de positividad de HER2 de los tumores.¹⁵

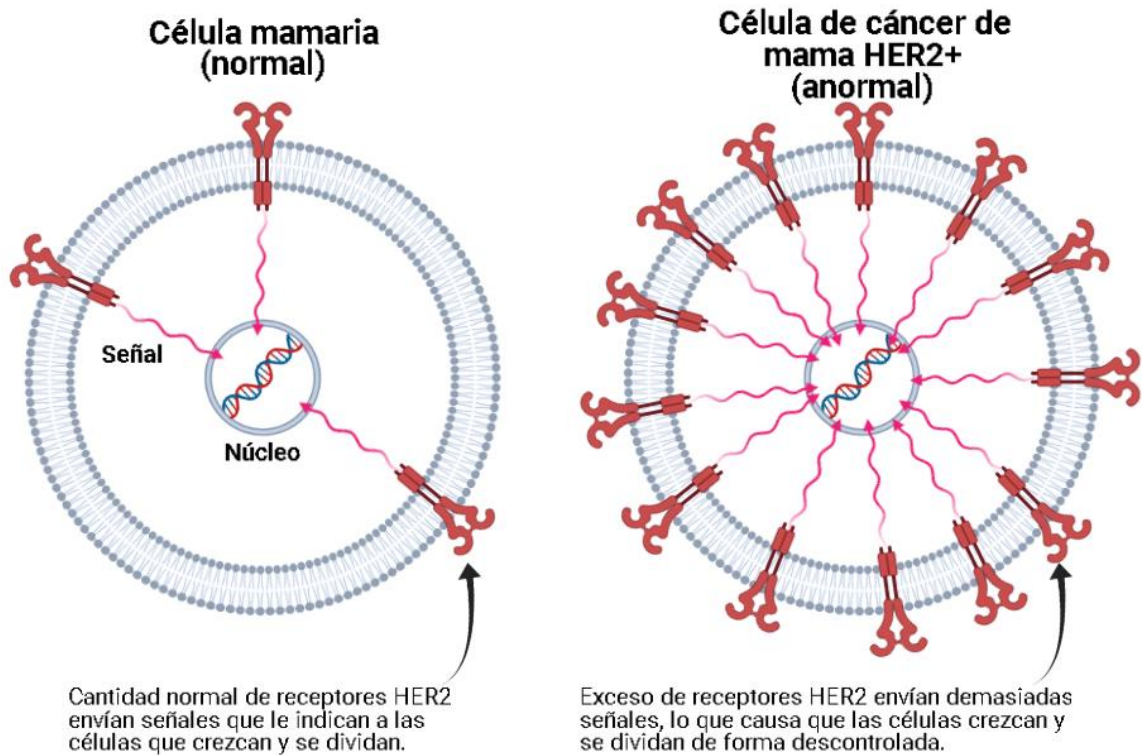


Figura 2. Sobreexpresión de HER2 en células de cáncer de mama.

Sin embargo, los tratamientos aplicados en la actualidad presentan algunas desventajas, tal es el caso del trastuzumab, con el cual la mayoría de los pacientes que inicialmente tienen buena respuesta al tratamiento, comienzan a mostrar una progresión en la enfermedad al cabo de un año, lo que es provocado por un decremento en la interacción de trastuzumab con el receptor HER2.¹⁸ Existen diversas propuestas que explican el mecanismo de resistencia a trastuzumab, dentro de ellas destaca la disrupción de interacción con HER2 debido a la sobreexpresión de la mucina 4 (MUC4) que impide la interacción del anticuerpo con el receptor, se ha llegado a esta inferencia debido a que al realizar un *knockdown* a MUC4 se reestablece la sensibilidad a trastuzumab *in vitro*, otro mecanismo de resistencia se correlaciona a la alteración de procesos de señalización como

la deficiencia de la proteína homóloga de fosfatasa y tensina (PTEN) y la actividad incrementada de AKT.¹⁹ Además, diferentes estudios centrados en el tratamiento con trastuzumab han determinado que este anticuerpo monoclonal exhibe un efecto cardiotoxico y por lo tanto se requiere un monitoreo cardio-oncológico continuo de los pacientes.²⁰

1.2. Vía PI3K como blanco terapéutico contra el cáncer

La señalización de PI3K-AKT-mTOR es una de las vías intracelulares más importantes, que regula el crecimiento celular, la motilidad, la supervivencia, el metabolismo y la angiogénesis.¹⁶ La activación de la vía PI3K-AKT-mTOR contribuye al desarrollo de tumores y resistencia a las terapias contra el cáncer.²¹

PI3K es un grupo de lípido-quinetas asociadas a la membrana plasmática, que constan de tres subunidades: subunidad reguladora p85, subunidad reguladora p55 y subunidad catalítica p110.²² Según sus diferentes estructuras y sustratos específicos, PI3K se divide en las clases I, II y III.²³ PI3K de clase I está compuesto por las clases IA y IB. La clase PI3K IA, un heterodímero de la subunidad reguladora p58 y la subunidad catalítica p110, es el tipo más claramente implicado en el cáncer humano.²⁴ La clase PI3K IA contiene subunidades catalíticas p110 α , p110 β y p110 δ producidas a partir de diferentes genes (PIK3CA, PIK3CB y PIK3CD, respectivamente), mientras que p110 γ producido por PIK3CG representa la única subunidad catalítica en la clase IB.²³ La subunidad reguladora p85 está compuesta por p85a, p85b y p55g, que están codificadas por los genes PIK3R1, PIK3R2 y PIK3R3, respectivamente.²⁵ Como punto de integración para la activación de p110, la subunidad reguladora de p85 se une e integra señales de varias proteínas transmembrana e intracelulares, incluidos receptores unidos a tirosina quinasa, proteína

quinasa C (PKC), proteína tirosina fosfatasa 1 (SHP1), Rac, Rho, receptores hormonales, Src, así como Ras mutado.²²

En las condiciones normales, la subunidad catalítica p110 se estabiliza mediante dimerización con la subunidad reguladora p85. En condiciones fisiológicas, PI3K normalmente se activa a través de una variedad de estímulos extracelulares, como factores de crecimiento, citocinas y hormonas.²⁶ Tras su activación, PI3K cataliza la fosforilación de Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) para producir fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), un segundo mensajero que une y recluta un subconjunto de dominios de unión a lípidos (como C1 y C2) de dianas río abajo a la membrana celular. Una variedad de proteínas de señalización, como las quinasas AKT y PDK1, pueden unirse a los productos lipídicos de PI3K y, por lo tanto, localizarse en la membrana celular para activar el crecimiento celular y las vías de supervivencia celular.²⁵ El homólogo de fosfatasa y tensina eliminado en el cromosoma 10 (PTEN) regula la vía al desfosforilar PIP3 a PIP2 y, por lo tanto, previene la activación de quinasas río abajo.²⁷ En la figura 3 se muestra el esquema general de la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR.

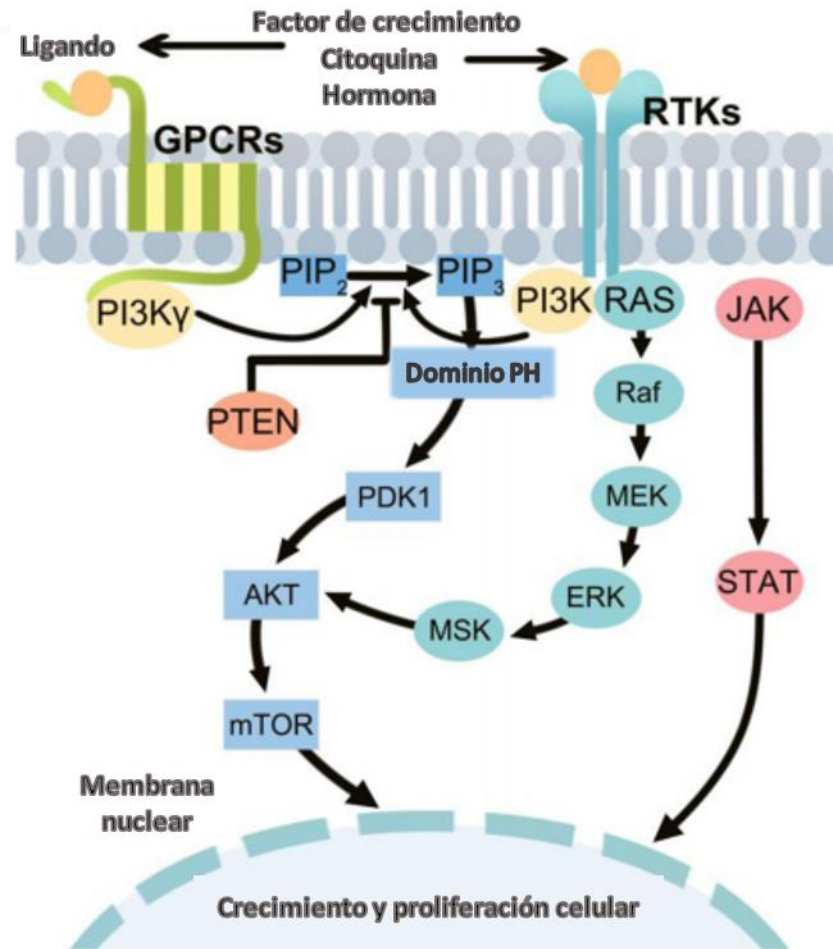


Figura 3. Esquema general de la vía PI3K-AKT-mTOR (traducida de Yang et al., 2019).²⁵

La vía de PI3K se desregula a través de una variedad de mecanismos, incluida la pérdida o inactivación del supresor de tumores PTEN, la mutación o amplificación de PI3K, así como la activación de receptores de factor de crecimiento con actividad tirosina quinasa (como el caso de la sobreexpresión de HER2) u oncogenes río arriba de PI3K.²⁸

Se ha descubierto que la vía PI3K-AKT-mTOR está desregulada en casi todos los cánceres humanos, como el cáncer de mama, el cáncer colorrectal y las neoplasias malignas hematológicas, lo que enfatiza el valor de esta vía como una posible dirección

terapéutica en el tratamiento del cáncer.²⁹ La inhibición de PI3K puede resultar tanto en una disminución de la proliferación celular como en un aumento de la muerte celular.²⁶

1.3. Proteína homólogo de fosfatasa y tensina PTEN

PTEN es una proteína de múltiples dominios que ejerce funciones supresoras de tumores de una manera dependiente ya sea de la actividad lípido-fosfatasa, proteína-fosfatasa o del *scaffold*.¹⁸ PTEN se compone de cinco dominios funcionales: un dominio de unión corto a N-terminal de PIP2 (PBD), un dominio de fosfatasa catalítica, un dominio de unión a membrana/lípido C2, un extremo C-terminal que contiene secuencias Pro, Glu, Ser y Thr (PEST) y un sitio de unión a PDZ de clase I (PDZ-BD), estos elementos se visualizan en la figura 4. Las secuencias PEST determinan semividas intracelulares breves y se han relacionado con proteínas de orientación para la degradación proteasomal, mientras que PDZ-BD actúa como un sitio de interacción proteína-proteína.³⁰

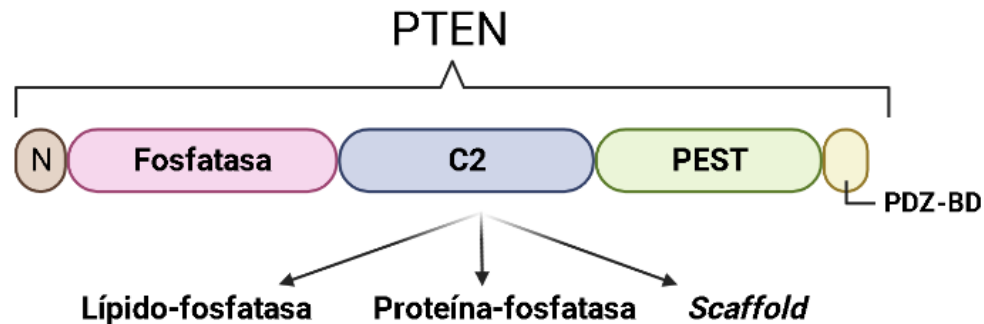


Figura 4. Estructura general de PTEN (adaptada de Lee et al., 2018).³⁰

La fosforilación del extremo C terminal de PTEN promueve una interacción entre la cola ácida y el dominio C2 (conformación cerrada), que a su vez enmascara la unión de PTEN a la membrana. En la conformación abierta, la desfosforilación de PTEN invierte

esta conformación cerrada a una conformación abierta, permitiendo que PTEN se una a la membrana y a las proteínas que contienen el dominio PDZ.³⁰ Este modelo de regulación conformacional de PTEN se presenta en la figura 5.

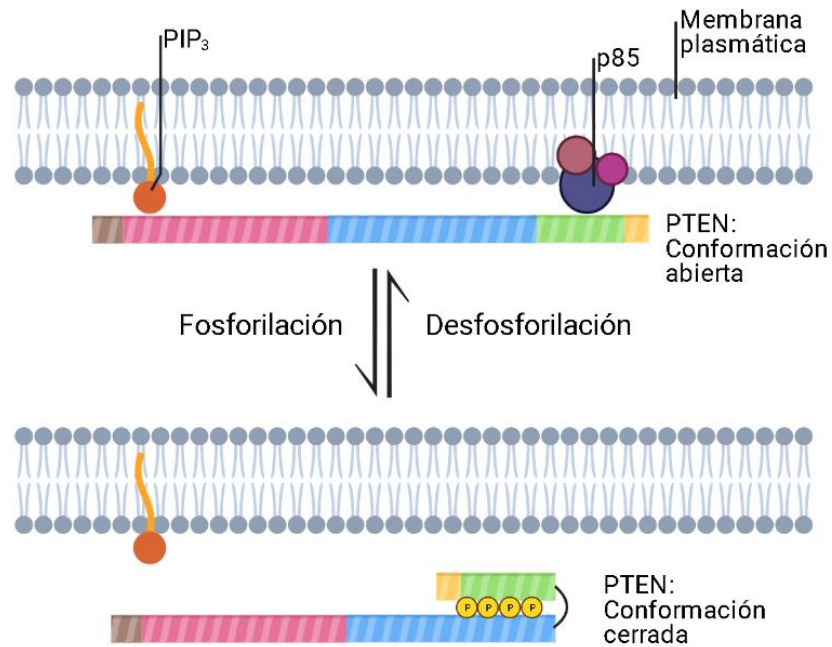


Figura 5. Regulación conformacional de PTEN (adaptada de Lee et al., 2018).³⁰

PTEN actúa como un antagonista directo de la acción de PI3K a través de la desfosforilación de PIP₃,³¹ así como se observa en la figura 3. PTEN es un supresor de tumores bien caracterizado con funciones reguladoras de crecimiento, supervivencia y metabólicas, y su pérdida o inactivación de función se observa con frecuencia en neoplasias malignas hereditarias y esporádicas, como el cáncer de cerebro, cáncer de mama y cáncer de próstata, por mencionar algunos.³² Además, se ha demostrado que pequeños cambios en la expresión de PTEN contribuyen a importantes consecuencias para la función celular normal.²⁸ En ratones con *knock-in* de PTEN que albergan dos mutaciones de PTEN asociadas al cáncer, PTENC124S y PTENG129E inhiben la

actividad lípido-fosfatasa de PTEN de una manera negativa dominante, lo que conduce a un aumento de la actividad de señalización de PI3K y tumorigénesis.³³ Además, en el cáncer con deficiencia de PTEN, la principal causa que conlleva a la carcinogénesis es la sobreactivación de AKT causada por la pérdida de la función lípido-fosfatasa de PTEN.^{21,28} Por ello, PTEN podría servir como una gran alternativa en el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos al cáncer de mama HER2-positivo: regulando la vía PI3K-AKT-mTOR, activada por este receptor. Lamentablemente, PTEN es incapaz de atravesar la membrana plasmática y ejercer su acción en el citoplasma de las células.³⁴ Por lo tanto, es necesario el empleo conjunto de sistemas de liberación intracelular con el fin de alcanzar una aplicación de PTEN como medicamento biotecnológico factible.

1.4. Péptidos para el mejoramiento de terapias

Debido a la incapacidad de atravesar la membrana celular, algunas moléculas con actividad antitumoral, como el caso de PTEN, requieren de vehículos o sistemas de liberación intracelular para llevar a cabo su función terapéutica de manera efectiva, es a partir de este punto en el que cobra importancia el uso de los péptidos penetrantes de células (CPPs), que hoy en día pueden ser usados en el transporte de proteínas terapéuticas u otras moléculas al citoplasma celular.³⁵ De este modo es posible mejorar la efectividad antitumoral de las terapias actuales, sin embargo los efectos adversos de las terapias son otro punto importante por corregir, principalmente asociados a la falta de selectividad de las moléculas sobre la célula diana. El acoplamiento de péptidos *tumor-homing* a medicamentos quimioterapéuticos, es una estrategia realizada con el fin de integrar el reconocimiento de biomarcadores específicos de la célula cancerosa.³⁶

1.4.1. Péptidos penetrantes de células (CPPs)

El término péptido penetrante de células (CPP) se usa para describir una secuencia de aminoácidos corta, generalmente en el rango de 5 a 30 residuos, con capacidad para traslocarse a través de la membrana lipídica de las células.³⁷ Se ha propuesto el uso de CPPs en un enfoque de terapia contra el cáncer con el objetivo de mejorar la eficacia de fármacos, ya que permiten transportar una amplia variedad de moléculas hasta sus dianas intracelulares.^{38,39} Los CPP podrían ser especialmente útiles para la administración intracelular de moléculas terapéuticamente activas en varios tipos de cáncer que son un desafío para el área farmacéutica, ya que se ha visto que el uso de estos péptidos es una buena alternativa contra las células de cáncer resistentes a múltiples fármacos (MDR), lo que permite superar las dificultades del transporte de fármacos para posibles aplicaciones clínicas futuras.^{40,41}

El péptido TAT es un conocido ejemplo de CPP, el cual proviene de la proteína transactivadora de la transcripción del virus de inmunodeficiencia humano (VIH),⁴² y al igual que este, existe una gran variedad de CPPs derivados de proteínas, secuencias antimicrobianas y los obtenidos por métodos sintéticos.⁴³ Estos péptidos se clasifican de acuerdo a sus propiedades físico-químicas, agrupándolas en tres clases principales: catiónicas, anfipáticas e hidrofóbicas,^{43,44} ejemplos mostrados en la tabla 3. De esta forma, es posible correlacionar sus propiedades y patrones de interacción con las membranas lipídicas de las células.

Los CPPs catiónicos han sido descritos como aquellos que contienen una sección de cargas positivas, abundantes en argininas y/o lisinas, esenciales para su internalización a través de membrana, cuya disposición no conduce a la formación de una hélice

anfipática.⁴⁵ La interacción carga-carga entre los grupos catiónicos y los grupos aniónicos en los componentes lipídicos de la membrana celular es un paso crucial para la captación celular por péptidos catiónicos como TAT (YGRKKRRQRRR) y poliargininas.⁴⁶ Además de la carga positiva, la anfipacidad también permite la internalización celular, los CPPs anfipáticos comprenden péptidos tanto catiónicos como aniónicos y se caracterizan por tener un segmento hidrófobo e hidrófilo, esta anfipacidad es una propiedad fundamental para la captación celular porque los CPPs anfipáticos son capaces de atravesar las membranas lipídicas independientemente de la presencia de cargas positivas.⁴⁷ En comparación con los CPP catiónicos y anfipáticos, el número de CPPs hidrofóbicos descubiertos es bajo. Para considerar un CPP como hidrofóbico, al menos debe cumplir con un motivo hidrofóbico crucial para su internalización a diferencia del resto de su secuencia o ser completamente hidrofóbico.⁴⁴

TABLA 3

EJEMPLOS DE CPPS Y SU CLASIFICACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

CPP	Secuencia	Clasificación	Referencias
TAT	YGRKKRRQRRR	Catiónico	38,39,48
Poliarginina	(R4, R8, R9, R12, R16)	Catiónico	46,49
LMWP	VSRRRRRRGGRRRR	Catiónico	50
sC18	GLRKRLRKFRNKIKEK	Catiónico	51
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPK KKRKV	Anfipático	52
hCT(9-32)	LGTYTQDFNKFHTFPQTA IGVGAP	Anfipático	41
BR2	RAGLQFPVGRLLRLLR	Anfipático	53
K-FGF	AAVALLPAVLLAHLAP	Hidrofóbico	41

1.4.2. Péptidos *tumor-homing*

Los péptidos *tumor-homing* son normalmente péptidos cortos, cuya secuencia presenta una longitud de 3 a 15 residuos de aminoácidos, que contienen motivos de secuencia que reconocen y se unen específicamente a una molécula de superficie en células tumorales o vasculatura tumoral.⁵⁴

Los primeros esfuerzos para encontrar péptidos que se dirigieran a proteínas específicas presentes en la superficie celular fueron mediante la obtención de anticuerpos monoclonales para un epítipo en particular, que luego de analizar la interacción anticuerpo-epítipo, es obtenida una secuencia lineal que podría usarse como péptido biodirigido.³⁶ Una razón importante de desarrollar péptidos *homing*, es que a diferencia de los anticuerpos, los péptidos son menos inmunogénicos; por lo que generan una menor respuesta inmunitaria que la observada con el uso de anticuerpos.⁵⁵ En los péptidos *tumor-homing* descubiertos, se observa una afinidad hacia un determinado receptor, lo que hace que el péptido sea capaz de reconocer las células tumorales que sobreexpresan el mismo, mientras que tienen menos interacciones con las células normales; característica importante en la terapia dirigida para reducir los efectos adversos.⁵⁶

Un ejemplo relevante de péptidos *tumor-homing* es LTV (LTVSPWY), el cual reconoce de manera específica a HER2 que, como se ha mencionado anteriormente, es un biomarcador prominente que se encuentra sobreexpresado en dos subtipos de cáncer de mama.^{17,57} El empleo del péptido LTV permite el transporte dirigido de moléculas con actividad terapéutica, representando potenciales terapias anti-cáncer HER2-positivo con efectos adversos reducidos.⁵⁸ Este y otros ejemplos de péptidos tumor-homing se muestran en la tabla 4.

TABLA 4**EJEMPLOS DE PÉPTIDOS *TUMOR-HOMING* Y SUS RESPECTIVAS DIANAS**

Péptido	Secuencia	Diana	Referencia
LTV	LTVSPWY	HER2	57,59
S3	CSHGYTGIRCQHVVLVDYQR	EGFR	60
CP-7	CIQPFYP	VEGFR-3	61
LyP-1	CGNKRTRGC	Vasos linfáticos tumorales (p32)	62

1.5. ANTECEDENTES**1.5.1. Estudios del potencial anticancerígeno de PTEN**

El uso de PTEN ha sido reportado en la literatura como una potencial terapia aplicable a distintos tipos de cáncer. En el año 2003, Tanaka y Grossman evaluaron la terapia génica de PTEN en líneas celulares de cáncer de vejiga, mismas que presentaban mutaciones o pérdida de función de PTEN endógeno. Por medio de análisis Western e inmunohistoquímicos, determinaron un incremento en la expresión de PTEN y un decremento en AKT fosforilado (relacionado a la fármaco-resistencia) en la línea UM-UC-3 modificada con el transgén PTEN en comparación con los controles (PBS y células tratadas con vector sin transgén). Además, por el método TUNEL se observó la inducción de apoptosis en la misma línea celular con la modificación. Por medio de estos resultados ellos demostraron que la expresión forzada de PTEN puede proveer una terapia efectiva contra cáncer de vejiga con fenotipo específico (principalmente aquellos con delección de PTEN y expresión elevada de AKT fosforilado), ya que produce una supresión completa en tumores con este gen deletado, y puede ser mayor su efectividad aplicándose en

conjunto con quimioterapia en el tratamiento de tumores con desregulación de la vía PI3K-AKT-mTOR.⁶³

En el año 2014, Nguyen et al. identificaron mutaciones en la interfaz reguladora de unión a membrana de la proteína PTEN, lo que incrementa su reclutamiento a la membrana plasmática, debido al mejoramiento de asociación con PIP2. Ellos diseñaron una variante potenciada de PTEN (ePTEN por “*enhanced* PTEN”) con mutaciones localizadas en las regiones Q17 (cerca del dominio de unión a PIP2), R41 y E73 (localizados en el dominio fosfatasa), presentando una habilidad 8 veces incrementada para suprimir la señalización de PIP3. A través de la expresión en líneas celulares humanas, demostraron que ePTEN reduce los niveles de PIP3, fosforilación de AKT, proliferación y migración celular: sirviendo como un blanco factible para las terapias anticancerígenas. Finalmente, puntualizan que un factor clave en la obtención de ePTEN fue la sustitución Q17R y concluyen que de ser posible el alcance de similares activaciones farmacológicas, podría representar una excelente estrategia en el mejoramiento de la actividad supresora de tumores de PTEN para su uso terapéutico.³¹

En 2016, Altinoğlu et al. desarrollaron un vehículo basado en estructuras lipoides para la liberación intracelular de PTEN e investigaron su utilidad terapéutica en células cancerosas con deficiencia de PTEN. Con la liberación intracelular de PTEN recombinante en células PC-3 (línea de cáncer de próstata sin expresión de PTEN), reportaron una inducción de apoptosis, reducción de los niveles de AKT activado, y muerte celular dependiente de dosis. Los autores describen que la acción de PTEN para inducir apoptosis se efectúa antagonizando directamente la ruta AKT, para lograr esta regulación negativa, PTEN necesita estar presente en el citoplasma celular para ejercer su

función, es por ello que se enfatiza la importancia de la generación de un vehículo de liberación para atravesar la membrana celular. Por medio del marcaje con fluorescencia de PTEN solo y en complejo, determinaron que PTEN solo puede penetrar la membrana celular con la asistencia del vehículo lipóide, la evaluación de viabilidad fue realizada con el ensayo MTT: revelando que PTEN en complejo es más efectivo en la inducción de muerte celular en las células de cáncer, mostrando una concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) de 1.6 µg/ml. Realizaron una comparación de tratamiento en líneas celulares de cáncer de próstata con expresión deficiente de PTEN (PC-3 y LNCaP) contra una línea celular de cáncer de mama con expresión normal de PTEN (MCF-7), donde las líneas PC-3 y LNCaP muestran valores de IC₅₀ menores a 0.5 µg/ml, mientras que la viabilidad de MCF-7 es afectada en menor medida con un valor de IC₅₀ de 1.5 µg/ml, revelando que PTEN posee un mayor efecto en la viabilidad de células deficientes de PTEN. Ellos concluyen que su trabajo ofrece una alternativa más segura para la liberación intracelular de PTEN en el tratamiento del cáncer de próstata en comparación con otros métodos de liberación virales.³⁴

1.5.2. Estudios de CPPs y su aplicación contra el cáncer

Partiendo del requerimiento de sistemas de transporte o liberación intracelular para mejorar el efecto de moléculas con acción farmacológica, ha sido implementado el uso de CPPs, debido a su capacidad para atravesar la membrana celular. Generalmente, el uso de CPPs permite mejorar la eficacia de fármacos antineoplásicos mejorando su captación celular, citotoxicidad y apoptosis.³⁹

En 2014, Alves et al. acoplaron el péptido penetrante penetratina (PEN) con el péptido proapoptótico KLA, el cual se ha demostrado que al estar en el interior de la célula,

presenta influencia en la activación del proceso de apoptosis. Ellos mencionan que el complejo KLA-PEN efectúa su acción mayormente como un fuerte impacto en la organización tubular de la mitocondria y evaluaron la capacidad citotóxica del complejo KLA-PEN por el ensayo de MTT en siete líneas celulares de cáncer humano, en las que observaron un decremento en la viabilidad celular de un 40 – 70%, a diferencia de la evaluación en 3 líneas celulares no tumorales, las cuales no fueron afectadas por el tratamiento por KLA-PEN. Con esto demuestran la capacidad de internalización celular y la citotoxicidad selectiva del conjugado KLA-PEN en células cancerosas.⁶⁴

Uno de los ejemplos más representativos del uso de los CPP en un enfoque anti cáncer es el conocido péptido TAT, que a pesar de estar entre los primeros en ser descubiertos, prevalece entre los más estudiados en los últimos años. Por ejemplo, Orzechowska et al. en 2014 fusionaron el péptido TAT con la proteína BID, la cual es miembro de la superfamilia de proteínas Bcl-2 que son reguladores clave de la apoptosis, con el objetivo de examinar si TAT-BID puede usarse para la sensibilización controlada de células de cáncer a agentes anticancerosos que actúan a través de receptores de muerte (TRAIL) o daño del ADN (camptotecina). En el estudio se utilizaron células PC3, LNCaP, A549 y HeLa. Los resultados de estos experimentos demostraron que el péptido TAT hace posible que la proteína BID pueda administrarse a las células cancerosas de manera controlada y sensibiliza eficazmente las células PC3 y A549 a través de los receptores TRAIL.⁶⁵

En 2016, Morshed et al. diseñaron nanopartículas de oro modificadas con el péptido TAT, esto con el objetivo de acarrear doxorrubicina para aumentar la administración intracelular del fármaco a las células de cáncer de mama metastásico cerebral: estrategia que condujo a una citotoxicidad potenciada hacia dos líneas celulares de cáncer de mama

metastásico cerebral, con una disminución en la IC₅₀ de al menos un 80% en comparación con el fármaco libre.³⁸

Moku et al., en el año 2019, mejoraron la capacidad de carga de medicamentos en células madre mesenquimales (MSC), con el objetivo de usarlas como un sistema de liberación celular dirigida a la terapia contra el cáncer. Para lograr esta mejora, funcionalizaron nanopartículas de polímero ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) (cargadas con paclitaxel) con el péptido penetrante TAT. Sus estudios demostraron que el péptido TAT mejora la acumulación y retención de las nanopartículas en las MSC sin alterar su potencial de migración y diferenciación osteogénica y adipogénica, además, al ser realizado el tratamiento en un modelo murino de cáncer de pulmón, este resultó en una inhibición significativa del crecimiento tumoral y mayor supervivencia comparado con el uso del fármaco libre y en nanopartículas. Estos resultados muestran que la inclusión del péptido TAT en la superficie de las nanopartículas es un punto clave en la mejora de carga de fármaco en un sistema de liberación celular.⁶⁶

1.5.3. Estudios de selectividad contra el cáncer de los péptidos tumor-homing

Otro aspecto importante en el diseño de terapias basadas en proteínas, es la capacidad de actuar de manera selectiva sobre las células diana. En la mayoría de los casos, este aspecto se considera un reto, y por ello, se han desarrollado estrategias basadas en la incorporación de moléculas de reconocimiento específico de tejidos: como los péptidos *tumor-homing*, capaces de unirse a sitios específicos de la membrana de células tumorales y actuar selectivamente sin dañar células sanas.

En el año 2016, Neo et al. generaron un complejo con el péptido *tumor-homing* LTV (que se une específicamente al receptor HER-2) y el péptido citotóxico BR (región de la proteína HEXIM1, conocida por ser un regulador positivo de p53) y evaluaron su efecto en la viabilidad de distintas líneas celulares (incluyendo de cáncer de mama). Como resultado de sus experimentos, el complejo LTV-BR mostró una fuerte inhibición de viabilidad en células MDA-MB-321 (HER2-positivo). Sin embargo, encontraron que el péptido BR sin LTV no muestra una actividad citotóxica, caso contrario al complejo, el cual a su vez presenta una inhibición específica en líneas celulares de cáncer de mama HER2-positivo, con lo que demuestran la selectividad del péptido LTV actuando en complejo con el péptido citotóxico y su potencial uso terapéutico.⁶⁷

En 2017, Palao-Suay et al. aportaron una nueva aplicación de los péptidos *tumor-homing* dirigidos a cáncer de mama, partiendo del hecho que las terapias dirigidas tanto a una célula específica como también a un organelo específico, maximizan la actividad terapéutica minimizando los efectos adversos en tejidos sanos. En su trabajo, describen la síntesis, caracterización y actividad biológica *in vitro* de nanopartículas de direccionamiento activo para la terapia contra el cáncer basadas en α -tocoferil succinato (α -TOS), que induce apoptosis en células cancerosas y células endoteliales proliferantes. Ellos conjugaron el péptido *tumor-homing* LTV y el catión lipofílico de trifenilfosfonio (TPP) con un co-polímero basado en polietilenglicol (PEG) y un derivado metacrílico de α -TOS (MTOS) que formó nanopartículas de tamaño apropiado para esta aplicación. Se incluyeron LTV y TPP para dirigirse no solo a las células cancerosas HER2-positivo, sino también a las mitocondrias de éstas, respectivamente. Al realizar la evaluación biológica *in vitro* demostraron una incorporación más rápida de estas nanopartículas de

direccionamiento activo y una mayor acumulación de ellas en las mitocondrias de las células de cáncer de mama MDA-MB-453 (HER2-positivo) en comparación con las nanopartículas solas. Además, lograron una eficiente encapsulación de α -TOS adicional en el núcleo hidrofóbico de las nanopartículas, permitiéndoles determinar que las nanopartículas cargadas presentan una citotoxicidad más alta que las no cargadas, conservando su selectividad contra las células cancerosas.⁶⁸

Por lo anterior mencionado, en el presente proyecto se plantea el uso de PTEN modificado como terapia contra cáncer de mama HER2-positivo, sin embargo, ya que su sitio de acción se encuentra en el citoplasma de la célula, y a su vez, no presenta capacidad de ingreso a través de membrana, se propone la producción de esta proteína fusionada con el CPP TAT y el péptido *tumor-homing* LTV a fin de mejorar la efectividad y selectividad de la proteína para inhibir la vía PI3K-AKT-mTOR e inducir un efecto anti-tumoral.

1.6. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es una de las principales causas de muerte con elevada incidencia tanto a nivel mundial como nacional, siendo de gran interés los de tipo HER2-positivo debido a su naturaleza agresiva. Aunque durante las últimas décadas se han desarrollado terapias contra cáncer de mama dirigidas al receptor HER2, éstas no son completamente efectivas e incluso pueden provocar graves efectos adversos al paciente. Por tal motivo, se considera importante el desarrollo de una proteína quimérica con potencial uso terapéutico y con selectividad sobre el receptor HER2.

1.7. HIPÓTESIS

La proteína quimérica TAT-PTEN-LTV presenta actividad biodirigida, con la capacidad de atravesar la membrana de células de cáncer de mama HER2-positivo y producir un efecto citotóxico.

1.8. OBJETIVOS

1.8.1. Objetivo General

Producir la proteína quimérica TAT-PTEN-LTV y evaluar su actividad citotóxica biodirigida sobre líneas celulares de cáncer de mama HER2-positivo.

1.8.2. Objetivos Específicos

- Obtener las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos e inserto codificante para la proteína TAT-PTEN-LTV mediante métodos bioinformáticos.
- Clonar la secuencia codificante para la proteína TAT-PTEN-LTV en el vector pCEFL por medio de la transformación de células de *Escherichia coli* competentes.
- Transfectar células HEK293T con el vector de expresión eucariota pCEFL-TatPtenLtv empleando el polímero Xfect.
- Establecer un ensayo de co-cultivo sin contacto empleando las células HEK293T transfectadas y las células de cáncer de mama HER2-positivo.
- Evaluar la viabilidad de las células de cáncer de mama HER2-positivo expuestas a la proteína TAT-PTEN-LTV usando el ensayo WST-1.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo, la secuencia de ADN codificante para la proteína quimérica TAT-PTEN-LTV fue obtenida de la compañía GenScript (Nueva Jersey, E.U.A.) y los oligonucleótidos *Forward* (TACACCATGGGTATGACAGCCATCATCAAAG) y *Reverse* (GCGCGGATCCTCAGACTTTTGTAATTTGTG) de T4 OLIGO (Irapuato, Gto., México). El vector de expresión pCEFL-EGFP fue donado por el Dr. José Vázquez Prado del Laboratorio de Vías de Señalización del Cinvestav.

Los reactivos utilizados fueron adquiridos de las compañías: Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, E.U.A), Corning (Glendale, AZ, E.U.A.), CTR Scientific (Monterrey, N.L., México) y Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). Los equipos requeridos se encuentran en el Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL.

Se emplearon las siguientes líneas celulares obtenidas de The American Type Culture Collection (ATCC): línea celular HEK293T (ATCC®: CRL-3216™), línea celular de

cáncer de mama MCF-7 (ATCC®: HTB-22™), línea celular de cáncer de mama HER2-positivo: HCC1954 (ATCC®: CRL-2338™).

2.1. PRODUCCIÓN DE TAT-PTEN-LTV

2.1.1. Obtención, construcción y análisis de secuencias

La secuencia del gen codificante para la proteína PTEN, fue obtenida de la base de datos GenBank® del NCBI y se realizaron las modificaciones reportadas por Nguyen et al., 2014 para obtener la variante potenciada,³¹ agregando una mutación adicional en la posición 124, cambiando el residuo de cisteína por metionina con el fin de evitar la formación del puente disulfuro causante de la inhibición de la actividad catalítica.⁶⁹ Las secuencias codificantes del péptido penetrante TAT y el péptido *tumor-homing* LTV fueron obtenidas con la herramienta “Back translation” del programa Unipro UGENE. Estas secuencias fueron unidas por medio de una secuencia linker de ocho glicinas, y adicionalmente una secuencia de 4 histidinas entre TAT y el linker (YGRKKRRQRRR-HHHH-GGGGGGGG-PTEN-GGGGGGGG-LTVSPWY). La secuencia proteica fue analizada con ayuda del servidor I-TASSER (Iterative Threading ASSEmby Refinement) de la Universidad de Michigan, adicionalmente, se realizó una predicción de *docking* proteína-receptor por medio del servidor Cluspro 2.0 de la Universidad de Boston. Posteriormente, a la secuencia de ADN se le añadió la secuencia codificante del péptido señal del interferón alfa-2 (INF α 2) y se agregaron sitios de reconocimiento para enzimas de restricción *BglIII* en extremo 5' y *BamHI* en 3', y una vez realizado el diseño del gen, fue sintetizado por GenScript® que posteriormente fue entregado en el vector de clonación pUC57.

El diseño de los oligonucleótidos se realizó en base a la secuencia codificante de la proteína PTEN, incluyendo los sitios de corte para las enzimas de restricción. Las secuencias fueron analizadas en el programa bioinformático OligoAnalyzer 3.1 de la empresa “Integrated DNA Technologies” para evaluar que cumplan con las características deseadas. Una vez realizado el diseño, se solicitaron a través de la empresa T4 OLIGO.

2.1.2. Transformación de *Escherichia coli* con vector de clonación

La transformación se realizó empleando células de *E. coli* DH5 α debido a su amplio uso en clonación y mejoramiento de calidad de ADN plasmídico; llevándose a cabo por medio la técnica de competencia celular. Se añadieron 50 μ L de células a un tubo de microcentrífuga, seguido de 10 ng del vector de clonación, se homogenizó e incubó en hielo por 30 min, después se realizó el choque térmico colocando la muestra a 42 °C por 45 s, se mantuvo en hielo por 3 min, al terminar el choque térmico se añadieron 800 μ L de caldo LB y se incubó por 1 h a 37 °C y 200 rpm usando una incubadora (modelo 311DS) marca LABNET, pasado el tiempo, se centrifugó a 10,000 rpm por 2 min utilizando una microcentrífuga (MicroC) marca ThermoScientific, se desechó el sobrenadante y con el remanente se resuspendió la pastilla celular que fue transferida a una placa de agar LB adicionada con ampicilina (30 μ g/mL), finalmente se sembró por extensión y se incubó a 37 °C por 16 h.

Se realizó la selección de colonias transformadas, éstas se inocularon en 6 mL de caldo LB con ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron a 37 °C durante 16 h con agitación a 200 rpm. Se colectó 1.5 ml en un tubo de microcentrífuga y se centrifugó por 2 min a 10000 rpm. Una vez obtenido el pellet celular, se obtuvo el ADN plasmídico utilizando el kit

‘QIAprep Spin Miniprep’, siguiendo las instrucciones del fabricante. Enseguida se cuantificó la cantidad de ADN presente utilizando un Nanodrop 2000 marca ThermoScientific.

2.1.3. Preparación de vector de expresión

Se realizó una digestión con las enzimas de restricción *BglII* y *BamHI* como se muestra en las tablas 5 y 6. Posteriormente se incubó a 37 °C por 2 h, después de incubar se añadió 1 µL de fosfatasa alcalina (1 U/µL) y se incubó a 37 °C por 1 h. Se preparó un gel de agarosa al 1% disuelto en buffer TAE 1X. Se cargaron las muestras en el gel y se corrió la electroforesis a 80 voltios (V) durante 5 minutos y luego a 120 V durante 25 minutos. Al finalizar, se realizó una purificación de los fragmentos empleando el kit ‘QIAquick Gel Extraction’, siguiendo las instrucciones del fabricante y se cuantificaron por medio de Nanodrop 2000. Se efectuó una reacción de ligación de los fragmentos purificados del plásmido pCEFL y la secuencia del inserto de interés (en una relación 1:7) como se observa en la tabla 7, utilizando la enzima ADN ligasa T4 y se incubó toda la noche a 25 °C, después se inactivó la enzima a una temperatura de 65 °C por 10 min.

TABLA 5

REACCIÓN DE DIGESTIÓN DE 1.5 µg DE pUC57-TatPtenLtv

Reactivo	Cantidad
Agua MQ	26.2 µL
NEBuffer 3.1 10X	5 µL
<i>BglII</i> (10 U/µL)	1 µL
<i>BamHI</i> (10 U/µL)	1 µL
ADN plasmídico (89.2 ng/µL)	16.8 µL
Volumen final de reacción	50 µL

TABLA 6**REACCIÓN DE DIGESTIÓN DE 1.5 µg DE pCEFL**

Reactivo	Cantidad
Agua MQ	36.3 µL
NEBuffer 3.1 10X	5 µL
BglII (10 U/µL)	1 µL
BamHI (10 U/µL)	1 µL
ADN plasmídico (223.2 ng/µL)	6.7 µL
Volumen final de reacción	50 µL

TABLA 7**REACCIÓN DE LIGACIÓN pCEFL + TatPtenLtv (1:7)**

Reactivo	Cantidad
Agua MQ	19.7 µL
Buffer T4 ADN Ligasa 10X	3 µL
ADN plasmídico (4.6 ng/µL)	3.3 µL
ADN de inserto (7.8 ng/µL)	3 µL
T4 ADN Ligasa (5 U/µL)	1 µL
Volumen final de reacción	30 µL

2.1.4. Transformación de *E. coli* DH5α con vector pCEFL-TatPtenLtv

Una vez realizada la construcción del vector de expresión, se procedió con la transformación de *E. coli* DH5α, para ello, se descongelaron las células competentes en hielo, se tomaron 50 µL, se colocaron en un tubo de microcentrífuga y se añadió 1 µL de la construcción. Se homogenizó y se incubó a 4 °C por 30 min, después se realizó el

choque térmico en baño de agua a una temperatura de 42 °C por 45 s. De inmediato se colocó en hielo y se mantuvo por 3 min. Pasado el tiempo, se añadieron 800 µL de medio LB y se incubó durante 1 h a 37 °C a 200 rpm. Después se centrifugó a una velocidad de 10,000 rpm durante 2 min, el sobrenadante fue desechado dejando un volumen aproximado de 40 µL, con el que se resuspendió el pellet celular, con este homogenizado, se sembró en una placa de agar LB adicionado con ampicilina (30 µg/mL). Por último, se incubó por 16 h a 37 °C, pasado este tiempo, se inocularon las clonas positivas en 6 mL de caldo LB con ampicilina (30 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 16 h a 200 rpm.

Para confirmar la construcción efectuada, se realizó una extracción de ADN plasmídico utilizando el kit ‘QIAprep Spin Miniprep’, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó una PCR, como se observa en la tabla 8 y empleando las condiciones listadas en la tabla 9, y una electroforesis en gel de agarosa al 1% para confirmar la construcción realizada y observar la banda correspondiente al peso molecular de la construcción recombinante.

TABLA 8

REACCIÓN DE PCR CONFIRMATORIA

Reactivo	Cantidad
Agua MQ	41 µL
Buffer PCR 10X	5 µL
dNTPs (10 mM)	1 µL
Primer F (10 µM)	1 µL
Primer R (10 µM)	1 µL
Taq polimerasa (5 U/µL)	0.5 µL
ADN (~10 ng)	0.5 µL
Volumen final de reacción	50 µL

TABLA 9**CONDICIONES DE PCR CONFIRMATORIA**

Ciclo/Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	2 min
Desnaturalización	95 °C	1 min
Alineamiento	56 °C	1 min
Amplificación	72 °C	1.5 min
Extensión final	72 °C	2 min
Mantenimiento	4 °C	-
	No. De ciclos	30

2.1.5. Transfección de células HEK293T

Para poder llevar a cabo la expresión de TAT-PTEN-LTV, es necesaria la transfección de células de la línea HEK293T con la construcción obtenida. Esta parte experimental se llevó a cabo usando el polímero Xfect™, no obstante, antes de emplear el vector pCEFL-TatPtenLtv, se probó el vector pCEFL-EGFP con el objetivo de comprobar la eficiencia de transfección por este método.⁷⁰

A partir de cultivos con 80% de confluencia, las células fueron despegadas de la caja adicionando 0.5 mL de Tripsina-EDTA al 0.25%, incubándose durante 5 min a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂ (incubadora con CO₂ modelo 3403, marca ThermoScientific), las células se recuperaron y se centrifugaron durante 8 min a 1000 rpm, posteriormente se resuspendieron en 1 mL de medio DMEM con suero fetal bovino (SFB) al 10% y se realizó un conteo celular en una cámara de Neubauer; posteriormente, se realizó el ensayo en una placa de 6 pozos (como se indica en la tabla 10), agregando 100,000 células por pozo. La placa fue incubada durante a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ hasta obtener

una confluencia de entre 50 – 70%. Después, en un tubo de microcentrífuga, se diluyeron 10 µg del vector pCEFL-EGFP con el buffer de reacción Xfect a un volumen final de 100 µL, en un tubo nuevo, se diluyó 3 µL del polímero Xfect con el buffer de reacción en un volumen de 100 µL y ambos tubos se mezclaron por vortex durante 5 s a alta velocidad. Posteriormente, se mezcló el contenido de ambos tubos, se agitó con vortex por 10 s y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente para permitir que se formen los complejos de Xfect-ADN. Una vez transcurrido el tiempo, se agregaron los 200 µL completos de solución de complejo de Xfect-ADN al medio de cultivo celular y se mezcló suavemente. La placa se incubó a 37 ° C durante 4 h, después se retiraron los complejos de Xfect-ADN por aspiración y se reemplazaron con 1 mL de medio Opti-MEM™ y se incubó a 37 °C por 48 h.

TABLA 10

PARÁMETROS DE TRANSFECCIÓN XFECT

Recipiente de cultivo	Volumen de medio	ADN	Volumen de dilución final (en buffer de reacción Xfect)	Volumen de polímero Xfect
Placa de 6 pozos	1 mL	10 µg	100 µL	3 µL
Placa de 24 pozos	250 µL	1 µg	25 µL	0.3 µL

Para terminar, se efectuaron las lecturas de fluorescencia (excitación/emisión 496/520 nm) en un fluorómetro de microplacas (Fluoroskan) marca ThermoScientific. Los resultados obtenidos se expresaron en una gráfica de intensidad de fluorescencia, comparando los datos de los controles negativos y las muestras transfectadas con pCEFL-

EGFP. La fluorescencia también se visualizó al exponer los pellets celulares a una lámpara de luz UV.

2.2. EVALUACIÓN BIOLÓGICA

2.2.1. Ensayo de co-cultivo sin contacto y determinación de viabilidad celular por el método de WST-1

Se evaluó el efecto de la proteína quimérica sobre la viabilidad de las líneas celulares de cáncer de mama HCC1954 (ATCC® CRL-2338™) y MCF7 (ATCC® HTB-22™) por el método de WST-1. Este procedimiento se realizó exponiendo ambas líneas celulares a la proteína TAT-PTEN-LTV por medio de un co-cultivo sin contacto,⁷¹ sistema que consiste en el empleo de insertos Falcon® de policarbonato con tamaño de poro de 0.4 µm, utilizados para colocar las células HEK293T (ATCC®: CRL-3216™) que expresan TAT-PTEN-LTV.

Se tomaron los cultivos de células con 80% de confluencia, estas células fueron despegadas de la caja por medio de la adición de 0.5 mL de Tripsina-EDTA al 0.25%, incubándose durante 5 min a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂, las células se recuperaron, se centrifugaron durante 8 min a 1000 rpm, posteriormente se resuspendieron en 1 mL de medio de cultivo (usando RPMI-1640 para HCC1954 y DMEM para MCF7 y HEK293T) y se realizó un conteo celular en una cámara de Neubauer; después, se colocaron 20,000 células de HCC1954 y MCF7, cada una en diferentes pozos en una placa de 24 pocillos. Al mismo tiempo, se colocaron 20,000 células HEK293T en el interior de los insertos en pozos separados y se incubó la placa durante 24 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Luego de ello, se realizó la transfección, empleando los vectores pCEFL-TatPtenLtv y pCEFL-EGFP, en las células HEK293T contenidas en los insertos mediante

el polímero Xfect™, empleando la metodología descrita anteriormente y utilizando los parámetros correspondientes al empleo de placa de 24 pozos (como se muestra en la tabla 10). Al transcurrir 4 h después de la transfección, se realizó el cambio de medio a las células agregando medio Opti-MEM™ nuevo y colocando los insertos en los pozos con células HCC1954 y MCF7. Posteriormente, se incubaron durante 48 h a 37 °C y una atmósfera al 5% de CO₂. Al concluir el tiempo de incubación, se retiraron los insertos y se reemplazó el medio con 100 µL de medio Opti-MEM™ nuevo al 10% de WST-1 y se incubó durante 2 h a 37 °C en atmósfera al 5% de CO₂. Finalmente, se transfirieron los 100 µL de cada pozo en una microplaca de 96 pocillos y se determinó la absorbancia a 450 nm con el lector de microplacas ELISA. Como control negativo se emplearon las células sin tratamiento y como blanco el medio de cultivo y WST-1. Este ensayo fue realizado por triplicado. Los datos de absorbancia obtenidos se usaron para realizar la cuantificación de células viables, expresando el resultado en una gráfica como el porcentaje de inhibición del tratamiento para cada línea celular. Finalmente, se realizó una comparación de medias por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con un valor de $p < 0.05$ considerado como estadísticamente significativo.

2.2.2. Disposición de residuos generados

La disposición de residuos que se generaron durante el presente trabajo fueron realizados de acuerdo a lo establecido en el Programa de Gestión para el Manejo Integral de los Residuos Generados en la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL. Los cultivos empleados fueron esterilizados a 121 °C durante 15 min y manejados como residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. PRODUCCIÓN DE TAT-PTEN-LTV

3.1.1. Obtención, construcción y análisis de secuencias

A través de una búsqueda en la base de datos de GenBank®, se obtuvo la secuencia codificante para la proteína PTEN de *Homo sapiens* (NM_000314.8), se corroboró con la variante de Nguyen et al., 2014 para añadir las mutaciones que mejoran la actividad y se cambió el residuo de cisteína 124 por metionina para evitar la formación de puente disulfuro que causa el bloqueo del sitio catalítico, las secuencias correspondientes a los péptidos TAT (YGRKKRRQRRR) y LTV (LTVSPWY) se obtuvieron mediante la herramienta “Back translation” del programa Unipro UGENE, por último, se añadió la secuencia que codifica para el péptido señal del interferón alfa-2 (IFN α 2), esto para lograr que la proteína expresada sea liberada al medio de cultivo. A continuación se presentan las secuencias obtenidas.

>NM_000314.8:846-2054 Homo sapiens PTEN con mutaciones

ATGACAGCCATCATCAAAGAGATCGTTAGCAGAAACAAAAGGAGATATAGAAGAGGATGGATTTCGACTTAGA
CTTGACCTATATTTATCCAAACATTATTGCTATGGGATTTCTGCAGAAAGGCTTTGAAGGCGTATACAGGA
ACAATATTGATGATGTAGTAAGGTTTTTGGATTCAAAGCATAAAAACCATTACAAGATATACAATCTTTGT
GCTGATAGACATTATGACACCGCCAAATTTAATTGCAGAGTTGCACAATATCCTTTTGAAGACCATAACCC
ACCACAGCTAGAACTTATCAAACCCTTTTGTGAGGATCTTGACCAATGGCTAAGTGAAGATGACAATCATG
TTGCAGCAATTCACATGAAAGCTGGAAAGGGACGAACTGGTGTAAATGATATGTGCATATTTATTACATCGG
GGCAAATTTTTAAAGGCACAAGAGGCCCTAGATTTCTATGGGGAAGTAAGGACCAGAGACAAAAGGGAGT
AACTATTCCCAGTCAGAGGCGCTATGTGTATTATTATAGCTACCTGTTAAAGAATCATCTGGATTATAGAC
CAGTGGCACTGTTGTTTCCACAAGATGATGTTTGAACCTATTCCAATGTTTCAGTGGCGGAACTTGAATCCT
CAGTTTGTGGTCTGCCAGCTAAAGGTGAAGATATATTCCTCCAATTCAGGACCCACACGACGGGAAGACAA
GTTTCATGTACTTTGAGTTCCCTCAGCCGTTACCTGTGTGTGGTGTATCAAAGTAGAGTTCTTCCACAAAC
AGTATAAGATGCTAAAAAGGACAAAATGTTTCACTTTTGGGTAAATACATTCTTCATACCAGGACCAGAG
GAAACCTCAGAAAAAGTAGAAAATGGAAGTCTATGTGATCAAGAAATCGATAGCATTTCAGTATAGAGCG
TGCAGATAATGACAAGGAATATCTAGTACTTACTTTAACAAAAAATGATCTTGACAAAGCACACAAAGACA
AAGCCAACCGATACTTTTCTCCAAATTTTAAGGTGAAGCTGTACTTCACAAAAACAGTAGAGGAGCCGTCA
AATCCAGAGGCTAGCAGTTCAACTTCTGTAACACCAGATGTTAGTGACAATGAACCTGATCATTATAGATA
TTCTGACACCACTGACTCTGATCCAGAGAATGAACCTTTTGTGATGAAGATCAGCATAACACAAATTACAAAAG
TC

>Tat

TACGGTCGGAAGAAGCGGCGGCAGCGGCGGCGG

>Ltv

TTAACTGTTTCGCCTTGGTAC

>Péptido señal IFN α 2

ATGGCCTTGACCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGCTCAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGC

		20		40		60	
Sequence	YGRKKRRQRRR	HHHHGGGGGGGG	MTAI	KEIVSRNKRRY	REDFDL	DLTYIYPNIIAMGFPAEGL	
Prediction	223642444344	364344432330	14103410333233	13432340100100	100100000000	02324	
	Values range from 0 (buried residue) to 9 (highly exposed residue)						
		380		400		420	
• • •	KTVEEPSNPEASS	SVTPDVSDNEPD	HYRYSDDT	SDPENEPFDE	DQHTQITK	VGGGGGGG	LTVSPWY
	4146436535345	44434453456	4444354444444	34664536464	334144444433323	2332226	

Figura 9. Predicción de accesibilidad de los péptidos TAT y LTV.

Para complementar los resultados del análisis bioinformático, se obtuvo un modelo de *docking* molecular de TAT-PTEN-LTV contra el dominio extracelular de HER2 por medio del servidor Cluspro 2.0. El resultado generado muestra un modelo tridimensional de la unión entre la proteína quimérica y el receptor HER2 por medio de la interacción del péptido LTV (ver figura 10). Este modelo propone una interacción principalmente por medio de puentes de hidrógeno entre los residuos de Val436 y Trp439 (del péptido LTV) con Arg316 y Glu325 (de HER2) respectivamente.

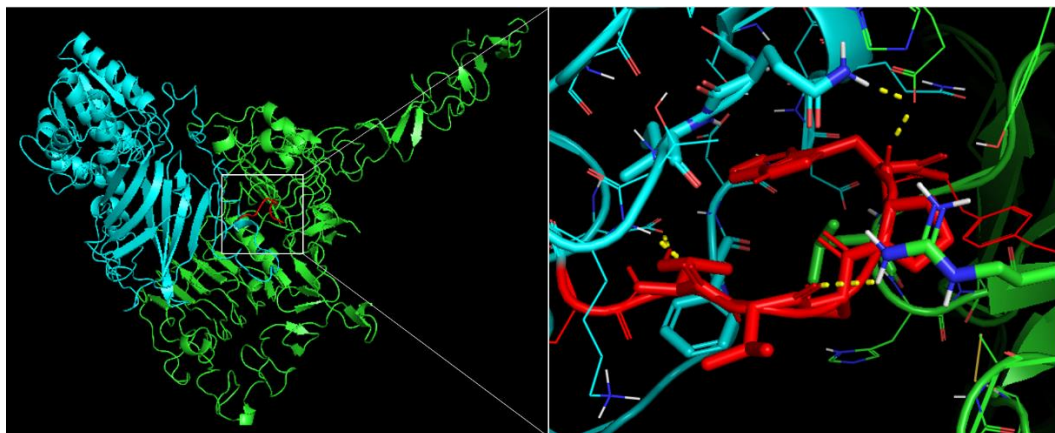


Figura 10. *Docking* proteína – receptor. PTEN (azul), HER2 (verde), LTV (rojo).

Después del diseño, se generaron los siguientes oligonucleótidos correspondientes a las secuencias *Forward*: TACACCATGGGTATGACAGCCATCATCAAAG y *Reverse*: GCGCGGATCCTCAGACTTTTGTAATTTGTG para la identificación y clonación de la secuencia codificante de PTEN y una vez analizados por medio de la herramienta OligoAnalyzer, se obtuvieron los resultados presentados en la tabla 11. Cabe destacar que no generan estructuras estables de *hairpin*, homodimerización o heterodimerización.

TABLA 11

RESULTADO DEL DISEÑO Y ANÁLISIS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

<i>Forward</i>		<i>Reverse</i>	
TACACCATGGGTATGACAGCCATCATCAAAG		GCGCGGATCCTCAGACTTTTGTAATTTGTG	
Tamaño	31	Tamaño	30
Contenido GC	45.2 %	Contenido GC	46.7 %
Tm	61.4 °C	Tm	61.3 °C
Tamaño de amplicón = 1221 pb			

3.1.2. Transformación de *E. coli* DH5 α con vector de clonación

Producto de la transformación de *E. coli* DH5 α , se levantaron 4 colonias y se realizó la purificación y cuantificación del ADN plasmídico, datos presentados en la tabla 12.

TABLA 12

CUANTIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Muestra	Concentración (ng/μL)	260/280	260/230
1	89	1.98	2.26
2	104.5	1.99	2.16
3	114.5	1.92	2.01
4	104.8	1.94	2.03

3.1.3. Preparación de vector de expresión

Una vez completa la digestión enzimática de los fragmentos del vector (6759 pb) e inserto de interés (1488 pb), se visualizaron las bandas de éstos en el gel de electroforesis, presentado en la figura 11, con el fin de purificar ambas bandas. Los fragmentos purificados se obtuvieron en concentraciones de 4.6 y 7.8 ng/ μ L de vector e inserto respectivamente, datos empleados para su ligación.

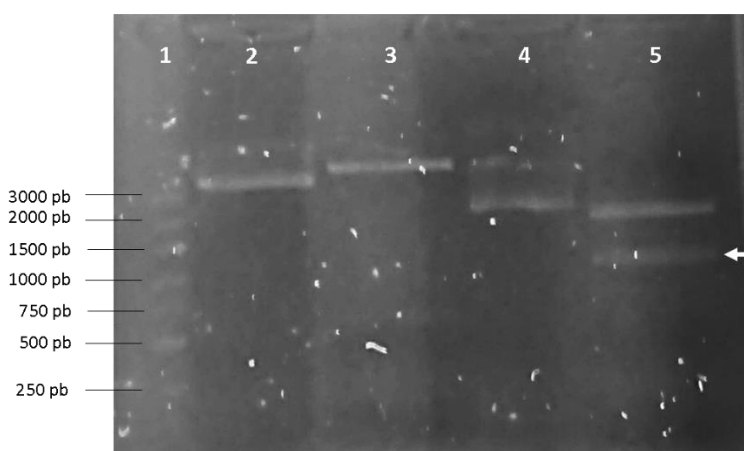


Figura 11. Productos de la digestión por BglII y BamHI en gel de agarosa 1 %. Carril 1: Marcador de peso molecular (Ready-to-Use™ Plus 100 bp DNA Ladder), 2: pCEFL sin digerir, 3: pCEFL digerido, 4: pUC57-TatPtenLtv sin digerir y 5: pUC57-TatPtenLtv digerido, indicando con la flecha blanca la banda correspondiente al inserto de interés.

3.1.4. Transformación de *E. coli* DH5 α con vector pCEFL-TatPtenLtv

Empleando el producto de la ligación del paso anterior, se procedió a transformar células de *E. coli* DH5 α , cuyo resultado permitió levantar 3 colonias y purificar su ADN plasmídico, mismo que se usó para confirmar la presencia del gen de interés en la

construcción por medio de PCR, obteniendo bandas positivas con tamaño de 1221 pb en dos muestras. El resultado de la PCR confirmatoria se observa en la figura 12.

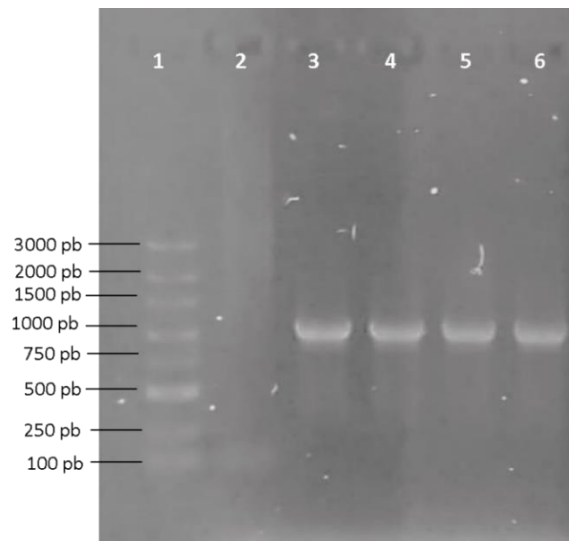


Figura 12. Productos de amplificación del inserto TatPtenLtv en gel de agarosa al 1 %.

Carril 1: Marcador de peso molecular (Ready-to-Use™ Plus 100 bp DNA Ladder), 2: Control negativo (Vector pCEFL-EGFP), 3 y 4: Control positivo (pUC57-TatPtenLtv), 5 y 6: productos de amplificación de pCEFL-TatPtenLtv.

3.1.5. Transfección de células HEK293T

Una vez completa la confirmación del nuevo vector de expresión: pCEFL-TatPtenLtv, se realizó la transfección de células HEK293T con el vector pCEFL-EGFP para evaluar la eficiencia de transfección a través de la medición de fluorescencia. Los resultados observados en las figuras 13 y 14 confirman que el método de transfección se lleva a cabo de manera correcta ya que las células transfectadas con el vector pCEFL-EGFP, expresan esta proteína verde fluorescente de forma intracelular. Esta información es de utilidad para emplear el mismo método para expresar la proteína TAT-PTEN-LTV en el ensayo de co-cultivo sin contacto.

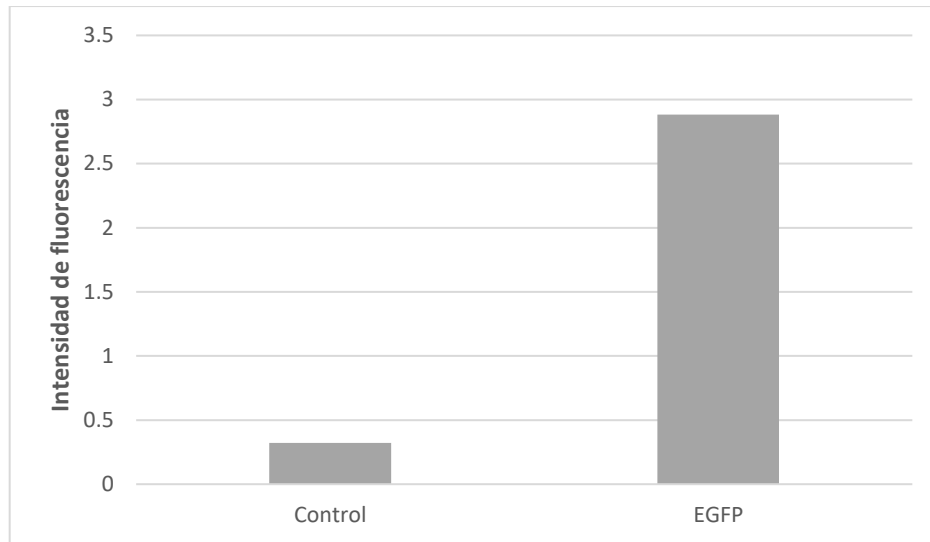


Figura 13. Gráfica de intensidad de fluorescencia. Células HEK293T que expresan proteína verde fluorescente (EGFP) y células que no fueron transfectadas (control).

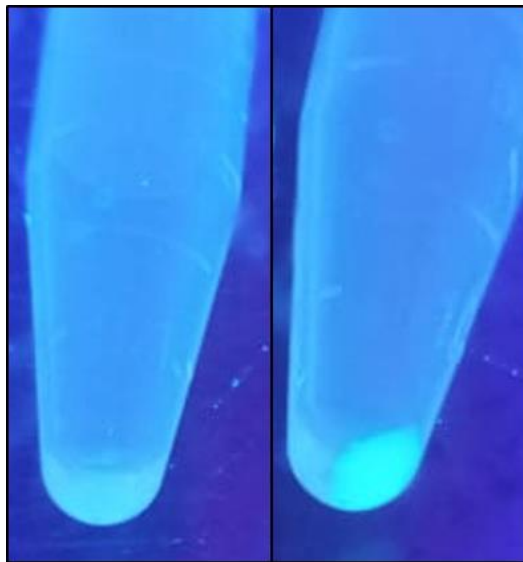


Figura 14. Fluorescencia emitida por células HEK293T. Células expresan EGFP (derecha) comparada con las células control (izquierda).

3.2. EVALUACIÓN BIOLÓGICA

3.2.1. Ensayo de co-cultivo sin contacto y determinación de viabilidad celular por el método de WST-1

Con ayuda del ensayo de co-cultivo sin contacto basado en células HEK293T que expresan TAT-PTEN-LTV, se ha logrado medir la viabilidad de las células de cáncer de mama MCF7 y HCC1954 expuestas a este sistema, comparando con las células sin tratamiento y aquellas que se sometieron a co-cultivo con las células HEK293T que expresan EGFP de forma intracelular, este último realizado con el objetivo de descartar un posible efecto citotóxico derivado del co-cultivo o el método de transfección empleado. Estos datos se reportan como el porcentaje de inhibición celular provocado por cada tratamiento, siendo la exposición a TAT-PTEN-LTV la que produjo una inhibición de la viabilidad de las células de cáncer de mama HER2-positivo: HCC1954, con un 12.25% y una desviación estándar de 1.29%. Este resultado se presenta únicamente en las células HCC1954 al estar en contacto con TAT-PTEN-LTV, como se muestra en la figura 15. Al analizar los datos con un ANOVA, se obtuvo un valor $p = 0.000001$ por lo que se concluye que hay una diferencia significativa entre las medias de inhibición celular de los diferentes tratamientos.

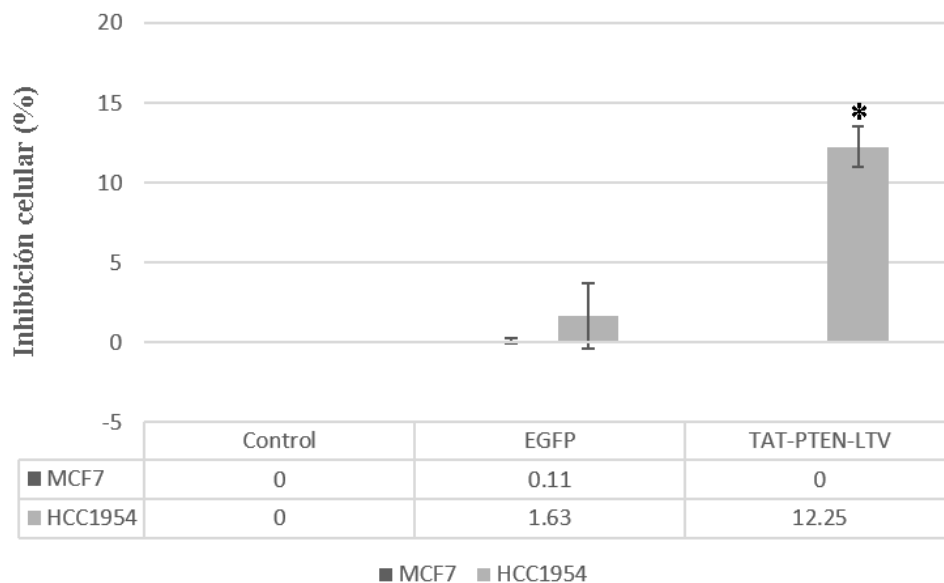


Figura 15. Gráfica de inhibición celular. Se muestra el efecto de los tratamientos sobre la viabilidad de las células MCF7 y HCC1954 en el co-cultivo sin contacto. Células sin tratamiento (control), células HEK293T que expresan intracelularmente la proteína verde fluorescente (EGFP), células HEK293T que expresan TAT-PTEN-LTV y lo exportan al medio de cultivo (TAT-PTEN-LTV). Se presenta una diferencia significativa (*) con un valor de $p = 0.000001$.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

La proteína PTEN, conocida por su actividad supresora de tumores, debe su actividad a su estructura y elementos que la conforman como ya se ha mencionado con anterioridad.³⁰ El conocimiento generado en el estudio de PTEN fue fundamental en el diseño de la proteína quimérica TAT-PTEN-LTV, que como se presentó en los resultados, ha sido diseñada de manera racional y complementada con análisis bioinformático para su predicción estructural. El servidor I-TASSER provee el análisis cuya confiabilidad radica en la puntuación de confianza denominada *C-score*, empleada para estimar la precisión de las predicciones de estructura.⁷² El *C-score* obtenido para el modelo TAT-PTEN-LTV es de -1.51 y según Roy et al., esto significa que hay más de un 90 % de probabilidad de que la predicción de calidad sea correcta.⁷³

La predicción obtenida con ayuda del servidor I-TASSER, es de gran utilidad ya que permite corroborar de forma preliminar la conservación de la actividad supresora de tumores de PTEN. Esto se asegura con los resultados de la comparación de las estructuras

del modelo predictivo contra la estructura reportada de PTEN, que al conservar su estructura tridimensional de manera casi idéntica, se infiere que la adición de los péptidos TAT y LTV no afectaría su actividad lípido-fosfatasa (y por ende su actividad antitumoral): comparando con la literatura que menciona la dependencia de la relación estructura-actividad de PTEN.^{74,75}

Un factor de gran importancia en el diseño de TAT-PTEN-LTV, es la accesibilidad de los péptidos TAT y LTV en la secuencia, ya que su interacción representa un punto crucial en la internalización y selectividad celular.^{57,76} La predicción obtenida por I-TASSER se traduce en que todos los residuos de aminoácidos correspondientes a ambos péptidos, se encontrarían al menos parcialmente disponibles para su interacción. Estos datos se complementan con el modelo de *docking* obtenido por Cluspro 2.0, pues se confirma de manera predictiva el reconocimiento de HER2 a través de la porción LTV de la proteína quimérica, así como se ha reportado por Shadidi y Sioud con anterioridad.⁷⁷ Por lo tanto, se infiere que el diseño de la proteína quimérica ha sido realizado de manera satisfactoria sin alterar la actividad biológica de cada elemento que la conforma. Adicionalmente, el acoplamiento de cuatro residuos de histidina junto al péptido TAT podría potencializar su actividad para atravesar la membrana de células de cáncer, debido a que el anillo imidazol de la histidina que posee un pKa de alrededor de 6.5, por lo que es neutro en condiciones fisiológicas. Sin embargo, este anillo de imidazol de histidina comienza a protonarse en microambientes tumorales ácidos.⁴⁶ Y por lo tanto, esta protonación puede mejorar su internalización celular.⁷⁸

Los resultados experimentales obtenidos en este proyecto son comparables a la información obtenida por los análisis bioinformáticos y la literatura, pues se logró

observar una actividad anticancerígena selectiva, reduciendo la viabilidad de las células HCC1954 en un 12.25%, efecto estadísticamente significativo mostrado únicamente en esta línea HER2-positivo,⁷⁹ a diferencia de la línea MCF7, la cual es del subtipo luminal A.⁸⁰ Así mismo, se sugiere que existe capacidad de internalización por parte de la proteína TAT-PTEN-LTV, pues como se ha reportado por Altinoğlu et al., la proteína PTEN no es capaz de atravesar la membrana celular por sí sola en condiciones naturales,³⁴ por lo que se infiere que el péptido TAT es el que permite que se lleve a cabo el transporte a través de membrana y una vez en el citoplasma, la proteína lleva a cabo su mecanismo de acción anticancerígeno. El evento de internalización celular mediado por el péptido TAT ha sido ampliamente descrito en la literatura,^{38,66} por lo que los resultados presentados en esta tesis sugieren que se lleva a cabo el mismo fenómeno en TAT-PTEN-LTV.

El efecto anticancerígeno selectivo que mostró la proteína quimérica puede atribuirse a la deficiencia de PTEN endógeno de la línea HCC1954, esto se infiere con base en los reportes realizados por Altinoğlu et al., y Tanaka y Grossman, pues PTEN funge una actividad de regulación precisa de la proliferación, supervivencia y ciclo celular a través de la vía PI3K-AKT-mTOR, por lo que al adicionar la proteína TAT-PTEN-LTV a esta línea celular, esta vía es inhibida dando lugar a la reducción de su viabilidad.^{34,63} Sin embargo, la información derivada de los ensayos experimentales realizados, no son suficientes para confirmar el efecto selectivo del péptido LTV en la proteína quimérica, por lo que sería necesario implementar un ensayo que permita discernir sobre el efecto citotóxico entre distintos tipos de células en un solo sistema, por ende, los ensayos *in vivo* serían los más apropiados para cumplir este objetivo y de esta manera, se podría comparar los resultados con los reportes de Neo et al. y Palao-Suay et al.^{67,68}

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

En este trabajo, ha sido posible el diseño racional, la predicción y análisis de la proteína quimérica TAT-PTEN-LTV por métodos bioinformáticos, datos que permiten inferir su potencial de acción anticancerígena y selectiva a células de cáncer de mama HER2-positivo. Aunado a esto, se logró la transfección de células HEK293T estableciendo un ensayo de co-cultivo sin contacto y la evaluación del efecto de TAT-PTEN-LTV sobre células de cáncer de mama HER2-positivo. Los resultados confirman que la proteína quimérica TAT-PTEN-LTV es capaz de producir un efecto citotóxico biodirigido a células de cáncer de mama HER2-positivo, lo cual es posible únicamente si la proteína es capaz de atravesar la membrana celular, por lo tanto se infiere que presenta esta capacidad.

Con esta prueba de concepto, TAT-PTEN-LTV se vuelve un candidato prometedor para el tratamiento efectivo y selectivo del cáncer de mama HER2-positivo, debido a esto, sería apropiado continuar con el estudio de esta proteína con la finalidad de mejorar su producción y ampliar los datos relacionados a su efecto anticancerígeno.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

Con la finalidad de enriquecer los resultados obtenidos en el presente proyecto, se considera importante la realización de SDS-PAGE y Western blot para confirmar apropiadamente la expresión de la proteína TAT-PTEN-LTV. Así mismo, la producción a gran escala de esta proteína representa un gran obstáculo, por esta razón, la mejora en su expresión y purificación son pasos importantes a llevar a cabo para alcanzar mejores resultados en su evaluación pre-clínica. Entre los estudios para la evaluación biológica, se considera importante la realización del marcaje de TAT-PTEN-LTV y microscopía de fluorescencia para corroborar su internalización en las células, de igual forma, sería apropiada la evaluación de su efecto apoptótico en células HER2-positivo. Más adelante, el empleo de sistemas *in vivo* podría brindar más información que apoye o rechace el uso de TAT-PTEN-LTV como una futura terapia.

REFERENCIAS

1. The Global Cancer Observatory. World.
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>.
Published 2020.
2. Catherine Sánchez N. Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa:
Fisiopatología del cáncer. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2013;24(4):553-562.
doi:10.1016/s0716-8640(13)70659-x
3. Hanahan D, Weinberg RA. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation.
Cell. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
4. Ju YS, Alexandrov LB, Gerstung M, et al. Origins and functional consequences
of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. 2014:1-28.
doi:10.7554/eLife.02935
5. Spector NL, Blackwell KL. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY
Understanding the Mechanisms Behind Trastuzumab Therapy for Human
Epidermal Growth Factor Receptor 2 – Positive Breast Cancer. 2014;27(34).
doi:10.1200/JCO.2009.22.1507.A
6. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, et al. Mechanisms of Tamoxifen Resistance :
Increased Estrogen Receptor-HER2 / neu Cross-Talk in ER / HER2 – Positive
Breast Cancer. 2004;96(12). doi:10.1093/jnci/djh166

7. Lin KH, Hong ST, Wang HT, Lo YL, Lin AMY, Yang JCH. Enhancing anticancer effect of gefitinib across the blood-brain barrier model using liposomes modified with one α -helical cell-penetrating peptide or glutathione and Tween 80. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12):1-17. doi:10.3390/ijms17121998
8. Weinstein IB. The Origins of Human Cancer : Molecular Mechanisms of Carcinogenesis and Their Implications for Cancer Prevention and Treatmentâ € ” Twenty-seventh G . H . A . Clowes Memorial Award Lecture1. 1988.
9. Berdasco M, Esteller M. Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Dev Cell.* 2010;19(5). doi:10.1016/j.devcel.2010.10.005
10. The Global Cancer Observatory. Mexico. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>. Published 2020.
11. CDC. ¿Qué es el cáncer de mama? https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm. Published 2018.
12. Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, et al. Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value thanT riple-Negative Phenotype. 2008;14(5):1368-1377. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1658
13. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. Race , Breast Cancer Subtypes , and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. 2019;295(21).
14. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2019;321(3):288-300. doi:10.1001/jama.2018.19323

15. Loibl S, Gianni L. Breast cancer 2 HER2-positive breast cancer. *Lancet*. 2017;389(10087):2415-2429. doi:10.1016/S0140-6736(16)32417-5
16. Kim Y-S, Kim J-S, Kim Y-S. EGFR and HER2 Expression in Papillary Thyroid Carcinoma. *J Endocr Surg*. 2018;18(4):228. doi:10.16956/jes.2018.18.4.228
17. Zardavas D, Benyunes M, Viale G, et al. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. 2017:1-10. doi:10.1056/NEJMoa1703643
18. Nahta R, Yu D, Hung M, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Mechanisms of Disease : understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. 2006;3(5):269-280. doi:10.1038/ncponc0509
19. Nahta R, Esteva FJ. Review HER2 therapy Molecular mechanisms of trastuzumab resistance Trastuzumab : mechanisms of antitumor effects. 2006;8:1-8. doi:10.1186/bcr1612
20. Santos DA, Tettamanti ME, Chacón C, et al. Alertas de cardiotoxicidad en el tratamiento con trastuzumab en cáncer de mama , 4 años de seguimiento
Cardiotoxicity Alerts during Treatment with Trastuzumab in Breast Cancer at. 2019:103-108.
21. Deaconess BI, Program CB, Israel B, Medical D. New insights into tumor suppression : PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase \bar{A} KT pathway. 1999;96(April):4240-4245.
22. Aziz SA, Davies M, Pick E, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase as a therapeutic target in melanoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15(9). doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2768

23. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-Kinase: Implications for development, immunity, homeostasis, and cancer. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Vol 17. ; 2001. doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.615
24. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006;7(8). doi:10.1038/nrg1879
25. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: Mechanisms and advances in clinical trials 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology. *Mol Cancer*. 2019;18(1):1-28.
26. Hennessey BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(12). doi:10.1038/nrd1902
27. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 2007;129(7). doi:10.1016/j.cell.2007.06.009
28. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: Variations on a theme. *Oncogene*. 2008;27(41). doi:10.1038/onc.2008.245
29. Dillon RL, White DE, Muller WJ. The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: Implications for human breast cancer. *Oncogene*. 2007;26(9). doi:10.1038/sj.onc.1210202
30. Lee Y, Chen M, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018.

doi:10.1038/s41580-018-0015-0

31. Nguyen H, Yang J, Afkari Y, Ho B, Sesaki H, Devreotes PN. Engineering ePTEN , an enhanced PTEN with increased tumor suppressor activities. 2014.
doi:10.1073/pnas.1409433111
32. Sci ANYA, Li J, Yen C, et al. PTEN , a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Brain , Breast , and Prostate Cancer. 1997;275(March):1943-1948.
33. Papa A, Wan L, Bonora M, et al. Cancer-associated PTEN mutants act in a dominant-negative manner to suppress PTEN protein function. *Cell*. 2014;157(3).
doi:10.1016/j.cell.2014.03.027
34. Altinoğlu SA, Wang M, Li KQ, Li Y, Xu Q. Intracellular delivery of the PTEN protein using cationic lipidoids for cancer therapy. *Biomater Sci*. 2016;4(12):1773-1780. doi:10.1039/c6bm00580b
35. Dinca A, Chien W, Chin MT. Intracellular Delivery of Proteins with Cell-Penetrating Peptides for Therapeutic Uses in Human Disease. 2016.
doi:10.3390/ijms17020263
36. King A, Ndifon C, Lui S, et al. Tumor-homing peptides as tools for targeted delivery of payloads to the placenta. 2016;(May).
37. Lindgren M, Hällbrink M, Prochiantz A, Langel Ü. Cell-penetrating peptides. 2000;21(March):99-103.
38. Morshed RA, Muroski ME, Dai Q, et al. Cell-Penetrating Peptide-Modified Gold

- Nanoparticles for the Delivery of Doxorubicin to Brain Metastatic Breast Cancer. *Mol Pharm.* 2016;13(6):1843-1854. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00004
39. Duan Z, Chen C, Qin J, et al. Cell-penetrating peptide conjugates to enhance the antitumor effect of paclitaxel on drug-resistant lung cancer. *Drug Deliv.* 2017;24(1):752-764. doi:10.1080/10717544.2017.1321060
40. Soler M, González-Bártulos M, Figueras E, et al. Delivering aminopyridine ligands into cancer cells through conjugation to the cell-penetrating peptide BP16. *Org Biomol Chem.* 2016;14(17):4061-4070. doi:10.1039/c6ob00470a
41. Carnevale KJF, Muroski ME, Vakil PN, et al. Selective Uptake into Drug Resistant Mammalian Cancer by Cell Penetrating Peptide-Mediated Delivery. *Bioconjug Chem.* 2018;29(10):3273-3284. doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00429
42. Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell.* 1988;55(6). doi:10.1016/0092-8674(88)90262-0
43. Langel Ü. *CPP, Cell-Penetrating Peptides.*; 2019. doi:10.1007/978-981-13-8747-0
44. Milletti F. Cell-penetrating peptides: Classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today.* 2012;17(15-16):850-860. doi:10.1016/j.drudis.2012.03.002
45. Langel Ü. Cell-penetrating peptides: Methods and protocols. *Cell-Penetrating Pept Methods Protoc.* 2015;1324:1-468. doi:10.1007/978-1-4939-2806-4
46. Xiang B, Jia XL, Qi JL, et al. Enhancing siRNA-based cancer therapy using a

- new pH-responsive activatable cell-penetrating peptide-modified liposomal system. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:2385-2405. doi:10.2147/IJN.S129574
47. Ablan FDO, Spaller BL, Abdo KI, Almeida PF. Charge Distribution Fine-Tunes the Translocation of α -Helical Amphipathic Peptides across Membranes. *Biophys J*. 2016;111(8). doi:10.1016/j.bpj.2016.08.047
48. Nischan N, Herce HD, Natale F, et al. Angewandte Covalent Attachment of Cyclic TAT Peptides to GFP Results in Protein Delivery into Live Cells with Immediate Bioavailability **. 2015;12180:1950-1953. doi:10.1002/anie.201410006
49. Herce HD, Garcia AE, Litt J, et al. Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides. *Biophys J*. 2009;97(7):1917-1925. doi:10.1016/j.bpj.2009.05.066
50. Ye J, Pei X, Cui H, et al. Cellular uptake mechanism and comparative in vitro cytotoxicity studies of monomeric LMWP-siRNA conjugate. *J Ind Eng Chem*. 2018;63:103-111. doi:10.1016/j.jiec.2018.02.005
51. Gronewold A, Horn M, Randelović I, et al. Characterization of a Cell-Penetrating Peptide with Potential Anticancer Activity. *ChemMedChem*. 2017;12(1):42-49. doi:10.1002/cmdc.201600498
52. Almarwani B, Phambu EN, Alexander C, Nguyen HAT, Phambu N, Sunda-Meya A. Vesicles mimicking normal and cancer cell membranes exhibit differential responses to the cell-penetrating peptide Pep-1. *Biochim Biophys Acta* -

- Biomembr.* 2018;1860(6):1394-1402. doi:10.1016/j.bbamem.2018.03.022
53. Zhang X, Lin C, Lu A, et al. Liposomes equipped with cell penetrating peptide BR2 enhances chemotherapeutic effects of cantharidin against hepatocellular carcinoma. *Drug Deliv.* 2017;24(1):986-998.
doi:10.1080/10717544.2017.1340361
54. Sharma A, Kapoor P, Gautam A, et al. Computational approach for designing tumor homing peptides. *Sci Rep.* 2013;3(Figure 1):1-7. doi:10.1038/srep01607
55. Yin R, Guo L, Zhang J, et al. RGD and polyhistidine tumor homing peptides potentiates the action of human Maspin as an antineoplastic candidate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(14):6209-6218. doi:10.1007/s00253-016-7345-7
56. Plesniak LA, Salzameda B, Hinderberger H, et al. Structure and activity of CPNGRC: A modified CD13/APN peptidic homing motif. *Chem Biol Drug Des.* 2010;75(6):551-562. doi:10.1111/j.1747-0285.2010.00974.x
57. Biabani Ardakani J, Akhlaghi M, Nikkholgh B, Hosseinimehr SJ. Targeting and imaging of HER2 overexpression tumor with a new peptide-based ⁶⁸Ga-PET radiotracer. *Bioorg Chem.* 2021;106. doi:10.1016/j.bioorg.2020.104474
58. Jie LY, Cai LL, Wang LJ, et al. Actively-targeted LTVSPWY peptide-modified magnetic nanoparticles for tumor imaging. *Int J Nanomedicine.* 2012;7.
doi:10.2147/IJN.S33593
59. Gong C, Pan D, Qiu F, Sun P, Zhang YH. Selective DNA delivery to tumor cells using an oligoarginine-LTVSPWY peptide. *PLoS One.* 2014;9(10).
doi:10.1371/journal.pone.0110632

60. Nguyen LT, Yang XZ, Du X, et al. Enhancing tumor-specific intracellular delivering efficiency of cell-penetrating peptide by fusion with a peptide targeting to EGFR. *Amino Acids*. 2015;47(5). doi:10.1007/s00726-015-1928-y
61. Li HM, Dong ZP, Wang QY, et al. De Novo Computational Design for Development of a Peptide Ligand Oriented to VEGFR-3 with High Affinity and Long Circulation. *Mol Pharm*. 2017;14(7). doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00070
62. Kinsella JM, Jimenez RE, Karmali PP, et al. X-ray computed tomography imaging of breast cancer by using targeted peptide-labeled bismuth sulfide nanoparticles. *Angew Chemie - Int Ed*. 2011;50(51). doi:10.1002/anie.201104507
63. Tanaka M, Grossman HB. In vivo gene therapy of human bladder cancer with PTEN suppresses tumor growth , downregulates phosphorylated Akt , and increases sensitivity to doxorubicin. *Gene Ther*. 2003;10(19):1636-1642. doi:10.1038/sj.gt.3302056
64. Alves ID, Carré M, Montero M, et al. A proapoptotic peptide conjugated to penetratin selectively inhibits tumor cell growth. *Biochim Biophys Acta (BBA)- Biomembranes*. 2014;1838(8):2087-2098. doi:10.1016/j.bbamem.2014.04.025
65. Orzechowska EJ, Kozłowska E, Czuby A, Kozłowski P, Staron K, Trzcinska-Danielewicz J. Controlled delivery of BID protein fused with TAT peptide sensitizes cancer cells to apoptosis. *BMC Cancer*. 2014;14(1). doi:10.1186/1471-2407-14-771
66. Moku G, Layek B, Trautman L, Putnam S, Panyam J, Prabha S. Improving

Payload Capacity and Anti-Tumor Efficacy of Mesenchymal Stem Cells Using TAT Peptide Functionalized Polymeric Nanoparticles.

doi:10.3390/cancers11040491

67. Neo SH, Lew QJ, Koh SM, Zheng L, Bi X, Chao S. Use of a novel cytotoxic HEXIM1 peptide in the directed breast cancer therapy. *7(5)*.
68. Palao-suay R, Aguilar MR, Parra-ruiz FJ, et al. Multifunctional decoration of alpha-tocopheryl succinate-based NP for cancer treatment : effect of TPP and LTVSPWY peptide. *J Mater Sci Mater Med*. 2017. doi:10.1007/s10856-017-5963-y
69. Dillon L, Miller T. Therapeutic Targeting of Cancers with Loss of PTEN Function. *Curr Drug Targets*. 2014;15(1).
doi:10.2174/1389450114666140106100909
70. Adame-García SR, Cervantes-Villagrana RD, Orduña-Castillo LB, et al. CAMP-dependent activation of the Rac guanine exchange factor P-REX1 by type I protein kinase A (PKA) regulatory subunits. *J Biol Chem*. 2019;294(7).
doi:10.1074/jbc.RA118.006691
71. Kumar R, Harris-Hooker S, Kumar R, Sanford G. Co-culture of retinal and endothelial cells results in the modulation of genes critical to retinal neovascularization. *Vasc Cell*. 2011;3. doi:10.1186/2045-824X-3-27
72. Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W174-W181.
doi:10.1093/nar/gkv342

73. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc.* 2010;5(4):725-738.
doi:10.1038/nprot.2010.5
74. Lee JO, Yang H, Georgescu MM, et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: Implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell.* 1999;99(3). doi:10.1016/S0092-8674(00)81663-3
75. Mighell TL, Evans-Dutson S, O’Roak B j. A saturation mutagenesis approach to understanding PTEN lipid phosphatase activity and genotype-phenotypes relationships. *bioRxiv.* 2018. doi:10.1101/255265
76. Nakase I, Niwa M, Takeuchi T, et al. Cellular uptake of arginine-rich peptides: Roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol Ther.* 2004;10(6):1011-1022. doi:10.1016/j.ymthe.2004.08.010
77. Shadidi M, Sioud M. Identification of novel carrier peptides for the specific delivery of therapeutics into cancer cells. *FASEB J.* 2003;17(2).
doi:10.1096/fj.02-0280fje
78. Yao J, Ma Y, Zhang W, et al. Design of new acid-activated cellpenetrating peptides for tumor drug delivery. *PeerJ.* 2017;2017(6). doi:10.7717/peerj.3429
79. Henjes F, Bender C, Von Der Heyde S, et al. Strong EGFR signaling in cell line models of ERBB2-amplified breast cancer attenuates response towards ERBB2-targeting drugs. *Oncogenesis.* 2012;1(7). doi:10.1038/oncsis.2012.16
80. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of experience in research. *Anticancer Res.* 2015;35(6).

APÉNDICE A

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Agar LB con antibiótico

Agregar 25 g del medio y 15 g de agar bacteriológico en 1 L de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente hasta completa disolución y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. En condiciones de esterilidad, agregar 1 mL de antibiótico (ampicilina 30 µg/mL) y servir en placas Petri.

Buffer TAE 50X

Disolver 60.5 g de Tris base molecular, 14.27 ml de ácido acético glacial y 25 ml de EDTA (pH 8.0) en 250 mL de agua destilada con agitación constante.

Gel de agarosa al 1%

Disolver 0.3 g de agarosa en 30 mL de TAE 1X.

Medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%

Disolver 17.79 g de medio DMEM, 3.7 g de NaHCO₃, 1 mL de antibiótico (penicilina/estreptomicina) y 100 mL de suero fetal bovino en 700 mL de agua destilada, ajustar pH a 7.4, aforar a 1 L y esterilizar por filtración. Dejar a prueba de esterilidad y almacenar a 4°C.

Medio LB

Disolver 25 g del medio en 1 L de agua destilada y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Medio Opti-MEM

Disolver 13.6 g de medio Opti-MEM, 2.4 g de NaHCO₃ y 1 mL de antibiótico (penicilina/estreptomicina) en 800 mL de agua destilada, ajustar pH a 7.4, aforar a 1 L y esterilizar por filtración. Dejar a prueba de esterilidad y almacenar a 4°C.

Medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10%

Disolver 16.26 g de medio RPMI-1640, 2 g de NaHCO₃, 1 mL de antibiótico (penicilina/estreptomicina) y 100 mL de suero fetal bovino en 700 mL de agua destilada, ajustar pH a 7.4, aforar a 1 L y esterilizar por filtración. Dejar a prueba de esterilidad y almacenar a 4°C.

PBS 1X

Disolver 8 g de NaCl, 1.44 g de Na₂HPO₄, 0.2 g de KCl y 0.24 g de KH₂PO₄ en 900 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.4, aforar a 1 L y esterilizar por autoclave.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Aldo Omar González Cruz

Candidato para el grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis: PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA TAT-PTEN-LTV Y SU EFECTO CITOTÓXICO BIODIRIGIDO A CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HER2-POSITIVO

Campo de estudio: Biotecnología Farmacéutica

Biografía:

Datos personales: Nacido en Tuxpan, Veracruz el 15 de Febrero de 1995, hijo de Cutberto González Sosa y Maricela Cruz Sedano.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Biotecnología Genómica.