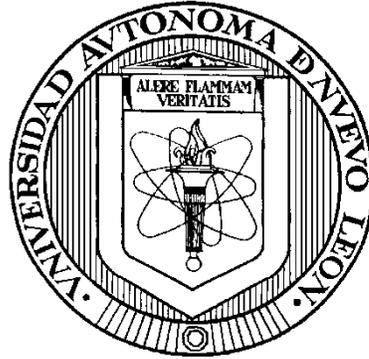


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**IDENTIFICACIÓN DE FIRMAS TRANSCRIPTÓMICAS DE LA
SECUENCIA CONSENSO E-BOX EN LÍNEAS CELULARES DE
CÁNCER DE PRÓSTATA MEDIANTE NANOSISTEMAS
BASADOS EN PÉPTIDOS MYC/MAX ACOPLADOS A
NANOPARTÍCULAS DE ORO**

Por

M.C. Samuel Longoria García

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTORADO EN CIENCIAS

con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Julio 2024

Identificación de firmas transcriptómicas de la secuencia consenso E-box en líneas celulares de cáncer de próstata mediante nanosistemas basados en péptidos Myc/Max acoplados a nanopartículas de oro

Aprobación de tesis:



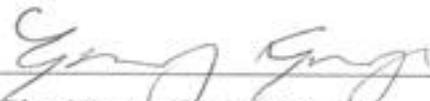
Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez

Directora de Tesis



Dr. C. Hugo Leonid Gallardo Blanco

Codirector de Tesis



Dra. Elsa Nancy Garza Treviño

Miembro de la comisión



Dra. C. Ana María G. Rivas Estilla

Miembro de la comisión



Dr. C. Kame Alberto Galán Huerta

Miembro de la comisión



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

Identificación de firmas transcriptómicas de la secuencia consenso E-box en líneas celulares de cáncer de próstata mediante nanosistemas basados en péptidos Myc/Max acoplados a nanopartículas de oro

Este trabajo de tesis doctoral fue realizado en el laboratorio de Nanomedicina del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), y en el laboratorio de Química Coloidal e Interfacial Aplicada a Nanomateriales del Centro de Investigación de Materiales Avanzados (CIMAV).

Fue aprobado por el comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UANL con el número de registro BI22-00002, y fue financiado a través de la Convocatoria de Investigación Científica Básica 2017-2018 del CONAHCYT con el proyecto “Desarrollo de nanomateriales poliméricos inteligentes y multifuncionales aplicados a nanomedicina” (clave: A1-S-9859, Responsable: Dr. Hugo Leonid Gallardo Blanco).

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. Introducción.....	1
1.1 El Cáncer en México.....	2
1.2 Origen del cáncer.....	4
1.2.1 Agentes físicos.....	4
1.2.2 Agentes químicos.....	5
1.2.3 Agentes biológicos.....	5
1.3 Alteraciones asociadas al cáncer.....	5
1.4 Bases moleculares del cáncer.....	8
1.4.1 Genes supresores de tumores.....	9
1.4.2 Oncogenes.....	9
1.5 El papel de Myc en cáncer.....	10
1.5.1 Consideraciones de Myc para el diseño de diagnóstico, análisis moleculares y terapias dirigidas.....	17
1.5.2 Terapia contra el cáncer.....	18
1.5.2.1 Péptidos de interferencia.....	19
1.6. Firmas transcriptómicas.....	25
1.7 Nanosistemas para el diagnóstico y tratamiento del cáncer.....	26
1.8 Nanopartículas de oro.....	27
2. Justificación.....	30
3. Hipótesis.....	30
4. Objetivos.....	30
4.1 Objetivo general.....	30
4.2 Objetivos específicos.....	31
5. Materiales y métodos.....	32
5.1 Esquema general de trabajo.....	32
5.2 Materiales y reactivos.....	33
5.2.1 Equipos.....	33
5.2.2 Materiales.....	34

5.2.3 Reactivos.....	34
5.2.4 Material biológico.....	35
5.3 Métodos.....	36
5.3.1 Diseño y síntesis de los péptidos pMyc y pMax.....	36
5.3.2 Diseño de oligonucleótidos.....	37
5.3.3 Ensayo de cambio en el corrimiento electroforético.....	38
5.3.4 Ensamblaje de los nanosistemas.....	40
5.3.5 Nanosistemas pMyc:AuNPs, pMax:AuNPs y pMyc:pMax:AuNPs.....	41
5.3.6 Ensayo de estabilidad de los nanosistemas.....	41
5.3.7 Caracterización por microscopía electrónica de transmisión.....	42
5.3.8 Caracterización por dispersión dinámica de la luz.....	42
5.3.9 Evaluación de hemocompatibilidad.....	42
5.3.9.1 Preparación de la solución de eritrocitos.....	43
5.3.9.2 Tratamiento de los eritrocitos con los nanosistemas.....	43
5.3.10 Evaluación de la citotoxicidad por MTT.....	44
5.3.11 Obtención de las firmas transcriptómicas.....	45
5.3.11.1 Extracción del ARN.....	45
5.3.11.2 RNA-Seq y firma transcriptómica.....	46
5.3.11.3 Ensayo de enriquecimiento de conjunto de genes.....	47
6. Resultados.....	48
6.1 Diseño y síntesis de pMyc y pMax.....	48
6.2 Evaluación de la interacción entre péptidos y ADN mediante ensayo de cambio en el corrimiento electroforético.....	49
6.3 Análisis por UV-Vis del ensamblaje de los nanosistemas pMyc:AuNPs, pMax:AuNPs y pMyc:pMax:AuNPs.....	52
6.4 Caracterización física de los nanosistemas por tEM y DLS.....	53
6.5 Caracterización biológica de los nanosistemas.....	60
6.5.1 Evaluación de la hemocompatibilidad <i>in vitro</i>	60
6.5.2 Evaluación de la citotoxicidad <i>in vitro</i> de los nanosistemas.....	63
6.6 Perfil transcriptómico de DU145 tratadas con los nanosistemas.....	69
6.7 Comparación del perfil transcripcional de células DU145.....	71

6.8 Firma transcriptómica de pMax.....	78
7. Discusión.....	80
8. Conclusión.....	83
9. Referencias.....	84

Lista de figuras

1. Incidencia y mortalidad de cáncer de próstata.....	2
2. Incidencia y mortalidad de cáncer de próstata en México.....	3
3. Esquema de transformación de células epiteliales prostáticas hacia CaP.....	4
4. Alteraciones esenciales que muestran las células cancerosas.....	8
5. Algunos de los procesos esenciales en la célula que regula el factor transcripcional Myc.....	10
6. Organización del gen y proteína Myc.....	12
7. Dominios funcionales de la proteína Myc.....	15
8. Representación de la resonancia de plasmón superficial.....	28
9. Estrategia general del trabajo en 4 etapas correspondientes a los objetivos específicos.....	32
10. Esquema del diseño de los péptidos pMyc y pMax.....	37
11. Esquema de los nanosistemas pMyc:AuNPs, pMax:AuNPs y pMyc:pMax:AuNPs.....	40
12. Imagen representativa del modelamiento obtenido con Cn3D del heterodímero pMyc (rosa) y pMax (azul).....	48
13. Imágenes de los geles de los EMSA.....	51
14. Espectro de absorción obtenido para los diferentes nanosistemas y las AuNPs sin péptido.....	53
15. Imágenes representativas de TEM de las AuNPs.....	54
16. Imágenes representativas de TEM de las pMyc:AuNPs.....	55
17. Imágenes representativas de TEM de las pMax:AuNPs.....	56

18. Imágenes representativas de TEM de pMyc:pMax:AuNPs.....	57
19. Espectros de absorbancia de los nanosistemas desde 0 h hasta las 96 h	60
20. Propiedades hemolíticas de los nanosistemas.....	62
21. Viabilidad celular únicamente con los péptidos en las diferentes líneas celulares...	64
22. Viabilidad celular con los diferentes nanosistemas en cuatro líneas celulares.....	65
23. Esquema de la macropinocitosis del mecanismo de internalización de los nanocomplejos.....	69
24. Distribución de las lecturas obtenidas de la secuenciación.....	70
25. Resultados de expresión diferencial.....	71
26. Mapas de calor mostrando la expresión diferencial.....	72
27. Términos ontológicos más significativos en pMax:AuNPs vs Control.....	73
28. Términos ontológicos más significativos en pMax:AuNPs vs AuNPs.....	74
29. Gráficas representativas de GSEA de programas transcripcionales modulados a la baja por el tratamiento de pMax:AuNPs en células DU145.....	75

Lista de tablas

1. Resumen del interactoma de Myc.....	14
2. Listado de secuencias ordenadas por su afinidad con respecto a Myc:Max.....	16
3. Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para el ensayo EMSA.....	38
4. Reacción para hibridar los oligonucleótidos utilizados e el EMSA.....	39
5. Programa de hibridación de oligonucleótidos para EMSA.....	40
6. Estabilidad térmica calculada <i>in silico</i> de los péptidos y dímero.....	49
7. Resultados de la caracterización física de las AuNPs y los nanosistemas.....	58
8. Niveles de mRNA y proteína de Myc y Max en las células utilizadas.....	66
9. Comparativa entre características físicas de los nanosistemas con la citotoxicidad más alta mostrada en líneas celulares.....	68
10. Programas transcripcionales más significativos regulados a la baja por el tratamiento con pMax:AuNPs en células DU145.....	76
11. Programas transcripcionales más significativos regulados al alza por el tratamiento con pMax:AuNPs en células DU145.....	77
12. Firma transcriptómica de los 10 genes más significativos modulados a la baja en células DU145 tratadas con pMax:AuNPs.....	78
13. Firma transcriptómica de los 10 genes más significativos modulados al alza en células DU145 tratadas con pMax:AuNPs.....	79

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
NS	Nanosistema
CaP	Cáncer de próstata
AuNPs	Nanopartículas de oro
pMyc	Péptido Myc
pMyc:AuNP	Nanosistema con únicamente el péptido Myc
pMax	Péptido Max
pMax:AuNP	Nanosistema con únicamente el péptido Max
pMyc:pMax:AuNP	Nanosistema con ambos péptidos
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
DLS	Dispersión dinámica de la luz
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

Resumen

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

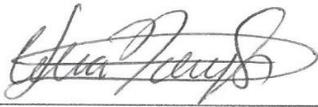
Presenta: **Identificación de firmas transcriptómicas de la secuencia consenso E-box en líneas celulares de cáncer de próstata mediante nanosistemas basados en péptidos Myc/Max acoplados a nanopartículas de oro**

Introducción: El cáncer de próstata (CaP) se coloca a nivel mundial dentro de los tipos de cáncer con mayor incidencia; en México se coloca en primer lugar en masculinos con una tasa de incidencia y mortalidad cercana al doble de la media mundial. Comprender las bases moleculares del CaP es de vital importancia para implementar acciones en el abordaje diagnóstico y terapéutico. Dentro de los posibles blancos de estudio, el factor transcripcional Myc ha sido abordado como un blanco terapéutico ya que controla diversos procesos esenciales de proliferación celular uniéndose a las secuencias E-box, aunado a que se encuentra sobre expresado en diversos tipos de cáncer. La nanotecnología permite diseñar estrategias para utilizar a Myc como blanco terapéutico, ya que facilita la entrega de agentes terapéuticos a un tipo celular específico, así como un organelo en particular. Para evaluar la respuesta celular a posibles agentes terapéuticos que tengan a Myc como blanco, es necesario estudiar la modulación de programas transcripcionales y obtener una firma transcriptómica.

Metodología: Mediante herramientas de biología computacional se diseñaron los péptidos pMyc y pMax a partir de las secuencias de las proteínas nativas. Posteriormente se evaluó su especificidad hacia secuencias canónicas E-box mediante un ensayo en el cambio del corrimiento electroforético (EMSA). Después, se ensamblaron los nanosistemas (NS) con los péptidos y nanopartículas de oro (AuNPs) de 5 nm; éstos fueron caracterizados físicamente mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y dispersión dinámica de la luz (DLS). Mediante la prueba de MTT se evaluó la citotoxicidad en 3 líneas celulares de adenocarcinoma prostático, para posteriormente realizar una extracción de ARN y así obtener la firma transcriptómica utilizando herramientas bioinformáticas. **Resultados:** El dímero pMyc/pMax retrasó el corrimiento electroforético en el EMSA lo que sugiere un reconocimiento específico a secuencias canónicas E-box. Los resultados de TEM y DLS indican que tanto los NS como las AuNPs forman nanocomplejos de 250 nm en solución. Éstos mostraron resultados de citotoxicidad variable en las células de cáncer de próstata y en la línea control Vero-CCL 81. Los resultados más significativos se obtuvieron con DU145 y pMax:AuNPs, ya que presentó los niveles de citotoxicidad más elevados (aproximadamente 45%) y el análisis transcriptómico por RNA-seq mostró una modulación a la baja programas transcripcionales relacionados con la progresión del ciclo celular y reparación del ADN, mientras moduló al alza programas transcripcionales relacionados con la respuesta inmune.

La firma transcriptómica a la baja obtenida sugiere que el mecanismo principal de pMax en DU145 involucra la interrupción de la fosforilación oxidativa y traducción, mientras que reduce la proliferación al modular al alza la regulación de la muerte y adhesión celular. **Conclusiones:** pMax:AuNPs ejerce su efecto citotóxico en DU145 a través de la modulación transcripcional de diferentes programas que permiten la progresión del ciclo celular y replicación del ADN.

Firma de la Directora de tesis



Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez

Abstract

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Presenta: **Transcriptomic signature identification of the E-box consensus sequence in prostate cancer cell lines with gold nanoparticle nanosystems coupled with Myc/Max peptides**

Introduction: Prostate cancer (CaP) is among the top worldwide type of cancer by its incidence; in Mexico it is in first place in males with incidence and morbidity rates almost twice than the worldwide rates. It is of primary importance to comprehend the molecular base of CaP to implement diagnostic and therapeutic strategies. The Myc transcription factor, one of the primary cancer targets since it is overexpressed in several cancer types, has been identified to control several essential cell processes once it binds with the E-box sequence. Nanotechnology can be used to design strategies to use Myc as a therapeutic target; the main reason is that it enhances drug delivery to a specific cell type and cell organelle. To study and evaluate the effect that Myc-targeting therapeutic agents have on cells, it is necessary to study transcriptional programming modulation and to obtain the transcriptomic signature.

Methods: Throughout computational biology tools we designed pMyc and pMax peptides from the native proteins' sequences. We then evaluated their specificity towards canonical sequences E-box through an Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). Afterwards, we constructed the nanosystems (NS) with the peptides and 5nm gold nanoparticles (AuNPs); these were characterized through transmission electronic microscopy (TEM) and dynamic light scattering (DLS). We evaluated the NS cytotoxicity in 3 prostate adenocarcinoma cell lines through the MTT assay; afterwards we extracted the RNA to conduct RNA-Seq and obtain the transcriptomic signature through bioinformatic tools. **Results:** The pMyc/pMax dimer caused a shift in the EMSA, which suggests a specific binding to canonical E-box sequences. TEM and DLS results show that NS and AuNPs form nanocomplexes in solution with a size of 250 nm. The NS showed variable cytotoxicity in the prostate cancer cell lines and in Vero-CCL 81 control cells. The most relevant results were obtained with DU145 and pMax:AuNPs, having the highest cytotoxicity (45 % approximately) and RNA-Seq showed downregulated transcriptional programs related to cell cycle progression and DNA repair; whereas the RNA-Seq showed upregulated transcriptional programs related to immune response. The downregulated transcriptomic signature we obtained suggests that the primary pMax mechanism in DU145 involves disrupting phosphorilative oxidation and translation, whereas it also reduces cell proliferation through upregulating cell death and cell adhesion. **Conclusions:** pMax:AuNPs NS exerts its cytotoxic effect in DU145 throughout modulating different transcriptional programs which prevents cell cycle progression and DNA replication.

Principal Investigator



Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez

1. Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Es una enfermedad que se considera multifactorial, caracterizada por la pérdida de control de crecimiento y proliferación celular. En su mayoría se origina en una célula somática, sin embargo, existen algunos tipos de cáncer que pueden ser considerados hereditarios (Karp, 2016).

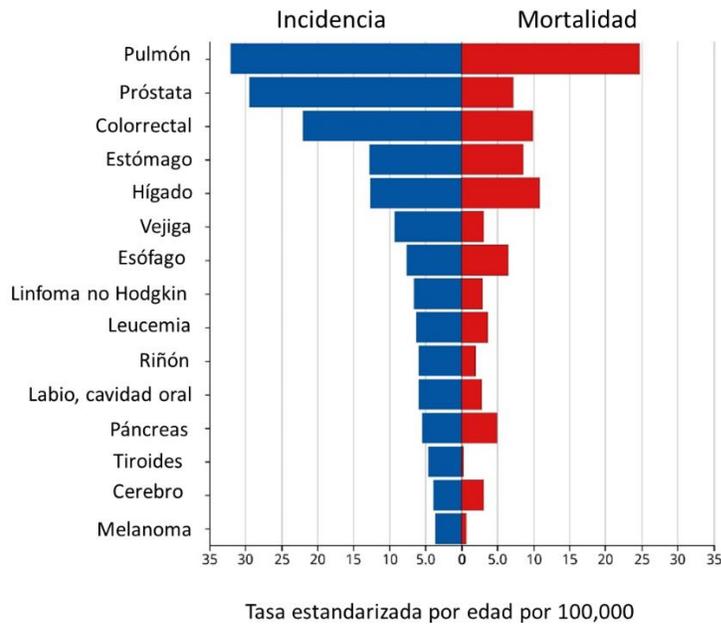
Se estima que en 2023 se tuvieron a nivel global 20 millones de casos nuevos y 10 millones de defunciones relacionadas con esta enfermedad. El cáncer de pulmón es el que presenta una mayor incidencia en ambos sexos con alrededor de un 11.6 %. En el caso de las mujeres es seguido por cáncer de mama con 11.6 % y colorrectal con 10.2 %. Mientras que en los hombres es seguido por cáncer colorrectal con 10.2 % y de próstata con 7.1 % (Bray et al., 2018).

La incidencia de casos desde 1990 hasta el 2023 ha ido en aumento; se estima que ha crecido desde 5.4 millones de casos hasta un estimado de 8.9 millones de casos (Roser & Ritchie, 2015) mientras que otros investigadores han calculado un incremento del 79 % (Zhao et al., 2023) en el mismo período de tiempo. Las cifras mencionadas anteriormente se pueden apreciar de manera visual en la Figura 1 (International Agency for Research on Cancer, 2018).

Incidencia y Mortalidad estandarizada por edad por cada 100,00, masculinos en 2022

Nivel mundial

(Top 15 sitios de cáncer)



Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today>
Data version : Globocan 2022
© All Rights Reserved 2024



Figura 1. Incidencia y mortalidad de cáncer de próstata (CaP). A nivel mundial, el CaP es el segundo cáncer con mayor incidencia y el sexto con mayor mortalidad.

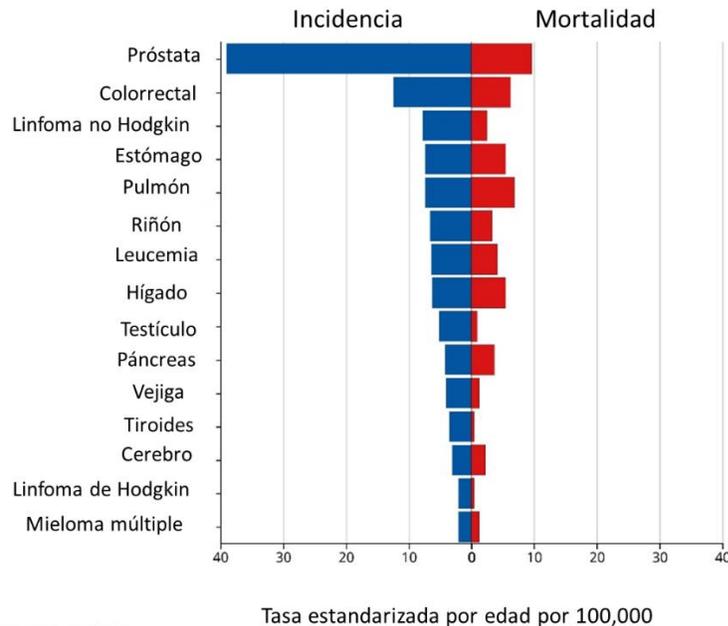
1.1 El cáncer en México

En México, el panorama es similar, siendo el cáncer la tercera causa de muerte a nivel nacional. Siguiendo la tendencia global, los casos y las muertes asociadas a esta enfermedad ha ido en aumento, reportando entre 2000 y 2015 más de un millón de muertes (Aldaco-Sarvide et al., 2018).

Los tipos de cáncer más comunes en México son similares a los reportados a nivel global: Cáncer de pulmón en primer lugar, próstata en segundo y cáncer de mama e hígado en tercer y cuarto lugar respectivamente, teniendo más de 85,000 muertes en conjunto solamente en 2015. Los estados con mayor índice de mortalidad debido a esta enfermedad son Ciudad de México, Sonora, Veracruz, Sinaloa, Chihuahua y Nuevo León (Aldaco-Sarvide et al., 2018). Sin embargo, estas cifras cambian

al hacer la distinción en varones, teniendo en primer lugar al cáncer de próstata (CaP), por encima de cáncer de pulmón, colorrectal, entre otros. Esto se puede apreciar en la Figura 2 (International Agency for Research on Cancer, 2018).

Incidencia y Mortalidad estandarizada por edad por cada 100,00, masculinos en 2022
 México
 (Top 15 sitios de cáncer)



Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today>
 Data version : Globocan 2022
 © All Rights Reserved 2024



Figura 2. Incidencia y mortalidad de cáncer de próstata en México. A nivel nacional, el CaP en varones tiene una mayor incidencia que todos los otros tipos de cáncer y una mayor mortalidad ligeramente por encima del cáncer de pulmón.

Existen limitaciones tanto en diagnóstico como en tratamiento del CaP: el diagnóstico se realiza generalmente en fases avanzadas, los fármacos para tratamiento son limitados, y el desarrollo de resistencia a tratamiento ofrecen un panorama poco favorecedor para combatir esta enfermedad.

Se tienen identificados los eventos moleculares que ocurren durante progresión específica para el desarrollo de CaP. Las células epiteliales prostáticas benignas tienen una transición a neoplasia

prostática intraepitelial, posteriormente a adenocarcinoma invasivo, enfermedad metastásica distante y finalmente a enfermedad metastásica refractaria de andrógeno (Koh et al., 2010). Una esquematización de este proceso puede ser observado en la Figura 3 (Tindall et al., 2010).

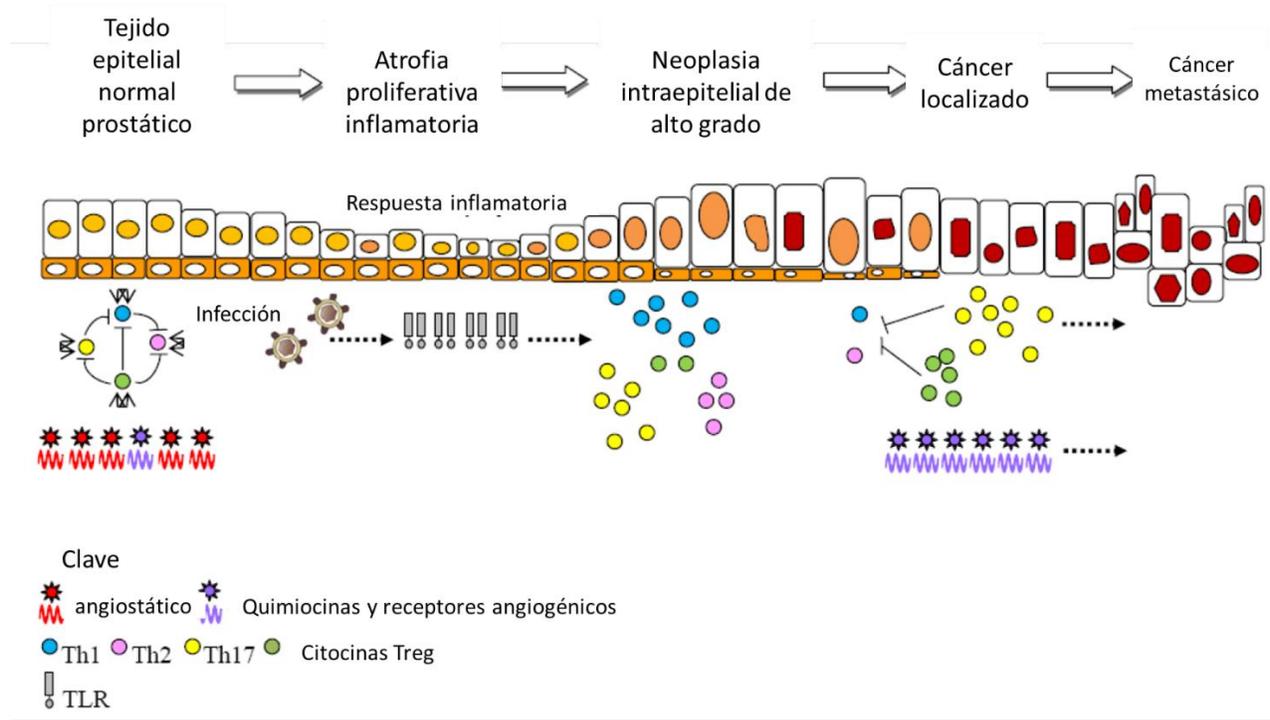


Figura 3. Esquema de transformación de células epiteliales prostáticas hacia CaP.

1.2 Origen del cáncer

Existen diversas causas por las cuales un individuo puede desarrollar cáncer, algunas de ellas son agentes ambientales, virus tumorales, así como la exposición a la radiación (Karp, 2016). Es posible identificar diversos agentes carcinogénicos, éstos son clasificados dependiendo de la su naturaleza.

1.2.1 Agentes físicos

Uno de los agentes físicos carcinogénicos mejor estudiados es la radiación por la luz UV. Cuando organismos son expuestos a luz UV, se generan diversas lesiones a nivel ADN; las más comunes

son la dimerización de las pirimidinas y la oxidación de las purinas. Algunos productos generados por estas reacciones son los dímeros cis-syn ciclobutano de pirimidinas (CPDs) y los fotoproductos de pirimidona. Se ha demostrado que estos productos causan transversiones de nucleótidos G por A y G por T (Pfeifer & Besaratinia, 2012). Este tipo de lesiones al ADN está asociado a melanoma.

1.2.2 Agentes químicos

Los agentes químicos son el grupo más grande de tipos de agentes carcinogénicos. Existen dos tipos, genotóxicos y no genotóxicos donde la principal diferencia es si tienen o no actividad directa con el ADN. Un ejemplo de los primeros son los nitritos que, al ser convertido en ácido nítrico, existe una desaminación de las bases como guanina, adenina y citosina y son convertidas en xantina, hipoxantina y uracilo, respectivamente (Agudo et al., 2010).

1.2.3 Agentes biológicos

Los principales tipos de agente biológico carcinogénicos son los virus; algunos ya han sido identificados como el virus de papiloma humano (VPH), virus Epstein-Barr (VEB) y virus de la hepatitis B (VHB). Se estima que los oncovirus corresponden alrededor de 10 – 15 % de los casos de cáncer a nivel mundial. Si bien los mecanismos de oncogénesis son específicos para cada virus, la mayoría de los virus codifican para oncogenes cuyo objetivo es la reprogramación celular, teniendo como blanco genes como *TP53* (Yan Chen et al., 2014).

1.3 Alteraciones fisiológicas asociadas al cáncer

La desregulación genética puede llevar a las células a la formación de tumores, con características *in vitro* muy distintivas. Para que se suscite esa desregulación génica, los genes reguladores del ciclo celular deben presentar actividad aberrante. Ejemplos de estos genes son los *BRCA1* y

BRCA2, genes supresores de tumores cuya actividad principal es el mantenimiento de la estabilidad genómica a través del proceso de reparación del ADN por recombinación homóloga. La pérdida de la función de BRCA resulta en inestabilidad genómica que eventualmente lleva a la transformación oncogénica de células no tumorales hacia células iniciadoras de tumores (Gorodetska et al., 2019). Las principales características de las células tumorales son: la capacidad de formar cúmulos, a diferencia de las células normales que crecen en monocapa, la proliferación en ausencia de suero al no depender de señales transmitidas por los receptores para factores de crecimiento situados en superficie, y una aparente inmortalidad (Karp, 2016).

Estas características son logradas debido a que, dentro de las funciones de los genes asociados a cáncer, se encuentran control del ciclo celular, apoptosis, reparación de ADN, envejecimiento e immortalización y angiogénesis, entre otros (Child, 2012).

De acuerdo con Hanahan y Weinberg, las células cancerosas manifiestan 10 alteraciones esenciales en su fisiología, estas se pueden ver en la figura 4:

1. Obtención de autosuficiencia de señales de crecimiento. Se ha observado que las células cancerosas desarrollan la capacidad de sintetizar sus propios factores de crecimiento, en el caso de sarcomas y glioblastomas con factor derivado de plaquetas (PDGF) y factor alfa de crecimiento de tumor (TGF α).
2. Insensibilización de señales anti crecimiento; el ejemplo mejor elucidado es el control anti proliferativo de la proteína de retinoblastoma (pRb) que al estar desregulado libera E2Fs en exceso y permite la proliferación celular (Hanahan & Weinberg, 2000)
3. Evasión de apoptosis, asociado más comúnmente a inactivación o disminución considerable de la proteína supresora de tumores p53 en alrededor del 50 % de los tipos de cáncer.

4. Potencial replicativo sin límite de las células, la principal vía de esto es mediante el aumento de la telomerasa entre el 85 – 90 % de las células malignas.
5. Angiogénesis sostenida, proveyendo los suficientes nutrientes y oxígeno para continuar su proliferación. El gen *VEGF* es el encargado de la producción de factores de crecimiento asociados a angiogénesis y ya se ha visto que su inhibición afecta el crecimiento de tumores subcutáneos en ratones.
6. Capacidad de metástasis e invasión de otros tejidos. Las principales moléculas involucradas en este proceso son moléculas de adhesión célula-célula (CAMs). Alrededor del 90 % de las muertes asociadas a cáncer se atribuye a esta característica.
7. Evasión de la destrucción autoinmune. La evidencia más reciente muestra que deficiencias en linfocitos T citotóxicos CD8⁺, células T auxiliares (T_h) CD4⁺ y células NK llevaron a un aumento en la incidencia de tumores.
8. Desregulación de la energética celular. Las células cancerígenas realizan una reprogramación para la generación de ATP a través de la glicólisis, esto lo logra mediante la sobreexpresión de transportadores de glucosa GLUT1; se ha asociado esta sobre activación de la glicólisis con la activación de oncogenes como *RAS* y *MYC*.
9. Promoción de la inflamación tumoral. La inflamación puede contribuir con la proliferación tumoral al proveer moléculas bioactivas al microambiente tumoral como factores de crecimiento que mantienen la señalización de proliferación, factores pro angiogénicos y enzimas que modifiquen la matriz extracelular.
10. Inestabilidad genómica y mutaciones. Esta inestabilidad causa la pérdida de función de genes supresores de tumores y, debido a que estos fenotipos pueden ser heredables a otras clonas a través de marcas epigenéticas, se promueve la proliferación descontrolada.

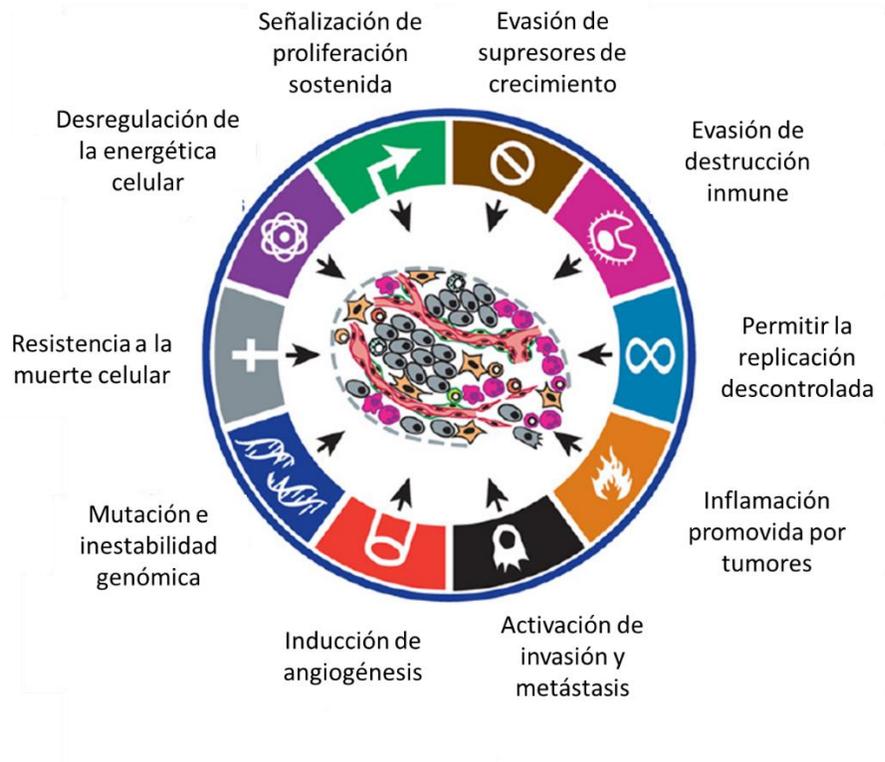


Figura 4. Alteraciones esenciales que muestran las células cancerosas permitiendo su proliferación descontrolada de acuerdo con Hanahan y Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.4 Bases moleculares del cáncer

Existen dos grupos principales de genes que están involucrados en el desarrollo del cáncer: los genes supresores de tumores y los oncogenes. Los genes supresores de tumores producen proteínas que funcionan como control del crecimiento celular, previniendo de esta manera la transformación maligna de células. Por otro lado, los oncogenes codifican para proteínas que promueven la pérdida de la regulación del crecimiento y la transformación de una célula a maligna. Los protooncogenes son genes que tienen actividades celulares en células normales, pero que al mutar, tienen la

habilidad de desregular las actividades celulares y migrar las células sanas hacia un fenotipo canceroso (E. Y. H. P. Lee & Muller, 2010).

1.4.1 Genes supresores de tumores

Un ejemplo de un gen supresor de tumor es *TP53* que codifica para el factor transcripcional p53. p53 a su vez regula la expresión de un gen que codifica la proteína p21 encargada de inhibir la cinasa dependiente de ciclina que impulsa la célula a un punto de control de G₁ del ciclo celular, permitiendo reparar el daño genético antes de iniciar la replicación del ADN. Otra forma que p53 inhibe la proliferación de tumores es mediante la activación de apoptosis mediante la proteína Bax (Karp, 2016)

Otro ejemplo de un gen supresor de tumores es el gen *RB*, que codifica para la proteína pRb que reprime la expresión de proteínas que avanzan el ciclo celular de G₁ a la fase S. pRb se une a E2F, un factor transcripcional. Ambos se encargan de la represiones de diversos genes de progresión de ciclo celular, pRb posteriormente es fosforilado mediante una cinasa, liberado del complejo E2F-pRb y la transcripción puede ser llevada a cabo (Karp, 2016).

1.4.2 Oncogenes

Se conocen 3 mecanismos mediante los cuales los protooncogenes pueden convertirse en oncogenes. El primero es mediante una mutación que evite el funcionamiento normal del producto; el segundo es mediante una duplicación génica llegando a una producción excesiva del producto; el tercer mecanismo es mediante un reordenamiento cromosómico cambiando la expresión el gen o el funcionamiento normal del mismo (Karp, 2016).

Un ejemplo de un oncogen es *RAS*; éste codifica para RAS una proteína de unión con GTP. RAS funciona como interruptor en el control de proliferación celular. Existen 3 variaciones de este gen denominadas *H-RAS*, *K-RAS* y *N-RAS*. Los productos de estos genes son utilizados como transductores de señales entre receptores membranales y efectores intracelulares. Los mutantes oncogénicos codifican para proteínas que no pueden romper el complejo GTP-Ras, emitiendo así señales de proliferación celular continuas (Karp, 2016; Pylayeva-Gupta et al., 2011).

1.5 El papel de Myc en el cáncer

El protooncogén *MYC* codifica para un factor transcripcional que regula diferentes procesos celulares de alto valor biológico como proliferación celular, apoptosis, ciclo celular, diferenciación, entre otros (Allevato et al., 2017), además está involucrado en la regulación de diferentes genes relacionados al metabolismo de la glucosa y glutamina, así como en la biogénesis de algunos organelos como ribosomas y mitocondrias (Stine et al., 2015). Esto se puede visualizar en la Figura 5.

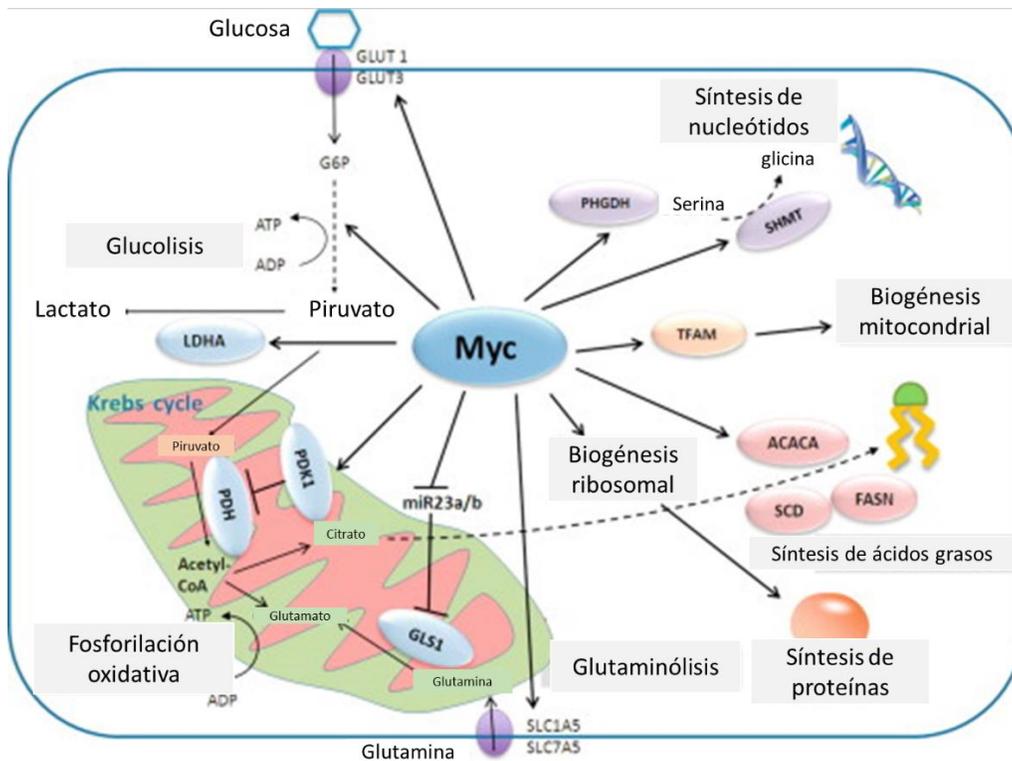


Figura 5. Algunos de los procesos esenciales en la célula que regula el factor transcripcional Myc (Iurlaro et al., 2014).

El gen *MYC* se encuentra desregulado en alrededor del 70 % de los diferentes tipos de cáncer, incluyendo el de próstata. Sin embargo, en pocas ocasiones se encuentra mutado; su expresión aberrante proviene principalmente de amplificaciones y translocaciones (Conacci-Sorrell et al., 2014). Existe una sobreexpresión por lo que existe una mayor cantidad de factores transcripcionales y la evidencia sugiere que actúan alterando la programación celular y llevando al desarrollo de células tumorales (Allevato et al., 2017; Massó-Vallés & Soucek, 2020).

La organización del gen *MYC*, así como la estructura de la proteína Myc se pueden observar en la Figura 6. En humanos, el gen contiene alrededor de 6 kb, localizado en el locus 8q24.21 en el cromosoma 8. El elemento FUSE corresponde al elemento de unión de FUBP1, proteína encargada de la expresión de *MYC* en células indiferenciadas. Contiene 4 promotores a lo largo de la

secuencia (P0-P3), siendo P1 y P2 promotores que contienen cajas TATA. El NHEIII es un elemento hipersensible a la nucleasa, cuya función primordial es la represión de *MYC* al formar estructuras cuádruples de guanina (Gonzalez & Hurley, 2010). Contiene 3 exones, de los cuáles el primero no es codificante, mientras que los exones 2 y 3 corresponden a la secuencia Myc de 439 aminoácidos (Carabet et al., 2019).

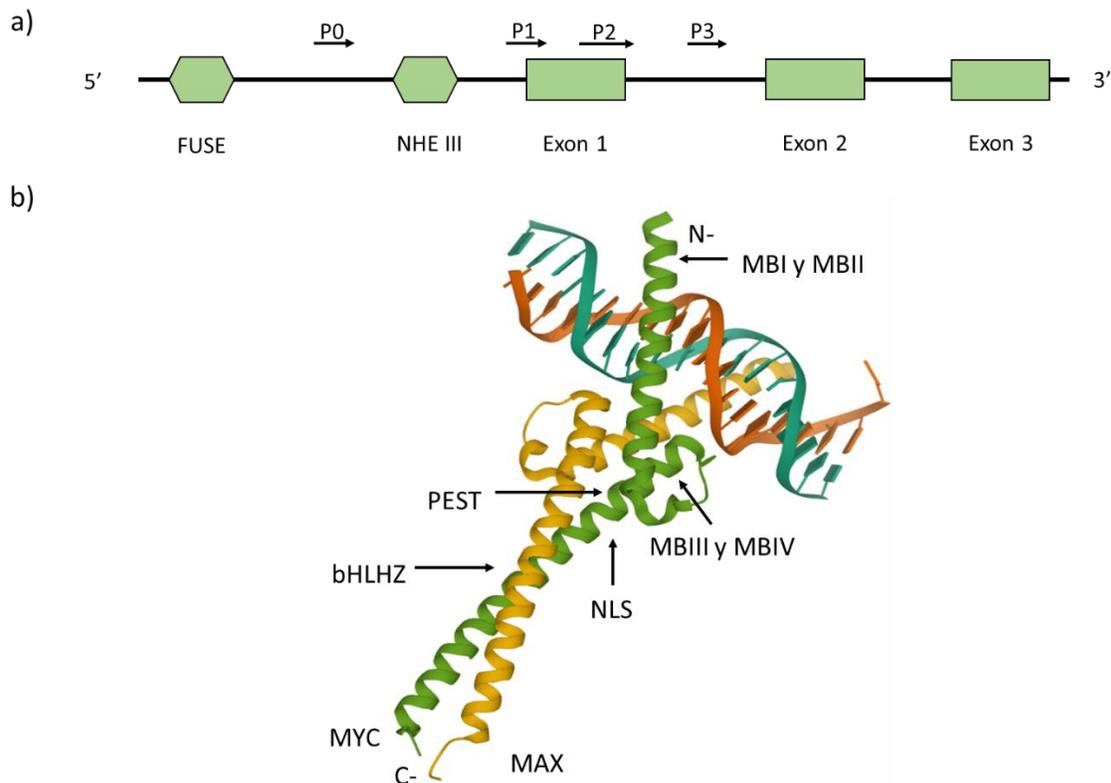


Figura 6. Organización del gen *MYC* (a) y de la proteína Myc (b). La proteína Myc proviene de los exones 2 y 3 del gen (Nair & Burley, 2003).

En cuanto a la organización de la proteína Myc cerca del extremo N-terminal, se encuentran las regiones conservadas MBI y MBII involucradas en la activación transcripcional, éstas se conocen como cajas Myc. En la región central se encuentran MBIII y MBIV que regulan negativamente la expresión del gen *MYC*, además de PEST, una secuencia rica en prolina, treonina y ácido

glutámico. Además de MBIII, MBIV y PEST, se encuentra en la región central de Myc una secuencia de localización nuclear (NLS). Finalmente, cerca de la región C-terminal la secuencia de la región hélice-giro-hélice con zipper de leucina (bHLHZ) que permite la dimerización con otros factores transcripcionales y proteínas (Conacci-Sorrell et al., 2014).

Existen tres variantes de la proteína: C-Myc, L-Myc y N-Myc, sin embargo, se han asociado a actividades redundantes. Myc pertenece a una red de interacción de proteínas que dimerizan y modulan la transcripción junto con otras proteínas como Max y las proteínas MXD (también conocidas como MAD). Un resumen de la interacción de esta red de proteínas y la función general se pueden observar en la Tabla 1 (Conacci-Sorrell et al., 2014). Estas proteínas pertenecen a la familia de factores transcripcionales hélice-giro-hélice con un zipper de leucina. Para la actividad de modulación transcripcional de Myc, éste debe formar un heterodímero con Max mediante el cual reconoce secuencias específicas de ADN y regulan la transcripción génica. Ambos tienen una estructura similar que consiste en tres regiones: un dominio transactivador (TAD) que es el que controla la transcripción de los genes blancos, una región central y la región (bHLHLZ) (Massó-Vallés & Soucek, 2020). Las regiones pueden ser apreciadas en la Figura 7.

Tabla 1. Resumen del interactoma de Myc. El resultado transcripcional es dependiente de las proteínas dimerizadas y su unión al ADN. Max puede dimerizar con proteínas de la familia Myc, MXD, MGA y MNT. Por otro lado, MLX puede dimerizar con un par de proteínas de la familia MXD, MondoA, ChREBP y MNT. En todos los casos existen tres posibles escenarios: el arresto o diferenciación celular, reacción a un estímulo metabólico o supresión tumoral.

Dimerización	Función principal		
	Proliferación celular	Arresto/ Diferenciación celular	Relacionadas a metabolismo Supresión tumoral
MAX	MYC	MXD1	MGA
	MYCN	MXD2	MNT
	MYCL	MXD3	
		MXD4	
MLX		MXD1	MondoA MNT
		MXD4	ChREBP

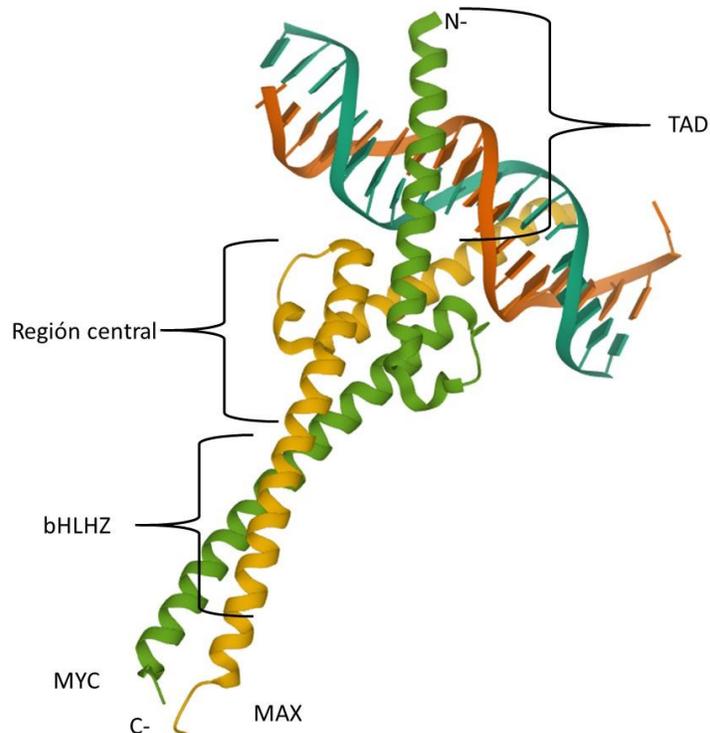


Figura 7. Dominios funcionales de la proteína Myc. bHLHZ; dominio de hélice-giro-hélice, permitiendo la dimerización y unión específica al ADN. TAD; dominio de transactivación para inicio de la transcripción. (Nair & Burley, 2003).

A la par de la dimerización Myc:Max, la familia de proteínas MXD compiten por la dimerización Max:MXD. La principal función de las proteínas MXD es antagonista a la Myc en tres niveles: competencia por Max libre, competencia por los sitios de unión a ADN y la represión de genes involucrados en la proliferación celular. (Conacci-Sorrell et al., 2014)

Así mismo, la región bHLHZ se encuentra dividida en una región básica, necesaria para la unión específica entre el ADN y el bHLHZ. En años previos, existía la disyuntiva sobre si la unión del heterodímero Myc:Max tenía afinidad específica por ciertas regiones de ADN. Ha sido determinado que el heterodímero presenta afinidad por secuencias específicas de regiones potenciadoras en los promotores de los genes que regulan, conocidas como E-box. Myc:Max tiene

una mayor afinidad por secuencias con el modelo “CANNTG” y más en específico por la secuencia CACGTG, conocida también como la secuencia canónica E-box (CME). Sin embargo, se han identificado secuencias por las cuales Myc:Max presenta afinidad sin seguir el modelo CANNTG, tal es el caso de la secuencia AACGTT. Cabe destacar, que esta afinidad es considerablemente menor que las secuencias que siguen la secuencia CANNTG y que esta afinidad se observa cuando existe una sobreexpresión génica aberrante, característica del cáncer. Las secuencias que presentan afinidad por Myc:Max, se puede observar de manera más clara en la Tabla 2. (Allevato et al., 2017).

Tabla 2. Listado de secuencias ordenadas por su afinidad con respecto a Myc:Max

Afinidad	Secuencia	Afinidad	Secuencia
1.	CACGTG	13.	CATCAG
2.	CACGCG	14.	ACGGG
3.	CATGTG	15.	CACCTG
4.	CACGAG	16.	CACGTA
5.	AGGGG	17.	CACGTC
6.	CACGAT	18.	CACATT
7.	CATGCG	19.	AACGTT
8.	CACGTT	20.	CATGAG
9.	AGCGGG	21.	CACTTG
10.	AGGGC	22.	CATGTA
11.	CGGGGG	23.	CGCGTT
12.	CACGCT	24.	CATGAT
13.	CATCAG	25.	CACACG
14.	CACGGG		

1.5.1. Consideraciones de Myc para el diseño de diagnósticos, análisis moleculares y terapias dirigidas

Para utilizar a Myc como blanco para agentes terapéuticos debe ser considerado lo siguiente (Massó-Vallés & Soucek, 2020):

1. Myc tiene funciones en tejido normal, por lo cual se esperaría daño en tejido sano.
2. Si bien tienen función redundante, el agente terapéutico debe interactuar con los tres isotipos de Myc.
3. Myc es una proteína no enzimática, por lo tanto, es difícil utilizar pequeñas moléculas que interactúen con estructuras específicas.
4. Myc se encuentra confinado al núcleo, por lo que el agente terapéutico debe poder ingresar al mismo.
5. Existe evidencia contradictoria en cuanto el papel de Myc en apoptosis, estudios han revelado actividad tanto pro como anti apoptótica.

La relevancia de Myc en el desarrollo de cáncer ha hecho que se sea de interés como blanco terapéutico. Existen diferentes estrategias que han sido utilizadas para esto en distintos niveles:

1. Inhibición de la expresión del gen *MYC* a nivel de ADN o ARNm
2. Bloqueo de la proteína Myc
3. Inhibición la dimerización Myc:Max
4. Inhibición las interacciones proteína-proteína (IPP) con otras moléculas
5. Interferencia en la unión de Myc:Max con el ADN
6. Inhibición de la expresión de los genes blancos de Myc
7. Modulación de la función de los genes blancos de Myc

8. Promoción la degradación de Myc (Vita & Henriksson, 2006)

Recientemente se han utilizado tecnologías nuevas para evaluar la unión de Myc con ADN, un ejemplo de esto es la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Estos ensayos permiten evaluar la interacción proteína-ADN tanto *in vitro* como *un vivo*, con una especificidad muy alta. Los resultados de estos ensayos han permitido identificar la unión de Myc al 10 – 15 % del genoma, mostrando así la regulación de distintos tipos de ARNs y proteínas. Algunos ejemplos del papel de Myc son la promoción el ciclo celular mediante la activación de ciclinas D1, D2, E1 y A1, así como la represión de p21, p27, p15 y GADD45. Myc no actúa por sí mismo como un factor de transcripción clásico, sino que influye en la estructura general de la cromatina afectando la programación génica de la célula (Wasylishen & Penn, 2010).

1.5.2 Terapia contra el cáncer

El objetivo principal de la terapia contra la enfermedad consiste en la eliminación de las células cancerosas o el arresto de la división celular sin tener un efecto negativo en las células o tejido circundante (Child, 2012). La terapia tradicional consiste en la administración de fármacos quimioterapéuticos, como docetaxel y paclitaxel. Este tipo de terapia tiene la gran desventaja de no discriminar entre tejido canceroso y tejido sano, teniendo una amplia gama de reacciones secundarias indeseables.

Por lo anterior, se han realizado grandes esfuerzos en materia de investigación hacia terapia dirigida a las células cancerosas desarrollando diferentes tecnologías. Éstas incluyen moléculas pequeñas dirigidas a evitar la dimerización de Myc:Max (Esser et al., 2020), y terapia génica utilizando nanopartículas dirigiendo ARN de interferencia hacia el gen *MYC* (Yunching Chen et al., 2010; Yuan Zhang et al., 2013).

Sin embargo, en los últimos años y debido a la naturaleza en la dificultad de utilizar a Myc como un blanco terapéutico, se ha recurrido al uso de péptidos de interferencia para el tratamiento de la enfermedad.

1.5.2.1 Péptidos de interferencia

Las interacciones proteína-proteína (IPP) juegan un papel fundamental en la señalización de una amplia gama de procesos celulares. Durante la oncogénesis y el progreso del cáncer, estas redes de interacción juegan un papel primordial y están altamente alteradas. Las superficies de contacto involucradas en las IPP son relativamente grandes y carecen de ranuras que en otros casos son utilizadas como blanco para interacción con fármacos (Sorolla et al., 2020).

Los péptidos de interferencia (iPeps) han surgido recientemente como una alternativa para la inhibición o modificación de las IPP. Éstos tienen la ventaja de poder cubrir una superficie de contacto amplia, tienen la posibilidad de alcanzar blancos intracelulares además de que han mostrado alta especificidad y baja toxicidad en algunos casos. Generalmente tienen un peso molecular entre 500-5000 Da, derivan de la secuencia de proteínas nativas y actúan como versiones dominantes negativas, uniéndose sin actividad y previniendo así el acceso y acción de la proteína endógena (Sorolla et al., 2020).

Existen diversos estudios donde evalúan la actividad de los iPeps en contra de diferentes blancos celulares, como proteínas involucradas en vías de señalización y factores transcripcionales.

Las proteínas de la familia RAS han sido utilizado como blanco con iPeps debido a que se encuentra mutado en alrededor del 30 % de cáncer y en más del 50 % de los cáncer de páncreas (Pylayeva-Gupta et al., 2011), sus mutaciones llevan a una expresión constitutiva desencadenando la vía de

señalización P13K y MAPK teniendo como resultado el crecimiento y proliferación celular, síntesis de proteína e inhibición de la apoptosis (Sorolla et al., 2020). Se ha buscado la inhibición de la IPP entre RAS y Raf o SOS1, proteínas con las que se une. En dos estudios diferentes con los iPeps evaluados lograron la inhibición de la IPP RAS/Raf, sin embargo sin actividad antiproliferativa y con una actividad antiproliferativa en muy altas concentraciones, respectivamente (Trinh et al., 2016; Wu et al., 2013). Ambos resultados sugieren que es debido a una falta de penetración celular.

Otro caso de iPeps estudiados en proteínas involucradas en vías de señalización celular es en el caso de p53. Su función es regulada por las proteínas HDM2 y HDMX, inhibiendo p53 en células sanas mientras que estas dos se encuentran con expresión aberrante en algunos tipos de cáncer como en glioblastomas. La formación del complejo HDM2-p53 promueve la degradación de p53 lo que lleva a la proliferación tumoral (Sorolla et al., 2020). Algunos investigadores lograron la identificación mediante cristalografía del péptido α PM1, iPeP que demostró actividad antiproliferativa en xenotransplantes de células U87, pero no en los xenotransplantes en células U251, ambas líneas celulares de glioblastomas (M. Liu et al., 2010). Se cree que los resultados obtenidos se deben a que en células tumorales que sobre expresen HDMX, no hay gran efectividad en su actividad antiproliferativa. Por lo tanto, el desarrollo de un iPeP con actividad dual para HDM2 y HDMX es de vital importancia. Por lo anterior, investigadores desarrollaron ALRN-6924, un iPeP con inhibición dual para HDM2 y HDMX logrando el arresto del ciclo celular e inducción de apoptosis en células de leucemia mieloide aguda (Carvajal et al., 2018).

Para ejemplificar el uso de iPeps en cuanto a factores de transcripción destacan dos casos: HOX y Myc. Los genes *HOX* codifican para 4 cofactores (HOXA – HOXD), éstos se encuentran sobre expresados en diversos tipos de cáncer, especialmente leucemias, y están estrechamente

relacionados con angiogénesis y metástasis (Alharbi et al., 2013). Así mismo se identificó que la función pro-tumoral de HOX proviene al dimerizar con PBX. Por lo que ya se han diseñado iPeps buscando evitar la formación del heterodímero, el HXR9 fue el péptido diseñado y logró la inducción de apoptosis en melanoma (Morgan et al., 2007).

Como se mencionó anteriormente, Myc es un regulador maestro en diferentes tipos de cáncer y actúa al formar heterodímeros Myc:Max. Dichas características le han brindado ser el objeto de estudio para evitar la dimerización y lograr controlar la enfermedad. H1 fue el primero péptido de interferencia para esto, derivado de la región 1 C-terminal de MYC (Sorolla et al., 2020). Aunado a H1, se le agregó una penetrina para penetrar las células tumorales, así como docetaxel para el efecto terapéutico. Esta estrategia logró la reducción del crecimiento tumoral así como aumentó la supervivencia en ratones con xenotransplante de células HeLa (L. Li et al., 2016).

El iPep terapéutico más estudiado para inhibir la dimerización Myc:Max es el Omomyc. El Omomyc es un péptido derivado de la secuencia de la proteína nativa Myc, con un cambio de 4 aminoácidos en la región bHLHLZ y reducido a una secuencia aminoacídica de 90 aminoácidos (Massó-Vallés & Soucek, 2020). Soucek y cols. determinaron la existencia de una alta especificidad de Omomyc por Myc y Max, sugiriendo que tendría bajas probabilidades de afectar otras vías de inicio de la transcripción (Savino et al., 2011). Además, Omomyc también mostró la habilidad de unión a ADN en CME y otras E-boxes de tal manera que no se ven afectados los niveles fisiológicos de Myc:Max. En niveles oncogénicos de expresión de Myc, Omomyc atenúa la activación y represión de Myc (Jung et al., 2017; Massó-Vallés & Soucek, 2020).

Se ha observado que la sobre expresión de Myc afecta la programación celular (Allevato et al., 2017), por lo que se evaluó el efecto de Omomyc sobre esto y determinaron que tuvo un efecto en

la lisina 9 de la histona 3 (H3K9Ac) en células Rat-1, siendo antagonista de la actividad que la sobre expresión de Myc tiene en la cromatina (Savino et al., 2011).

Una vez que se estudió y determinó un mecanismo de acción, su actividad terapéutica fue evaluada tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha encontrado actividad pro apoptótica en células de adenocarcinoma pancreático ductal, neuroblastoma, glioblastoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), entre otras (Alimova et al., 2019; Annibali et al., 2014; Fiorentino et al., 2016; Jung et al., 2017; Savino et al., 2011). En el caso de cáncer de pulmón se determinó el mecanismo de acción pro apoptótico del Omomyc; se indujo el arresto del ciclo celular en G1 o en G2/M acompañados de la activación de cinasas dependientes de ciclina (p21 y p27) (Sorolla et al., 2020).

Los estudios citados anteriormente utilizaron células o modelos animales transgénicos para la expresión del Omomyc. El siguiente paso fue estudiar la efectividad como un tratamiento terapéutico externo. El Omomyc contiene una secuencia de penetración celular, lo cual sirvió de base para determinar que actúa de una manera dependiente de dosis. Se determinó que en células H1299, A549 y H1975 de NSCLC existió una reducción de la viabilidad a partir de una concentración mínima inhibitoria en el orden de micromolar (Beaulieu et al., 2019).

En cuanto a una evaluación *in vivo* como un posible agente terapéutico, su administración ha sido evaluada a través de dos vías: intranasal e intravenosa. En otro estudio los investigadores evaluaron la vía de administración del Omomyc en un modelo murino mediante inhalación. Detectaron Omomyc en el núcleo de las células tumorales desde las 4 h de administración en y hasta 48 h posterior a su administración. Además, observaron que existió un cambio transcripcional de genes asociados a un pobre pronóstico de adenocarcinomas pulmonares; esto con tratamientos durante 3

días en una dosis de 2.37 mg/kg, consistente con lo demostrado en la actividad del Omomyc. (Beaulieu et al., 2019; Massó-Vallés & Soucek, 2020).

Finalmente, para evaluar el efecto terapéutico vía intravenosa, utilizaron ratones modelo de NSCLC. Los investigadores determinaron una vida media en plasma de 49 h y en 4 semanas de tratamiento con una dosis de 60 mg/kg 4 veces por semana; observaron la reducción significativa de tumores sin signos de efectos adversos en bioquímica sanguínea y patología de los principales órganos. Además, en combinación con paclitaxel mostró un efecto terapéutico sinérgico (Beaulieu et al., 2019).

La secuencia de penetración celular que contiene el Omomyc es una clara ventaja que le permite tener efecto en células tanto *in vitro* como *in vivo*. Debido a su región de hélice anfipática y a los estudios que provienen de esto, se confirmó que los péptidos penetradores de células requieren de una alta cantidad de aminoácidos cargados positivamente para poder ingresar a las células, generalmente residuos de arginina y lisina (Noguchi et al., 2005).

Existen diferentes estrategias que pueden ser utilizadas para aumentar la efectividad de los iPeps. Mejorar su internalización a la célula puede ser logrado mediante péptidos de penetración celular (CPPs), éstos son péptidos catiónicos o anfipáticos que interactúan con proteoglicanos en la membrana celular. Permiten la entrada de moléculas pequeñas, péptidos, nanopartículas, entre otros. La penetratina y el activador trans transcripcional del virus del VIH fueron los primeros en ser identificados. El principal problema identificado con este procedimiento es la evasión de degradación por endosomas, por lo cual añadir una secuencia NLS es obligatoria para mejorar la efectividad en caso de que su blanco se encuentre en el núcleo celular (Sorolla et al., 2020; E. Wang et al., 2019).

La estabilidad *in vivo* de los péptidos también es de especial interés, debido a que pueden ser susceptibles a degradación en el torrente sanguíneo, mediante la modificación química de la cadena polipeptídica en sus extremos N o C terminal. Dos estrategias adoptadas han sido la formación de péptidos cíclicos, así como la introducción de aminoácidos dextrógiros (D -aminoácidos). En el caso de la primera estrategia, se diseñó el iPep ALRN-6924 actualmente para evitar la dimerización de HDM2:HDMX (Carvajal et al., 2018). Para la formación de péptidos cíclicos generalmente se forman puentes disulfuro entre dos cisteínas, mediante la adición de un enlace amida entre los aminoácidos del extremo C y N terminal. (Sorolla et al., 2020).

La utilidad de los D -aminoácidos radica en su bajo nivel de reconocimiento por proteasas y baja inmunogenicidad. Además, que en algunos casos se ha reportado un aumento en la potencia terapéutica entre 27,000 a 150,000 veces más. Sin embargo, debe ser considerado que mientras permite una vida media mayor, el reemplazo por D -aminoácidos las IPP de los iPeps pudieran verse afectadas. Un ejemplo de iPep diseñado mediante este concepto es degarelix utilizado para el tratamiento de cáncer de próstata (Mathur et al., 2016).

Aunado a que el diseño de iPeps con D -aminoácidos reduce su inmunogenicidad, la Pegilación (adición de PEG) ha mostrado resultados positivos. El polietilenglicol (PEG) es inerte y en medio acuoso evita el acceso de proteasas y peptidasas, sin embargo, puede afectar la actividad del péptido (Sorolla et al., 2020). Algunos ejemplos de iPeps que han empleado esta estrategia son Sylatron (PEG-interferón α -2b) y Oncaspar (PEG-asparaginasa) (Avramis et al., 2002).

Finalmente, otra estrategia mediante la cual se puede aumentar la vida media de los iPeps, así como aumentar la entrega de ellos hacia un tipo celular u organelo específico, es mediante nanopartículas. Existen diferentes tipos de nanopartículas que han sido utilizadas como vehículos de entrega:

nanoliposomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas de oro, nanogeles, entre otros (Sorolla et al., 2020). Las nanopartículas de oro en particular han demostrado su capacidad de entrega de vacunas basadas en péptidos con actividad proapoptótica en células HeLa (Tang et al., 2013). Existen reportes en los cuales investigadores combinaron estrategias donde utilizaron nanopartículas de oro dirigidas con NLS y factores transcripcionales con un gen reportero en células HeLa, demostrando así la efectividad del sistema llegando hasta el núcleo y teniendo una actividad detectable (Y. Liu et al., 2011).

1.6 Firmas transcriptómicas

La firma transcriptómica es definida como el conjunto completo de ARN de un tipo celular en un momento en particular (Munshi & Sharma, 2018). Las firmas transcriptómicas son susceptibles a cambios, por lo que las células reaccionan a un estímulo cambiando la expresión de sus genes en respuesta a éste. Ya se ha determinado la firma transcriptómica de Myc y Omomyc en diferentes tipos de cáncer como pulmón, mama y melanoma (Beaulieu et al., 2019; Demma et al., 2020; Zacarías-Fluck et al., 2023). En el último caso se logró la identificación de modulación de programas transcripcionales asociados con la proliferación celular y progresión del ciclo celular.

Inclusive, las firmas transcriptómicas han sido utilizadas para identificar biomarcadores asociados a pacientes con CaP con recaídas (Alkhateeb et al., 2019; W. Zhang & Zhang, 2022). En estos dos estudios identificaron los genes *PTGFR*, *NREP*, *SCARNA22*, *DOCK9*, *FLVCR2*, *IK2F3*, *USP13* y *CLASPI* como potenciales biomarcadores de la progresión de la enfermedad.

Una de las dificultades del CaP es su heterogeneidad a comparación con cáncer de mama o de pulmón. Algunos genes mutados, además de los reguladores maestros del ciclo celular, con alta prevalencia en cáncer de próstata fueron recientemente identificados. *NCOA2* (un coactivador de

receptores nucleares que se encuentra mutado en cerca del 11 % de los tumores prostáticos), así como *FOXPI*, *RYBP*, *SHQ1*, (genes cooperativos de supresión tumoral). Finalmente, fue identificado el gen de fusión *TMPRSS2-ERG* en tumores con bajo nivel de alteraciones de copias de un gen (Taylor et al., 2010). Sin embargo, mayores estudios son necesarios para la validación de estos genes.

Conocer la firma transcriptómica antes y después de un tratamiento, permitiría la identificación de blancos terapéuticos para el diseño de nuevas terapias además de permitirnos determinar el efecto a nivel transcripcional distintos estímulos en las células, en este caso, péptidos como agentes terapéuticos.

1.7 Nanosistemas para el diagnóstico y tratamiento del cáncer

La nanotecnología se define como “ la ciencia e ingeniería involucrada en el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales o dispositivos cuya función organizacional es en la escala de los nanómetros” (Saini et al., 2010). Estos materiales pueden ser diseñados para la interacción con células y tejidos a un nivel molecular. Es por esto que existen diferentes aplicaciones de los nanosistemas (NS) en medicina. Existen NS empleados para el diagnóstico molecular de distintos tipos de cáncer como el colorrectal, hígado, de ovario y de próstata. Por otro lado, al manipular distintos fármacos a nanoescala, resaltan 3 aplicaciones principales: alteración en la solubilidad y tiempo de retención sanguínea, control de liberación durante un período determinado de tiempo y entrega altamente específica a un sitio en particular (Saini et al., 2010).

Una de las problemáticas resueltas por el uso de NS en el diagnóstico molecular es la baja concentración que alcanzan en fluidos corporales. El aumento en la tasa de superficie/volumen proporciona a los NS una mayor sensibilidad (Ye Zhang et al., 2019).

Existen diferentes tipos de materiales empleados en la nanotecnología aplicado a la biomedicina. Las nanopartículas de carbono han sido utilizadas para el tratamiento de cáncer colorrectal, neoplasmas endometriales y cervicouterinos, nanoliposomas para linfomas y nanopartículas de óxido de hierro para estudios de imágenes en cáncer cuello y cabeza, entre otros (Ye Zhang et al., 2019).

1.8 Nanopartículas de oro

De los diferentes materiales utilizados en el diseño de NS, destacan los metales. Algunos autores las han clasificado en metálicas, bimetálicas, óxidos metálicos y magnéticas. Dentro de los NS basados en metales destacan las nanopartículas de oro (AuNPs), en las cuales se ha centrado una amplia cantidad de estudios debido a sus propiedades únicas como la habilidad para que su superficie sea funcionalizada, ser químicamente inertes y propiedades electrónicas únicas que permiten el fenómeno de plasmón superficial (FPS). El FPS es producido por la radiación electromagnética que causa la excitación de los electrones libres en el metal; esta excitación resulta en la oscilación colectiva en las AuNPs (Figura 8) que puede ser medida utilizando espectrofotometría UV-Vis en la región visible (alrededor de 520 nm) (Sarfraz & Khan, 2021).

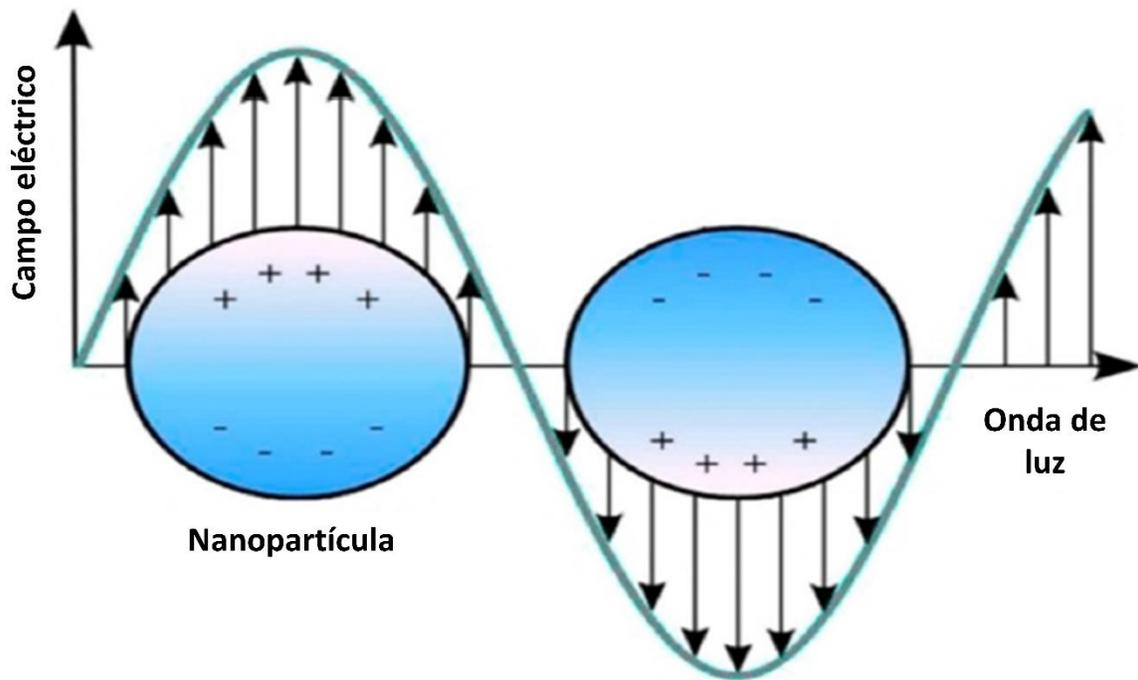


Figura 8. Representación de la resonancia de plasmón superficial. La excitación de los electrones de la superficie de oro de las AuNPs causa que comiencen a oscilar, generando las ondas de luz detectables mediante UV-Vis (Sarfraz & Khan, 2021).

Debido a esta característica de FPS, las AuNPs han sido utilizadas como biosensores (Bertok et al., 2013) y como terapia fototérmica en cáncer de mama, debido al efecto citotóxico del calor generado por la oscilación de los electrones (J. Lee et al., 2014; Vines et al., 2019).

Al tener una superficie de fácil funcionalización con moléculas orgánicas como ligandos y anticuerpos, los NS basados en AuNPs son los más estudiados para la entrega específica de fármacos. La funcionalización depende del interés de cada aplicación. Las AuNPs han sido funcionalizadas con polietilenglicol (PEG) para adherencia a membrana celular y estudios con

ARN de interferencia, aptámeros para regulación génica, región Fc de anticuerpos para evaluación de inmunoensayos para tratamiento y diagnóstico, entre otros (Tiwari et al., 2011).

Si bien aún se requieren mayores estudios, la cantidad de fármacos que ya han sido aprobados para el tratamiento de distintos tipos de cáncer establecen que los NS proveen de una alternativa que merece ser estudiada como herramienta para el tratamiento del CaP.

Por otro lado, el uso de conjugados AuNPs-péptidos ha sido el objeto de estudio durante años. Algunas de sus aplicaciones involucran la inhibición de las interacciones moleculares entre patógenos con el huésped, entrega de fármacos e imagenología molecular (Jeong et al., 2018). Estos conjugados también han sido utilizados para la detección de células tumorales circulantes en sangre periférica utilizando un péptido del factor de crecimiento epidérmico (X. Wang et al., 2011); en imagenología han sido utilizados contra fibras amiloides en ratas Sprague-Dawley usando un péptido anfipático (Secuencia: CLPFFD) (Guerrero et al., 2012). Otros conjugados AuNPs-péptidos han sido utilizados para entregar siRNAs al núcleo de células MCF-7 utilizando un péptido de NLS (N. Li et al., 2017). En otro trabajo un conjugado de AuNPs con el péptido de penetración TAT fue utilizado para la entrega específica de plásmidos al tejido de melanoma mostrando una mejoría en los efectos terapéuticos (Niu et al., 2017). Estos ejemplos proveen de evidencia de la habilidad de los conjugados AuNPs-péptido de ser utilizados con fines terapéuticos.

2. Justificación

El cáncer de próstata en México presenta alta incidencia y mortalidad. Los métodos actuales para su detección, así como las limitaciones en el tratamiento y la esperanza de vida representan un reto en nuestra población, donde la nanotecnología presenta una oportunidad de mejora para el diagnóstico, abordaje molecular y diseño de tratamientos dirigidos.

En este proyecto se propone un NS compuesto de péptidos diseñados a partir de Myc y Max, acoplados a oligonucleótidos y AuNPs. Este trabajo pretende demostrar que los nanosistemas diseñados son capaces de inducir cambios en las firmas transcriptómicas de genes guiados por Myc en líneas celulares de cáncer de próstata.

Finalmente, el nanosistema propuesto tiene el potencial de utilizarse posteriormente como teranóstico.

3. Hipótesis

Los nanosistemas pMyc/pMax:AuNPs inducen cambios en las firmas transcriptómicas de líneas celulares de cáncer de próstata

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Identificar las firmas transcriptómicas en líneas celulares de cáncer de próstata de los nanosistemas basados en péptidos Myc y/o Max y nanopartículas de oro dirigidos a la secuencia consenso E-box.

4.2 Objetivos específicos:

1. Diseñar, construir y caracterizar los nanosistemas pMyc/pMax:AuNPs mediante EMSA, UV-Vis, TEM y DLS.
2. Evaluar la hemocompatibilidad y citotoxicidad *in vitro* de los nanosistemas.
3. Evaluar el perfil transcriptómico mediante RNA-Seq de células DU145 tratadas con los nanosistemas.
4. Comparar el perfil transcripcional de células DU145 con y sin tratamiento para determinar la firma transcriptómica.

5. Materiales y Métodos

5.1 Esquema general de trabajo

En la Figura 9 se muestra el esquema general de trabajo.

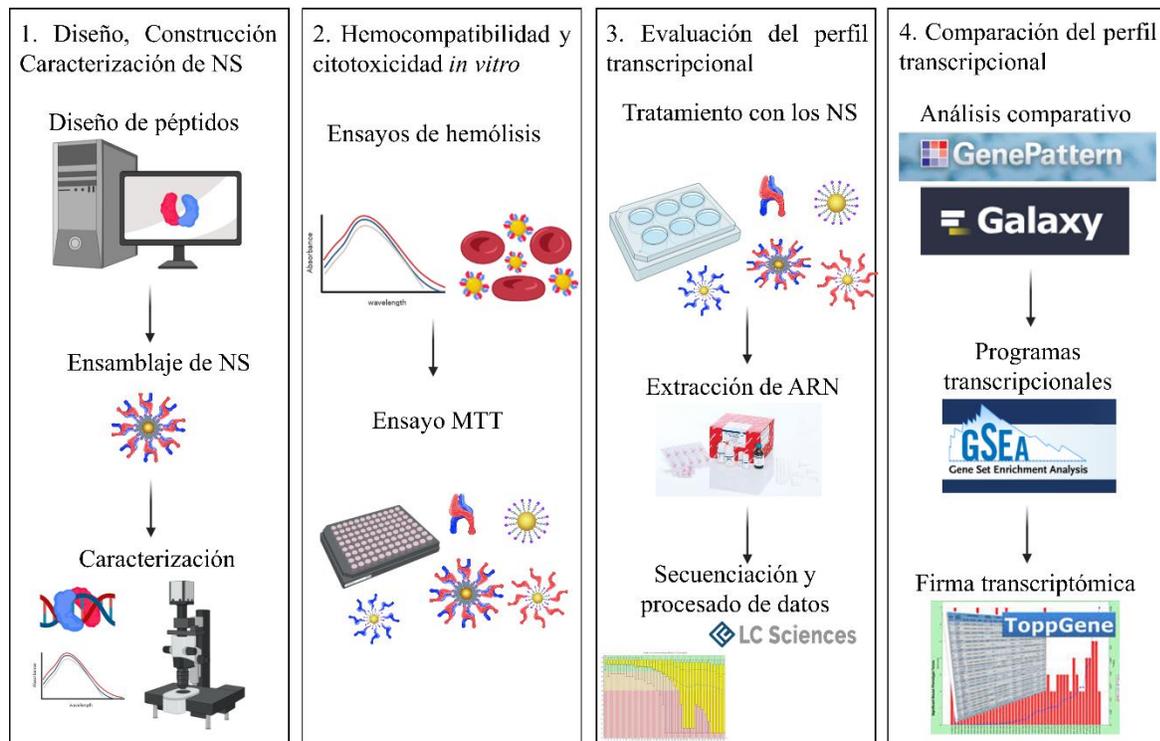


Figura 9. Estrategia general del trabajo dividida en las 4 etapas correspondiente a los objetivos específicos.

5.2 Materiales y reactivos

5.2.1 Equipos

- Espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham MD, USA)
- Lector de microplacas Cytation3 (BioTek, Illinois, Estados Unidos)
- Ultracongelador Vip Series (Panasonic, Osaka, Japón)
- Campana de flujo laminar (Nuair, Minnesota, Estados Unidos)
- Incubadora 2310 (VWR International, Pensilvania, Estados Unidos)
- Cell Countess 3 (Invitrogen, Massachusetts, Estados Unidos)
- Microcentrífuga 5430 (Eppendorf, Framingham, Estados Unidos)
- Microscopio óptico Olympus CKX41 (Olympus Life Science, Tokio, Japón)
- Centrífuga J-600 (Solbat, Puebla, México)
- Sistema de bioimagen UVP Chemi Camera EC3 (Bio-rad, California, Estados Unidos)
- Termomixer AG 5350 (Eppendorf, Framingham, Estados Unidos)
- Termociclador MJ Mini (Bio-rad, California, Estados Unidos)
- Fuente de poder para electroforesis modelo 250 (Life Technologies, Beverly, Estados Unidos)
- Cámara de electroforesis B1 (Owl Separation Systems, Portsmouth, Estados Unidos)
- Microcentrífuga 5415 C (Eppendorf, Framingham, Estados Unidos)
- Zetasizer Nano ZS590 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido)
- Microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 2200 FS (JEOL, Tokio, Japón)
- Micropipetas varios volúmenes (Eppendorf, Framingham, Estados Unidos)

5.2.2 *Materiales*

- Tubos para microcentrífuga de varios volúmenes (Heathrow Scientific, Illinois, Estados Unidos)
- Puntillas para micropipetas de varios tamaños (Axygen Scientific, California, Estados Unidos)
- Pipetas serológicas de 2, 5 y 10 ml (Corning Incorporated, Nueva York, Estados Unidos)
- Microplacas de 6, 12, 24 y 96 pocillos (Corning Incorporated, Nueva York, Estados Unidos)
- Botellas para cultivo celular (Biolite, California, Estados Unidos)
- Tubos cónicos de 15 y 50 ml (Corning Incorporated, Nueva York, Estados Unidos)
- Pañuelos desechables Kimwipes (Kimtech, Texas, Estados Unidos)
- Cámara de Neubauer bright-line (Hausser Scientific, Pensilvania, Estados Unidos)
- Tubos GentegraRNA (GenTegra LLC, California, Estados Unidos)
- Columnas Spin-X MWCO 5 kDa y 10 kDa (Corning Incorporated, Nueva York, Estados Unidos)

5.2.3 *Reactivos*

- RNeasy Plus Mini Kit (Quiagen, Hilden, Alemania)
- Azul de tripan 0.4 % (Invitrogen, Massachusetts, Estados Unidos)
- Tripsina-EDTA 0.05 % (1X) (Gibco, Nueva York, Estados Unidos)
- Penicilina-Estreptomicina PenStrep (Gibco, Nueva York, Estados Unidos)
- Anfotericina B (Gibco, Nueva York, Estados Unidos)
- Bioline HypperLadder 100 pn (Meridian Bioscience, Ohio, Estados Unidos)

- Agua destilada ultrapura (Invitrogen, Massachusetts, Estados Unidos)
- Buffer Tris-EDTA (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos)
- Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Gibco, Nueva York, Estados Unidos)
- Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Gibco, Nueva York, Estados Unidos)
- RNaseZap (Invitrogen, Massachusetts, Estados Unidos)
- Alcohol etílico Absoluto (CTR Scientific, Nuevo León, México)
- Alcohol isopropílico (CTR Scientific, Nuevo León, México)
- Agarosa (Bio-rad, California, Estados Unidos)
- Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos)
- Ditioneitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos)
- Etanol grado biología molecular (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos)
- Kits de conjugación de AuNPs de 5 nm con maleimida (Cytodiagnostics, Ontario, Canadá)
- Cell proliferation Kit I (Roche, Penzberg, Alemania)
- Buffer PBS 10 X (Invitrogen, Massachusetts, Estados Unidos)
- Trizma base (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos)
- Ácido bórico (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos)
- Buffer TB 5 X (450 mM Tris, 450 mM ácido bórico)

5.2.4 *Material biológico*

- Líneas celulares de cáncer de próstata: DU145, PC-3 y LNCaP (Donadas por Delee Corp)
- Línea celular de tejido epitelial de riñón de mono verde: Vero CCL-81 (Donadas por el Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León)

- Oligonucleótidos para ensayo EMSA (Integrated DNA Technologies, Iowa, Estados Unidos)
- Péptidos pMyc y pMax (Accura, Nuevo León, México)
- Sangre para la obtención de la suspensión de eritrocitos

5.3 Métodos

5.3.1 Diseño y síntesis de los péptidos pMyc y pMax

Se partió de las secuencias para las proteínas nativas de Myc (NP_002458.2) y Max (NP_660087.1). Utilizamos Swiss-Model para el modelamiento homólogo de las proteínas (Waterhouse et al., 2018), Cn3D para la visualización de la estructura macromolecular y de la interacción de los residuos aminoacídicos (Y. Wang et al., 2000) y ScooP para obtener la estabilidad termodinámica teórica (Pucci et al., 2017). Así mismo, se realizó una búsqueda utilizando BLASTp suite en la base de datos de secuencias de proteínas patentadas (Pataa). Se realizaron diversas iteraciones de un proceso que involucró la edición de las secuencias, eliminando residuos aminoacídicos que no fueran relevantes para el diseño del nanosistema por ejemplo, el dominio de transactivación transcripcional; esto se puede apreciar en la Figura 10 que muestra el proceso de diseño de los péptidos. La síntesis de los péptidos fue llevada a cabo por el servicio de síntesis de péptidos a la medida de Accura Monterrey S.A. de C.V.

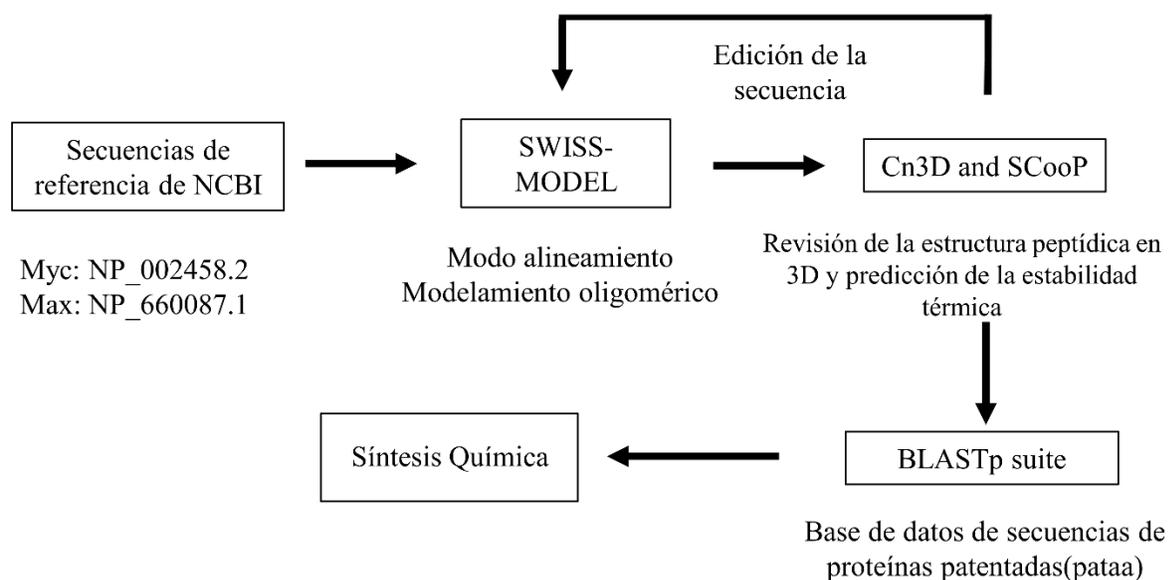


Figura 10. Esquema del diseño de los péptidos pMyc y pMax.

5.3.2 Diseño de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos para el Ensayo en el cambio de corrimiento electroforético (EMSA) consistió en oligonucleótidos de cadena sencilla que fueron hibridados a doble cadena en un termociclador antes de ponerlos en contacto con los péptidos; diseñamos 4 pares de oligonucleótidos: “CME Allevato” corresponde a oligos con secuencia canónica E-box reportados anteriormente por Allevato y colaboradores (Allevato et al., 2017), CME corresponde a oligos diseñados por nosotros que contiene una secuencia canónica E-box, NE corresponde a oligos con elementos no E-box por los cuales el dímero Myc:Max tiene reportada una afinidad (Allevato et al., 2017) y CTRL corresponde a oligos que no contienen una secuencia canónica E-box. Las secuencias de los oligonucleótidos se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para el ensayo EMSA.

Código	Secuencia
CME Allevato F	5' CCG GCC ACG TGC ACG TGT TAA TAG CTC AGA CTA CTG TGT CGA CG 3'
CME Allevato R	5' CGT CGA CAC AGT AGT CTG AGC TAT TAA CAC GTG CAC GTG GCC GG 3'
CME F	5' AGA TCT CGA GCT GCA TGC TGT ACA CGT GAT GTC GTA CGT CGA GCT CTA GT 3'
CME R	5' ACT AGA GCT CGA CGT ACG ACA TCA CGT GTA CAG CAT GCA GCT CGA GAT CT 3'
NE F	5' AGA TCT CGA GCT GCA TGC TGT AAA CGT TAT GTC GTA CGT CGA GCT CTA GT 3'
NE R	5' ACT AGA GCT CGA CGT ACG ACA TAA CGT TTA CAG CAT GCA GCT CGA GAT CT 3'
CTRL F	5' AGA TCT CGA GCT GCA TGC TGT ATT AGC AAT GTC GTT ATC AGA GCT CTA GT 3'
CTRL R	5' ACT AGA GCT CTG ATA ACG ACA TTG CTA ATA CAG CAT GCA GCT CGA GAT CT 3'

CME, secuencia canónica E-box; NE, elemento no E-box; CTRL, control. Las secuencias CME están en negritas, las secuencias no CME están subrayadas; F, secuencia forward; R, secuencia reversa.

5.3.3 Ensayo de cambio en el corrimiento electroforético

Una vez diseñados y adquiridos los péptidos, se diseñaron experimentos para determinar la especificidad de los péptidos de diseño pMyc y pMax para unirse a las secuencias E-box, mediante el ensayo EMSA utilizando los oligonucleótidos mencionados en el punto 4.3.2. Los oligonucleótidos fueron resuspendidos en buffer TE 1 X pH 7.5 para llevarlos a una concentración final de 250 μ M y a su vez en otro tubo eppendorf diluirlos para llevarlos a 100 μ M. La mezcla de reactivos para la reacción de hibridación de los oligonucleótidos de cadena sencilla aparece en la Tabla 4.

Tabla 4. Preparación de reacción para hibridar los oligonucleótidos utilizados en el EMSA.

Reactivo	Cantidad (μL)	Concentración Final
Agua ultrapura	8.35	N/A
Buffer (5 X)	7.7	1.54 X
MgCl₂ (25mM)	7.7	7.7 mM
Oligonucleótido forward	0.625	2.5 μ M
Oligonucleótido reversa	0.625	2.5 μ M
Volumen final	25	N/A

N/A – no aplicable

El programa en el termociclador consistió en un solo ciclo y se encuentra en la Tabla 5, la dimerización de pMyc:pMax se llevó a cabo colocando 2 μ L de pMyc 75 μ M y 2 μ L de pMax 75 μ M en un tubo cónico de PCR. Los tubos fueron sometidos a un tratamiento de 37 °C por 30 min para posteriormente ser tratados a 22 °C por 30 min. Una vez realizado esto, se agregaron 5 μ L de los oligonucleótidos hibridados y se repitió el procedimiento para fomentar la interacción péptidos-ADN. El EMSA fue resuelto siguiendo la metodología planteada por Ream y colaboradores (Ream et al., 2016). Se colocaron 5 μ L de cada muestra en los pocillos de un gel de agarosa 2.5 % elaborado con TB 1 X y resuelto mediante electroforesis en buffer TB 0.5 X a 160 V por 10 min y después a 100 V por 90 min. Las imágenes fueron capturadas utilizando el Sistema de bioimagen UVP Chemi Camera EC3.

Tabla 5. Programa de hibridación de oligonucleótidos para EMSA.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
95	5
62	10
52	10
25	20

5.3.4 Ensamblaje de los nanosistemas

Se ensamblaron 3 diferentes NS: pMyc:AuNPs, pMax:AuNPs, pMyc:pMax:AuNPs los cuáles contienen los péptidos indicados en su nombre. Y aparecen de manera visual en la Figura 11, con esta nomenclatura aparecerán a lo largo de todo este documento.

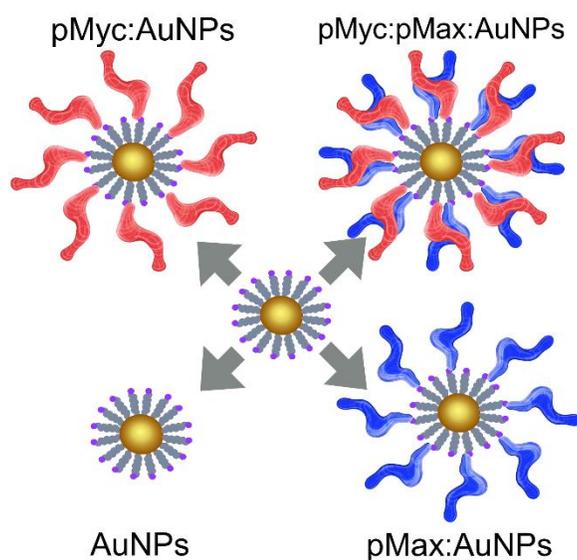


Figura 11. Esquema de los nanosistemas pMyc:AuNPs, pMax:AuNPs y pMyc:pMax:AuNPs.

5.3.5 Nanosistemas pMyc:AuNPs, pMax:AuNPs y pMyc:pMax:AuNPs

Los péptidos fueron resuspendidos en PBS 1 X pH 7.4 a una concentración final de 1 mg/ml. Posteriormente, a 50 μ L de cada suspensión de péptidos se le añadió 1 μ L de DTT 0.5 M para reducirlos. Los tubos fueron incubados por 2 h a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Una vez concluida la reducción, se eliminó el DTT centrifugando en columnas Illustra Microspin G-25 a 735 g por 1 min.

Los péptidos fueron conjugados siguiendo las instrucciones del fabricante de los kits de conjugación de AuNPs de 5 nm con maleimida. Se añadieron 60 μ L de buffer de reacción del kit a 48 μ L de péptidos. De esa solución, se transfirieron 90 μ L al vial que contiene las AuNPs liofilizadas. Se mezcló por pipeteo hasta que todas las AuNPs se encontraron en suspensión y se incubó el vial por 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se añadieron 10 μ L del buffer de extinción y se incubó el vial por 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad para detener la reacción de conjugación. Finalmente, los péptidos no unidos, fueron eliminados al centrifugar en una columna Spin-X MWC 100 kDa a 10,000 g por 10 min. Las nanopartículas fueron resuspendidas en PBS 1 X pH 7.4 para su almacenamiento. Se caracterizó la conjugación utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 y los nanosistemas ensamblados fueron almacenados a 4 °C hasta su uso.

5.3.6 Ensayo de estabilidad de los nanosistemas

Se ajustaron los nanosistemas a una concentración de 0.05 ng/ μ l y se obtuvieron los espectros de absorbancia utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 en longitudes de onda desde los 220 hasta los 750 nm por 96 h midiendo en intervalos de 24 h.

5.3.7 Caracterización por microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) consiste en el uso de un haz de electrones para visualizar los objetos de estudio; esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la caracterización de nanopartículas. Los nanosistemas fueron disueltos a una concentración de 2.5 ng/μl utilizando agua destilada. Se colocaron 10 μl de cada nanosistema en una rejilla formvar de carbono cubierta de cobre y se dejó secar por 30 min a temperatura ambiente. Las imágenes fueron capturadas utilizando un microscopio JEOL JEM2200 FS de 200 kV. Posteriormente se utilizó el software ImageJ (ver. 13.0.6) para analizar la imagen y obtener el tamaño del núcleo metálico de los nanosistemas.

5.3.8 Caracterización por dispersión dinámica de la luz

La dispersión dinámica de la luz (DLS) permite la caracterización física de nanopartículas en solución midiendo el movimiento ópticamente fijo registrando la señal de la luz en un ángulo fijo; esto permite determinar el diámetro hidrodinámico (HD). El potencial zeta fue basado en la movilidad electroforética. Ambas propiedades fueron determinadas utilizando el equipo Zetasizer Nano ZS90 en los nanosistemas ajustados a una concentración de 2.5 ng/ μl.

5.3.9 Evaluación de la hemocompatibilidad

Es imperativo determinar la hemocompatibilidad de los NS por dos principales razones: para determinar si los NS tienen posibilidad de escalar a un modelo preclínico y para determinar las concentraciones a utilizar en los ensayos de citotoxicidad. La prueba consiste en la preparación de una solución de eritrocitos, la incubación de éstos con los NS y la cuantificación de la hemoglobina liberada mediante UV-Vis.

5.3.9.1 Preparación de solución de eritrocitos

Se obtuvieron aproximadamente 4 mL de sangre periférica en un tubo con EDTA a partir de un donador. La sangre fue transferida a un tubo cónico de 15 mL y éste fue centrifugado a 3,000 rpm por 3 min. Descartamos el plasma con una pipeta y agregamos PBS 1X hasta llegar a los 5 mL. Posteriormente, la solución fue homogenizada mediante inversión suave para ser centrifugada nuevamente a 3,000 rpm por 3 min. El sobrenadante fue descartado con una micropipeta. De esta manera se realizaron 3 lavados para obtener una solución con únicamente eritrocitos. Una vez concluido esto, se preparó una dilución 1:99 de eritrocitos agregando 9,800 μ L de PBS 1X a otro tubo cónico de 15 mL y 100 μ L de la solución con eritrocitos lavados. Finalmente, la solución fue homogenizada mediante mezclado por inversión suave. Ésta fue guardada a 4 °C hasta su uso.

5.3.9.2 Tratamiento de los eritrocitos con los nanosistemas

Se utilizaron 3 diferentes concentraciones de cada nanosistema o AuNPs para este ensayo: 0.05 ng/ μ L, 0.5 ng/ μ L, 5 ng/ μ L. Realizamos 5 réplicas por cada concentración y utilizamos como control negativo PBS 1X y como control positivo agua destilada. Se mezclaron 16 μ L cada tratamiento con 4 μ L de la dilución 1:99 de eritrocitos lavados en microtubos de 0.5 mL. Después de una homogenización con pipeteo suave, se incubaron por 30 min a 37 °C en un Thermomixer a 300 rpm. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 14,000 rpm por 3 min. Las absorbancias de la hemoglobina en el sobrenadante fueron obtenidas utilizando espectrofotometría UV-Vis con lectura a 415 nm. Se obtuvieron los porcentajes de hemólisis siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Hemólisis (\%)} = \left(\frac{[\text{MuestraAbs415} - \text{control negativoAbs415}]}{[\text{MuestraAbs415} - \text{control positivoAbs415}]} \right) * 100$$

5.3.10 Evaluación de la citotoxicidad por MTT

La determinación de la citotoxicidad por la prueba de MTT consiste en lo siguiente: Se siembran en una placa de cultivo un número medido de células y se ponen en contacto con el agente a evaluar por un tiempo definido por los investigadores. Posteriormente, se retira el medio con el agente a evaluar y se añade medio con el reactivo MTT el cuál será reducido por la actividad mitocondrial de las células vivas en los pozos de la placa de cultivo. Se incuba a 37°C por 3 h y el MTT habrá sido reducido a cristales de formazán, los cuales deberán ser disueltos en isopropanol acidificado (pH = 3) para obtener la lectura de absorbancia a 570 nm y 651 nm.

En una placa de 96 pocillos se sembraron 10,000 de cada una de las líneas celulares (PC-3, LNCaP, DU145 o Vero CCL-81) por pocillo, con un volumen de 100 µL de medio DMEM o RPMI según los requerimientos de las células. Posteriormente las células se dejaron adherir incubando por 24 h o 48 h dependiendo de la línea celular utilizada; LNCaP requiere 48 h para adherirse correctamente al fondo de la botella o placa. Se retiró el medio y se colocaron 100 µL de medio con nanosistema y se trabajó con las 3 concentraciones de cada uno de los nanosistemas cómo en el punto 4.3.5: 0.05 ng/µL, 0.5 ng/µL y 5 ng/µL. La placa fue incubada a 37 °C y con 5 % de CO₂ por 24 h. Una vez concluido el tratamiento, se retiró el medio con nanosistema y se añadieron 100 µL de una solución de medio-reactivo MTT; las placas fueron incubadas en las mismas condiciones por 3 h. Transcurridas las 3 h, los cristales de formazán fueron disueltos añadiendo 100 µL de isopropanol acidificado a pH 3. Una vez disueltos todos los cristales, las placas fueron leídas en un lector de microplacas a 570 nm y a 651 nm. La diferencia entre las absorbancias obtenidas a 570 nm y 670 nm son las utilizadas en la siguiente fórmula para el cálculo de viabilidad celular:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{Absorbancia\ muestra * 100}{Absorbancia\ control}$$

Todos los ensayos se realizaron con un control y con 3 réplicas cada uno.

5.3.11 Obtención de las firmas transcriptómicas

5.3.11.1 Extracción del ARN

Se seleccionó la línea DU145 y los NS pMyc:AuNPs, pMax:AuNPs y pMyc:pMax:AuNPs para la obtención de las firmas transcriptómicas debido a que los resultados de los ensayos de citotoxicidad fueron más significativos, y a la poca información transcriptómica de esta línea celular.

Para la extracción de RNA se siguieron las instrucciones del fabricante del kit RNeasy Plus mini kit de Qiagen. Se sembraron 1×10^6 células en placas de 6 pozos. Posteriormente, las células fueron tratadas con los nanosistemas en una concentración de $0.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ por 24 h, utilizando células DU145 sin ningún tratamiento como control. Una vez concluido el tratamiento, las células fueron despegadas de la placa utilizando $1,000 \mu\text{L}$ de tripsina y ésta fue inactivada con $1,000 \mu\text{L}$ de RPMI. Esta solución fue colocada en un tubo de microcentrífuga de 2 mL el cuál fue centrifugado a 1,000 rpm por 5 min. Una vez decantado el sobrenadante las células fueron lisadas con $350 \mu\text{L}$ de buffer RLT incluido en el kit de Qiagen. Se homogenizó el pellet al mezclar en vortex por 1 min. El lisado homogenizado fue transferido a una columna eliminadora de ADN genómico; la columna fue centrifugada por 30 s a 10,500 rpm. La columna fue descartada y se siguió trabajando con el volumen de buffer en el tubo recolector. A este volumen se le añadió 1 volumen de etanol 70 % y se mezcló por pipeteo. Después de esto, $700 \mu\text{L}$ de esta solución fueron transferidos a una columna RNeasy spin con un tubo de recolección y se centrifugó a 10,500 rpm por 15 s. Una vez concluida la centrifugación, se agregaron $700 \mu\text{L}$ del buffer RW1 y se centrifugó por el mismo tiempo y a la misma velocidad; el filtrado fue descartado. Posteriormente se añadieron $500 \mu\text{L}$ de buffer RPE y la columna fue centrifugada por 2 min a 10,500 rpm. Finalmente, se añadieron $30 \mu\text{L}$ de agua libre

de RNAsas y se centrifugó por 1 min a 10,500 rpm captando el ARN en un tubo nuevo de recolección. De manera inmediata se procedió a realizar el análisis de calidad de los ARN mediante espectrofotometría obteniendo las concentraciones, las relaciones 260/280 y 260/230. Los tubos que contuvieron los diferentes ARN fueron almacenados a -20 °C hasta su uso.

5.3.11.2 RNA-Seq y firma transcriptómica

Se utilizaron los tubos GentegraRNA para almacenar a temperatura ambiente los ARN y para mejorar la integridad de éstos durante todo el transporte hacia la empresa que realizó la secuenciación. Se requirió 4,000 ng de RNA en 25 uL de agua destilada por cada experimento. Los tubos GentegraRNA fueron secados en la cabina de bioseguridad por 24 h.

Las muestras fueron enviadas a LC Sciences (Houston, Texas, Estados Unidos) para su secuenciación. La biblioteca fue preparada utilizando el protocolo de preparación Truseq-stranded-mRNA de Illumina. La integridad del ARN fue determinada con un Bioanalyzer 2100 de Agilent Technologies. Los mRNAs fueron aislados utilizando perlas magnéticas oligo-(dT) con dos rondas de purificación. Después de la purificación, el ARN fue fragmentado utilizando un buffer catiónico divalente a altas temperaturas. La construcción de la biblioteca de ADN fue llevada a cabo con el siguiente flujo de trabajo: Control de calidad utilizando el chip de ADN de alta sensibilidad en un Bioanalyzer 2100 de Agilent Technologies; la secuenciación pareada fue realizada utilizando el sistema de secuenciación NovaSeq 6000 de Illumina. Una vez obtenidos los archivos, se realizó la eliminación de las lecturas que contenían el adaptador con la herramienta Cutadapt ver. 4.7 . Posteriormente, la calidad de las secuencias fue analizada utilizando FastQC ver 0.12.0. Se realizó el alineamiento de las lecturas contra el genoma de referencia GRCh38 utilizando HISAT2 ver 2.2.1. y se utilizó StringTie ver 2.2.0 para ensamblar las lecturas. Gffcompare ver 0.12.6 fue

utilizado para la reconstrucción del transcriptoma obtenido; finalmente, StringTie y ballgown 2.1.1 fueron utilizadas para estimar los niveles de expresión de los transcritos.

Para el análisis de expresión diferencial de los ARNm, se utilizó StringTie calculando los fragmentos por kilobase de transcrito por cada millón de lecturas alineadas (FPKM). Se utilizó DESeq2 entre dos de las diferentes muestras. Los ARNm con una tasa de descubrimiento falsa (FDR) por debajo de 0.05 y un cambio absoluto ≥ 2 fueron considerados como ARNm diferencialmente expresados. La firma transcriptómica fue obtenida utilizando la plataforma ToppGene utilizando la simbología de genes Hugo.

5.3.11.3 Ensayo de enriquecimiento de conjunto de genes

Para los ensayos de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA) se utilizó el software GSEA 4.3.3 del Broad Institute (Subramanian et al., 2005). Se utilizaron los archivos rnk provenientes de cada una de las secuenciaciones para el análisis contra las bases de datos Human_HGNC_ID_MSigDB.v2023.2.Hs.chip y h.all.v2023.2.Hs.symbols.gmt con 1000 permutaciones.

6. Resultados

6.1 Diseño y síntesis de pMyc y pMax

El pMyc resultante tiene una longitud de 51 aminoácidos en su secuencia; contiene el dominio bHLH para el reconocimiento de la secuencia E-box y la dimerización, una NLS para promover su translocación al núcleo y una cisteína en su extremo C-terminal para la conjugación con las AuNPs. El pMax resultó en una secuencia aminoacídica de 46 residuos; contiene el dominio bHLH y la cisteína en su extremo C-terminal. Las predicciones del modelamiento de los péptidos, y su heterodimerización, fueron obtenidas utilizando SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive> (5 agosto del 2020)). Una imagen representativa del render de esto puede ser observada en la Figura 12 realizada utilizando Cn3D.

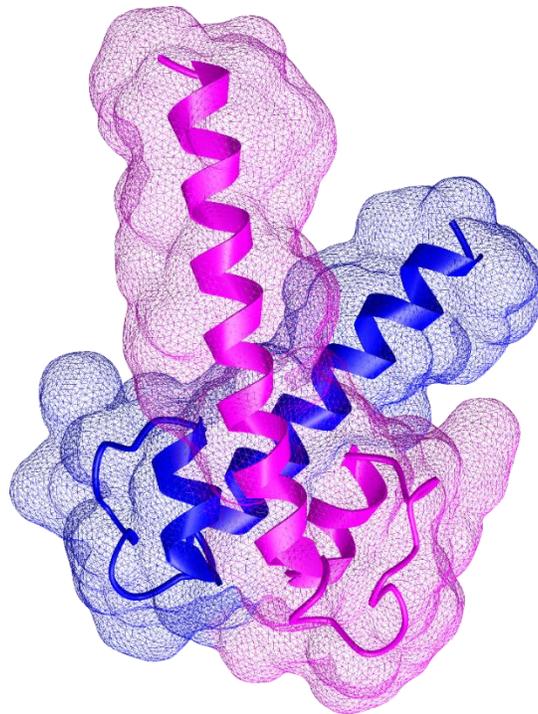


Figura 12. Imagen representativa del modelamiento obtenido con Cn3D del heterodímero de pMyc (rosa) y pMax (azul).

El heterodímero predicho pMyc:pMax mantiene los sitios de reconocimiento y unión a la CME; los extremos C-terminales están separados por 15.3 angstroms. El servidor ScooP (ver. 1.0) predijo estabilidad térmica tanto de los péptidos individuales, como del heterodímero (Waterhouse et al., 2018), (Tabla 6) a temperaturas muy por encima de la temperatura fisiológica estándar de 37 °C. Estos resultados sugieren que pMyc, pMax y pMyc:pMax se mantuvieron estables durante los tiempos de incubación en los ensayos de viabilidad celular y que existe la posibilidad de mantenerse estable en un modelo *in vivo*.

Tabla 6. Estabilidad térmica calculada *in silico* de los péptidos y dímero.

	T_m (°C)	ΔG (kcal/mol)
pMyc	80.1	-8.4
pMax	81.4	-6
pMyc:pMax dimer	76.6	-4.2

6.2 Evaluación de la interacción entre péptidos y ADN mediante ensayo de cambio en el corrimiento electroforético EMSA

El ensayo de EMSA pretendió demostrar evidencia de interacción péptidos;ADN mediante retraso del corrimiento electroforético. Los homodímeros pMyc:pMyc y pMax:pMax no interactuaron con la CME ya que los resultados muestran que no hubo retraso en el corrimiento electroforético (Figura 11 (a),(b)). Por el contrario, los resultados de EMSA revelaron interacciones péptidos-ADN contundentes entre pMyc:pMax y las CME, indicando una unión específica. Esto último se puede observar en la Figura 11(c), de manera específica en los carriles 4 y 8; el carril 4 corresponde al oligonucleótido diseñado por nosotros que contiene una CME y el 8 corresponde al oligonucleótido reportado por Allevato y colaboradores que contiene una CME (Allevato et al., 2017). No hay

evidencia de interacción con secuencias que no contienen la CME tanto para pMax:pMax y pMyc:pMyc como para pMyc:pMax. Estos resultados sugieren la heterodimerización, un reconocimiento específico a CME y una interacción entre pMyc:pMax y la CME. Estos resultados son similares a la habilidad de Omomyc a unirse de manera específica a CME (H. Chen et al., 2018; Soucek et al., 1998) y a los resultados del análogo sintético de Myc [AQ] (Calo-Lapido et al., 2019). Nuestros resultados muestran una diferencia pequeña entre la distancia de las CME con respecto a las otras secuencias. Este cambio discreto es principalmente debido al tamaño pequeño de los péptidos (<7 kDa por cada uno). En cambio, en EMSA con anticuerpos (~ 150 kDa y 10 nm de longitud), o con otras proteínas, el cambio es más significativo que el observado en la Figura 13 (B. Chen et al., 2012; Reth, 2013).

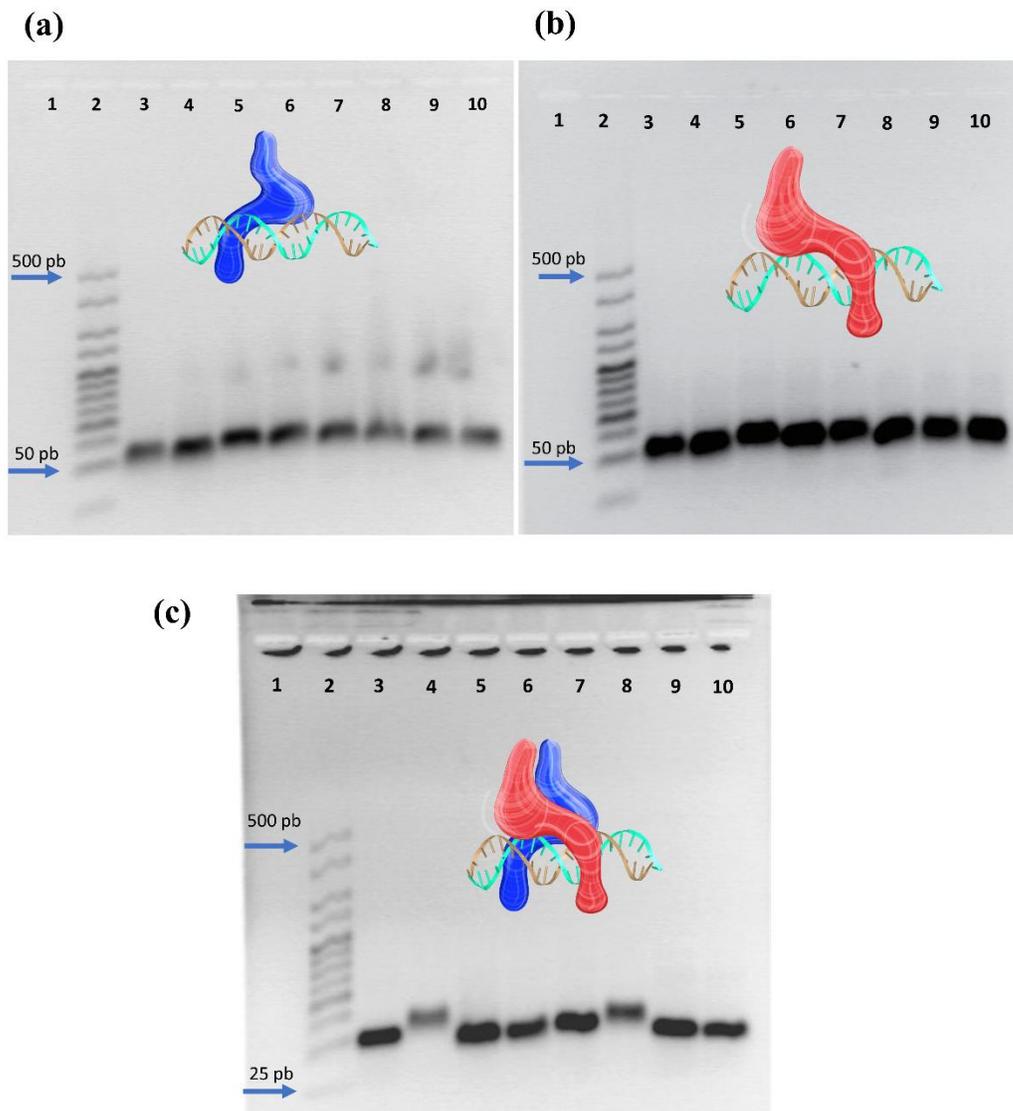


Figura 13. Imágenes de los geles de los EMSA con (a) pMax, (b) pMyc y (c) pMyc:pMax con los oligonucleótidos descritos en la Tabla 3. Los carriles fueron los siguientes: 1, vacío; 2, Marcador de peso molecular de 25 pb; 3, CME; 4, CME y péptido(s); 5, Ctrl; 6, Ctrl y péptido(s); 7, CME-Allevato; 8, CME-Allevato y péptidos(s); 9, NE; 10, NE y péptido(s). Una representación de los péptidos y el heterodímero interactuando con el ADN fue incluido; pMyc(rojo), pMax (azul) y en celeste con dorado la doble cadena de ADN.

6.3 Análisis por UV-Vis del ensamblaje de los nanosistemas pMyc:AuNPs, pMax:AuNPs y pMyc:pMax:AuNPs

La conjugación de los péptidos a las AuNPs resultó en un cambio en el máximo punto de absorbancia a una longitud de onda mayor comparado con el máximo punto de absorbancia de las AuNPs (Figura 14). La longitud de onda incrementó en 6 nm para pMyc:pMax:AuNPs y en 9 nm en pMyc:AuNPs y pMax:AuNPs. El análisis mediante UV-Vis reveló cambios batocrómicos, lo que indica un cambio en la resonancia de plasmón superficial; esto significa que las propiedades electrónicas de las AuNPs son afectadas por los ligandos (Cirri et al., 2015), en este caso pMyc y pMax. Estos cambios batocrómicos han sido observados en otros trabajos que involucran la conjugación de AuNPs con péptidos y se ha propuesto como indicador de un ensamblaje correcto de los nanosistemas (Gamrad et al., 2016; Kumar et al., 2012; Matea et al., 2015). Estos resultados proveen evidencia de una conjugación exitosa.

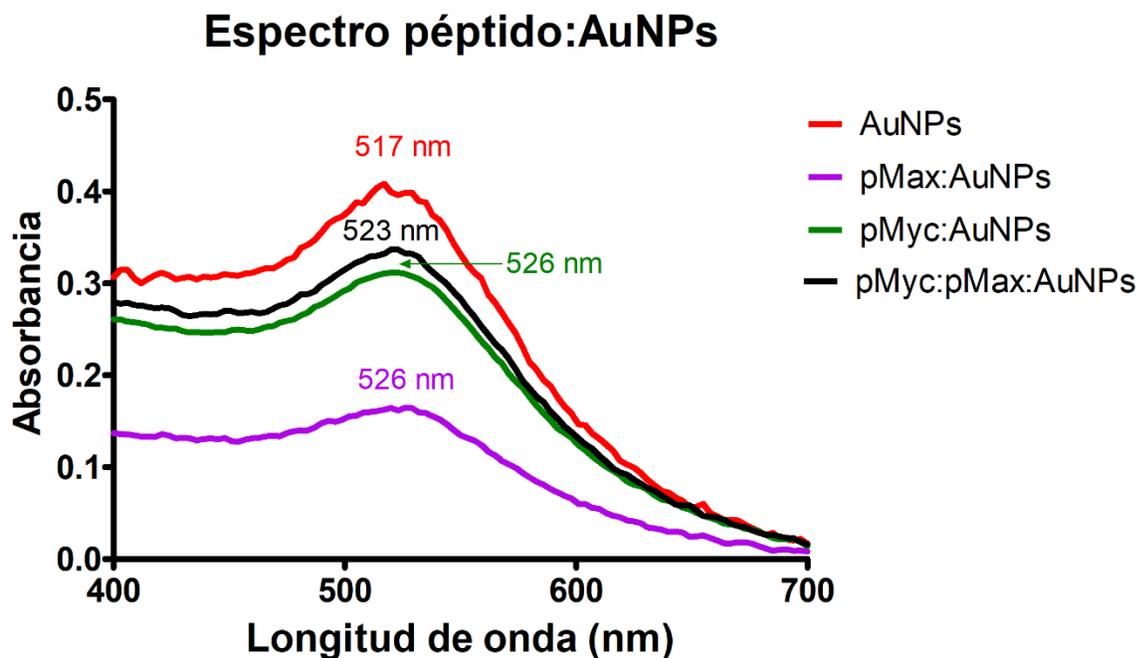


Figura 14. Espectro de absorción obtenido para los diferentes nanosistemas y las AuNPs sin péptido.

6.4 Caracterización física de los nanosistemas por TEM y DLS

Las figuras 15-18 muestra micrografías representativas de los nanosistemas; en la Tabla 7 se muestran los resultados cuantificados de los diámetros de las AuNPs (núcleo metálico) de los nanosistemas, además de los diámetros hidrodinámicos (HD) obtenidos mediante dispersión dinámica de la luz y el potencial zeta obtenido mediante movilidad electroforética.

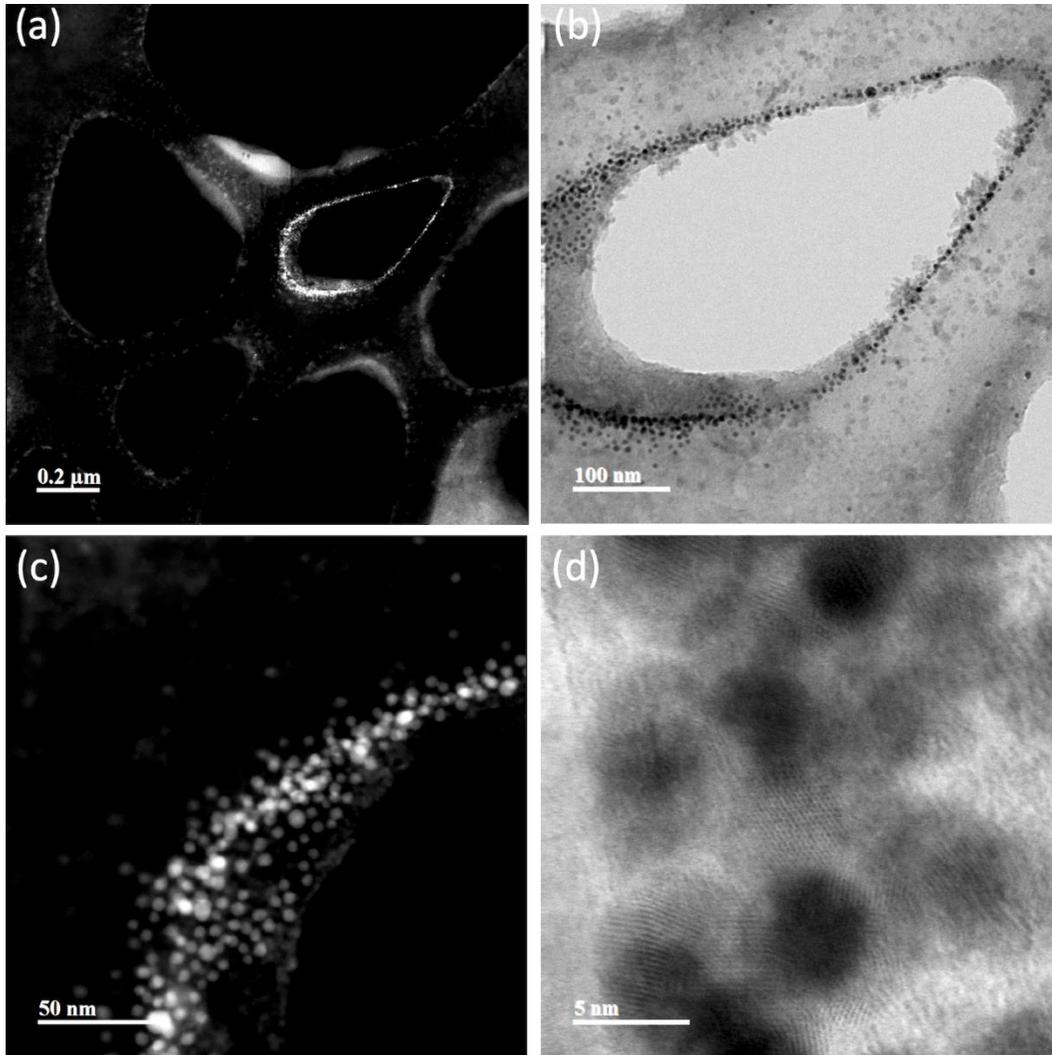


Figura 15. Imágenes representativas de TEM de las AuNPs. (a) La estructura en red de la rejilla formvar está cubierta con AuNPs cubiertas de PEG de 5 kDa, formando una suspensión coloidal (las AuNPs cubiertas de PEG son visibles aquí como una nebulosa). (b) La estructura coloidal depositada en la estructura de la rejilla. (c) Un acercamiento de la estructura coloidal de las AuNPs. (d) El núcleo magnético de las 5 nm aparece como esferas negras (el mismo núcleo magnético es observado como esferas blancas en a y c)

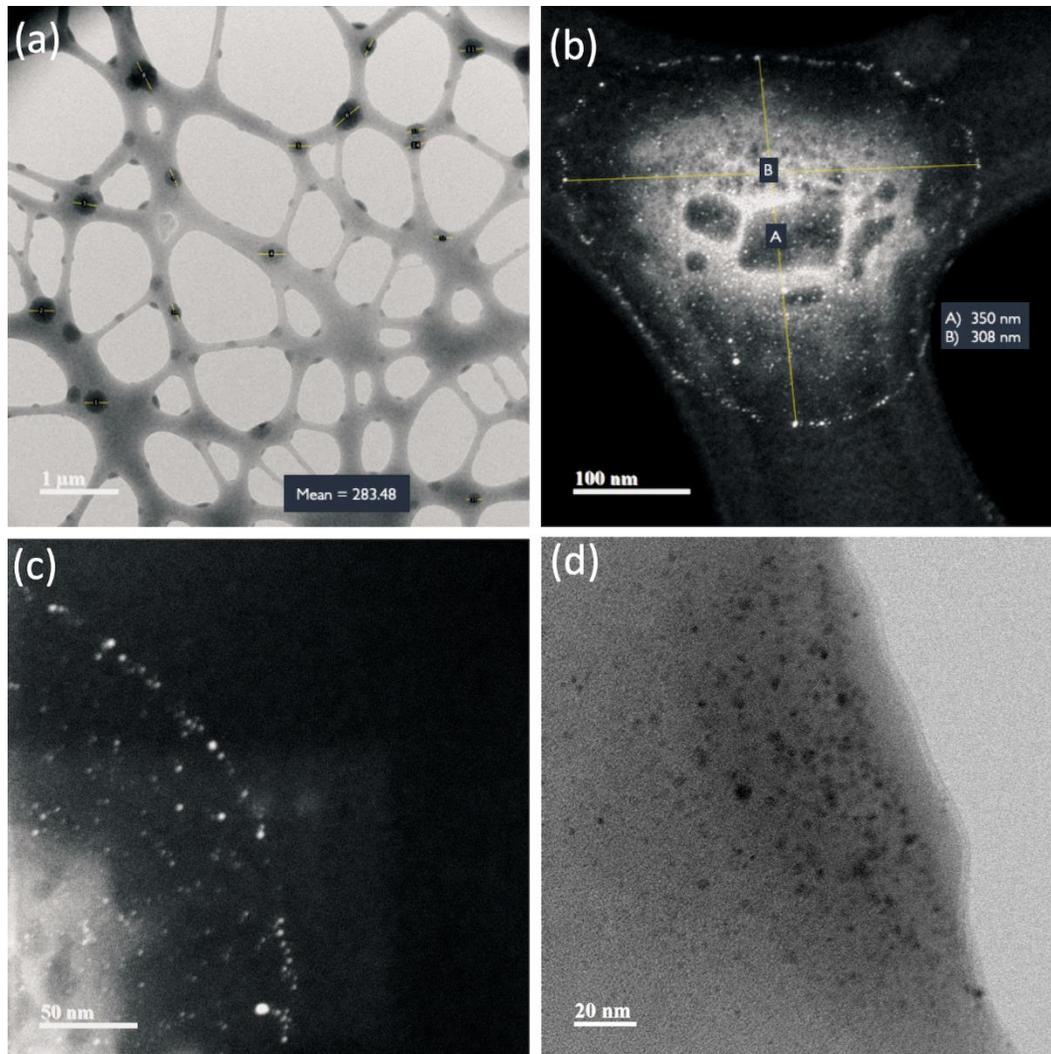


Figura 16. Imágenes representativas de TEM de pMyc:AuNPs. (a) La estructura en red de la rejilla formvar está cubierta con AuNPs cubiertas de PEG de 5 kDa y de péptidos pMyc, formando una suspensión coloidal (las AuNPs cubiertas de PEG son visibles aquí como una nebulosa). (b) La estructura coloidal depositada en la estructura de la rejilla compuesta por Myc:AuNPs. (c) Un acercamiento de la estructura coloidal de pMyc:AuNPs. (d) El núcleo magnético de las 5 nm aparece como esferas negras (el mismo núcleo magnético es observado como esferas blancas en b y c)

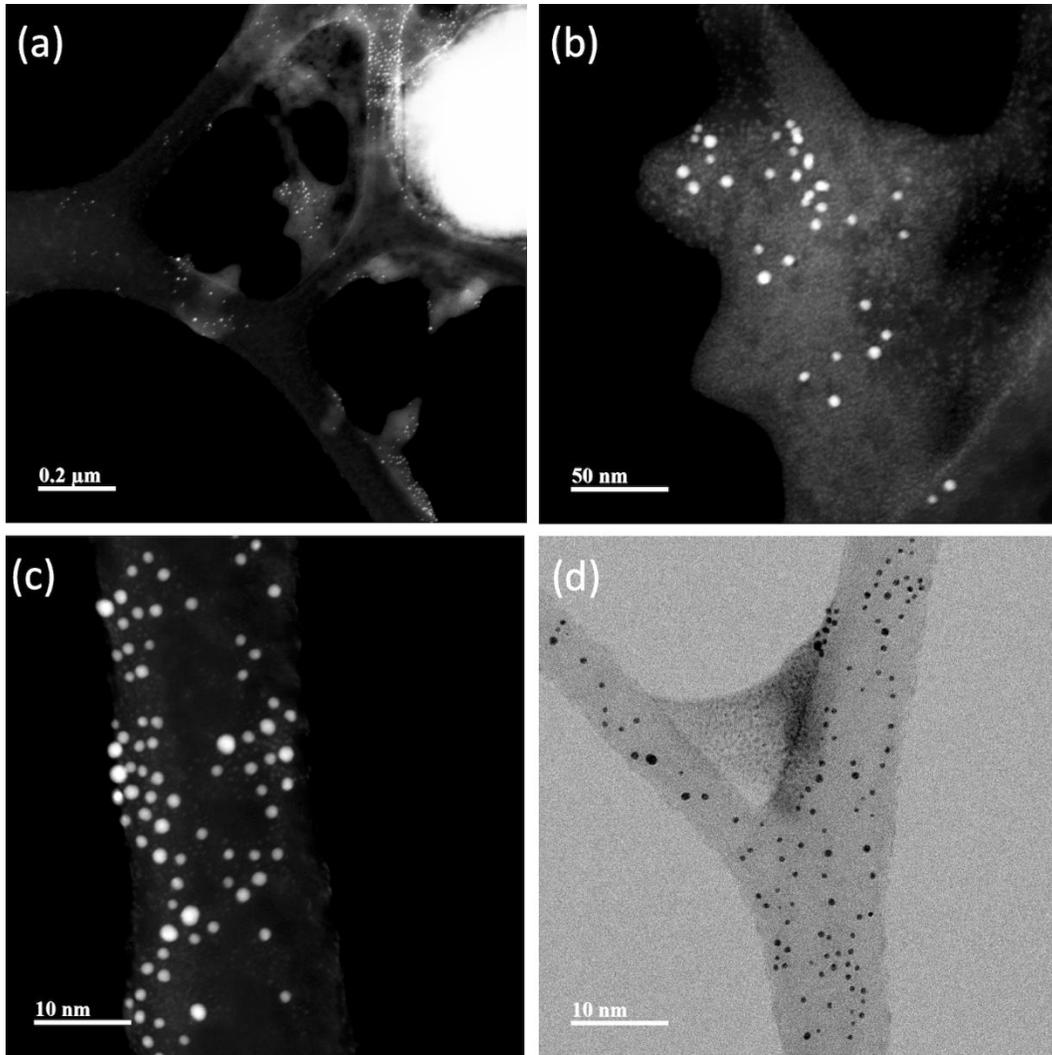


Figura 17. Imágenes representativas de TEM de pMax:AuNPs. (a) La estructura en red de la rejilla formvar está cubierta con AuNPs cubiertas de PEG de 5 kDa y de péptidos pMax, formando una suspensión coloidal (las AuNPs cubiertas de PEG son visibles aquí como una nebulosa). (b) La estructura coloidal depositada en la estructura de la rejilla compuesta por Myc:AuNPs. (c) Un acercamiento de la estructura coloidal de pMax:AuNPs. (d) El núcleo magnético de las 5 nm aparece como esferas negras (el mismo núcleo magnético es observado como esferas blancas en a-c)

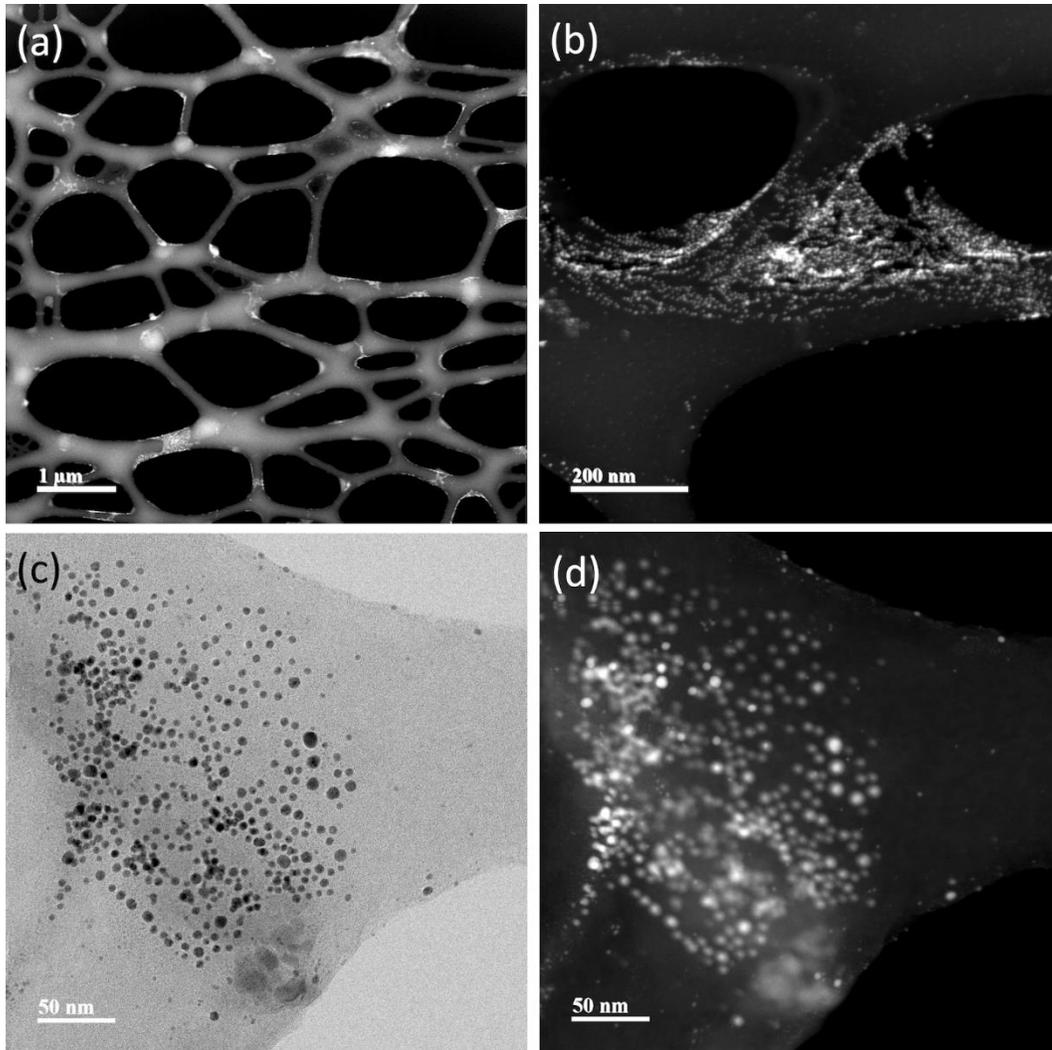


Figura 18. Imágenes representativas de TEM de pMyc:pMax:AuNPs. (a) La estructura en red de la rejilla formvar está cubierta con AuNPs cubiertas de PEG de 5 kDa y de péptidos pMyc y pMax, formando una suspensión coloidal (las AuNPs cubiertas de PEG son visibles aquí como una nebulosa). (b) La estructura coloidal depositada en la estructura de la rejilla compuesta por Myc:AuNPs. (c) Un acercamiento de la estructura coloidal de pMyc:pMax:AuNPs. (d) El núcleo magnético de las 5 nm aparece como esferas blancas (el mismo núcleo magnético es observado como esferas blancas en a,b,d)

Las imágenes de TEM muestran AuNPs esféricas cuyo diámetro oscila entre 3.28 ± 1.16 nm y los 5.78 ± 1.41 nm. De manera interesante, los HD obtenidos muestran diámetros que oscilan entre 225.04 ± 17.65 hasta 264.97 ± 4.39 nm. En contraste con los resultados obtenidos en este trabajo,

Satriano y cols. reportaron solamente un pequeño incremento en el HD de AuNPs de 12 nm a 60 nm; lo que indica mínimas diferencias entre el diámetro de sus AuNPs y el HD de su nanosistema (Satriano et al., 2018). Taha y cols. muestran resultados similares en su trabajo en donde ellos utilizaron AuNPs de 4 nm de diámetro y conjugaron el péptido TAT; obtuvieron un HD de 14 nm (Taha et al., 2019).

Las AuNPs están cubiertas por PEG de 5 kDa, lo que indica que son estabilizadas mediante un mecanismo estérico que se origina de las diferentes capas orgánicas presentes (cadenas de PEG y los péptidos). Los resultados sugieren que los nanosistemas están dispersos y no agregados debido a este mecanismo estérico de las capas orgánicas, es decir que los nanosistemas son estables de manera coloidal. El potencial zeta es ligeramente negativo en todos los nanosistemas; sin embargo, aún y cuando es relativamente bajo (entre -5 mV a -10 mV), los nanosistemas están estables de manera coloidal debido a la estabilización estérica. Los nanosistemas están dispersos en PBS; por lo tanto, el pH del nanosistema es aproximadamente 7.4. Es posible que, en diferentes valores de pH, el potencial zeta cambie a valores más negativos. Sin embargo, para aplicaciones biomédicas el nanosistema debe ser caracterizado a pH fisiológico.

Tabla 7. Resultados de la caracterización física de las AuNPs y los nanosistemas

	Diámetro(nm)	HD (nm)	PDI	Potencial zeta	Concentración de péptido ¹ (nM)
AuNPs	5.68 ± 0.84	243.03 ± 12.83	0.257 ± 0.04	-9.05 ± 6.09	0.00
pMyc:AuNPs	3.28 ± 1.16	264.97 ± 4.39	0.177 ± 0.02	-5.05 ± 3.42	163.60
pMax:AuNPs	5.60 ± 1.19	262.57 ± 23.40	0.168 ± 0.02	-7.67 ± 5.71	200.86
pMyc:pMax:AuNPs	5.78 ± 1.41	225.03 ± 17.65	0.083 ± 0.04	-10.09 ± 4.04	223.93

HD; diámetro hidrodinámico

En el 2016, Chang y cols. caracterizaron AuNPs en estados dispersos y agregados mediante UV-Vis y TEM. Sus resultados son similares a los nuestros; los espectros de UV-Vis de sus AuNPs

muestran que se mantuvo el pico FPS, mientras que las imágenes de TEM no muestran agregados (Chang et al., 2016). Los resultados de HD sugieren que los nanosistemas muestran un comportamiento coloidal (Jiang et al., 2022; Xu et al., 2022).

Tomando como base los resultados de UV-Vis, DLS y TEM mostrados en las figuras 15-18, los nanosistemas se encuentran asociados en nanocomplejos (Lu & Yin, 2012). La diferencia entre los diámetros obtenidos de las imágenes TEM y los resultados de HD obtenidos por DLS son explicadas por la formación de nanocomplejos de AuNPs. En las figuras 15-18 se puede visualizar la estructura de la malla de carbono cubierto por cobre formvar y de los nanocomplejos depositados en ellas. El análisis de la imagen de TEM sugiere la formación de estos nanocomplejos (Lu & Yin, 2012). Además, en la Figura 19 podemos observar que, a lo largo de 96 h, no existió un cambio de FPS en los nanosistemas; estos resultados sugieren que las AuNPs y los NS son estables.

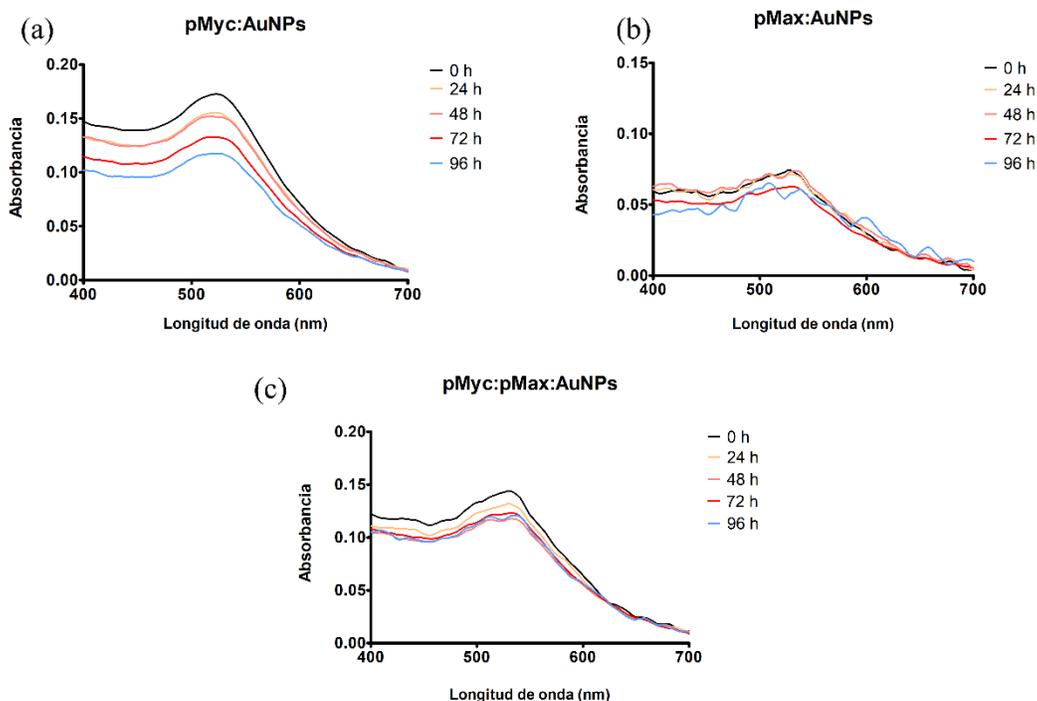


Figura 19. Espectros de absorbancia de los nanosistemas desde 0 h hasta las 96 h. (a) espectro de pMyc:AuNPs, (b) espectro de pMax:AuNPs y (c) espectro de pMyc:pMax:AuNPs.

6.5 Caracterización biológica de los nanosistemas

6.5.1 Evaluación de la hemocompatibilidad *in vitro*

Los nanosistemas fueron ajustados a tres diferentes concentraciones (5 ng/ μ L, 0.5 ng/ μ L y 0.05 ng/ μ L) basado en trabajos previos de nuestro laboratorio. Con este ensayo se evaluó la hemocompatibilidad para ver si existen interacciones inespecíficas con la membrana de los eritrocitos, lo que podría causar citotoxicidad. De acuerdo con la norma ASTM-F756-17 que regula los ensayos de las propiedades hemolítica de los materiales (International, 2017), los materiales están clasificados de la siguiente manera: materiales no hemolíticos (índice hemolítico entre 0 % y 2 %), materiales ligeramente hemolíticos (índice hemolítico entre 3 % y 5 %) y materiales

altamente hemolíticos (índice hemolítico de 5 % y mayor). Los resultados demostraron actividad hemolítica mínima para los nanosistemas en las concentraciones evaluadas; el rango de concentración de los péptidos en los nanosistemas es de 16 nM y 224 nM. Esto sugiere una potencial biocompatibilidad para ser administrado vía intravenosa y justifica continuar con estos nanosistemas. Las AuNPs en todas las concentraciones mostraron los índices hemolíticos más altos (Figura 20). Las AuNPs y pMyc:pMax:AuNPs mostraron efectos hemolíticos de manera dosis dependiente. Estos resultados indican que combinar AuNPs con los péptidos podría estar cambiando la interacción de los nanosistemas con la membrana de los eritrocitos. Todos los nanosistemas están considerados como no hemolíticos a la concentración de 0.05 ng/ μ L. En la concentración de 0.5 ng/ μ L, pMyc:pMax:AuNPs están catalogados como ligeramente hemolíticos, mientras que pMyc:AuNPs y pMax:AuNPs como materiales no hemolíticos. Finalmente, a 5 ng/ μ L, pMyc:AuNPs y pMyc:pMax:AuNPs están catalogados como ligeramente hemolíticos, mientras que pMax:AuNPs están considerados como materiales no hemolíticos.

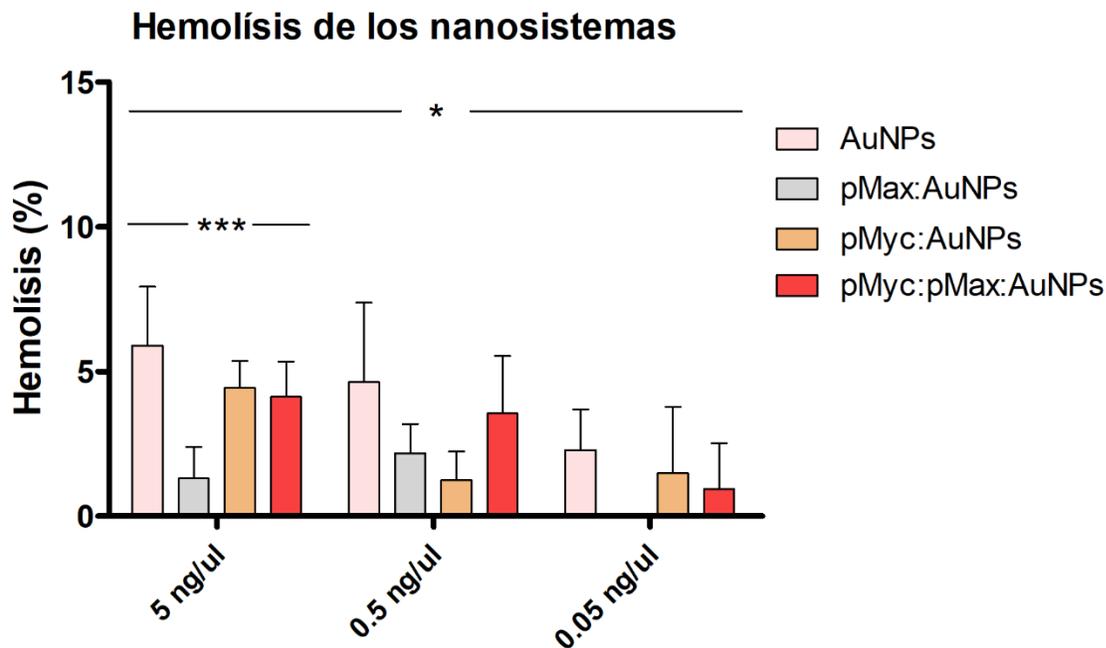


Figura 20. Propiedades hemolíticas de los nanosistemas. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Los valores hemolíticos más altos fueron obtenidos con las AuNPs a una concentración de 5 ng/ μ L con un valor de 5.89 ± 2.02 %. Los índices hemolíticos de pMyc: AuNPs (4.43 ± 0.92 %) y de pMyc:pMax: AuNPs (4.12 ± 1.22 %) en una concentración de 5 ng/ μ L, son similares a otros resultados previamente reportados con conjugados péptidos-AuNPs con valores < 10 % (Jabir et al., 2019). En 2019, Verimli y cols. obtuvieron valores hemolíticos < 1 % para sus conjugados de AuNPs con péptidos apoptóticos (RLLLRIGRRNH₂) en una concentración en nanomolar (Verimli et al., 2019).

Por otro lado, existen trabajos que han reportado índices por encima del 20 %. Sin embargo, esto puede deberse principalmente al amplio rango de concentraciones utilizados en sus ensayos que, generalmente, fueron mayores a las nuestras (Akrami et al., 2016; Singh et al., 2020). Hacer comparativas directas de los índices de hemólisis es complejo debido al amplio rango de materiales

y concentraciones que pueden ser utilizados para estos ensayos. Los nanocomplejos evaluados en este trabajo tuvieron un índice de hemólisis menor a 5 %, mostrando que estas concentraciones no perturban la membrana de los eritrocitos de manera sustancial.

6.5.2 Evaluación de la citotoxicidad in vitro de los nanosistemas

Los péptidos pMyc:pMax no conjugados a AuNPs no mostraron un efecto significativo en las líneas celulares (Figura 21) en las 3 concentraciones evaluadas (5 ng/μL, 0.5 ng/μL y 0.05 ng/μL); el mayor efecto citotóxico fue de 3 %. Con base en los resultados anteriores, un posible tratamiento únicamente con los péptidos pMyc:pMax resultaría en una terapia no efectiva. Sin embargo, las AuNPs y los NS pMax:AuNPs, pMyc:AuNPs y pMyc:pMax:AuNPs tuvieron un efecto citotóxico sustancial en las líneas celulares evaluadas.

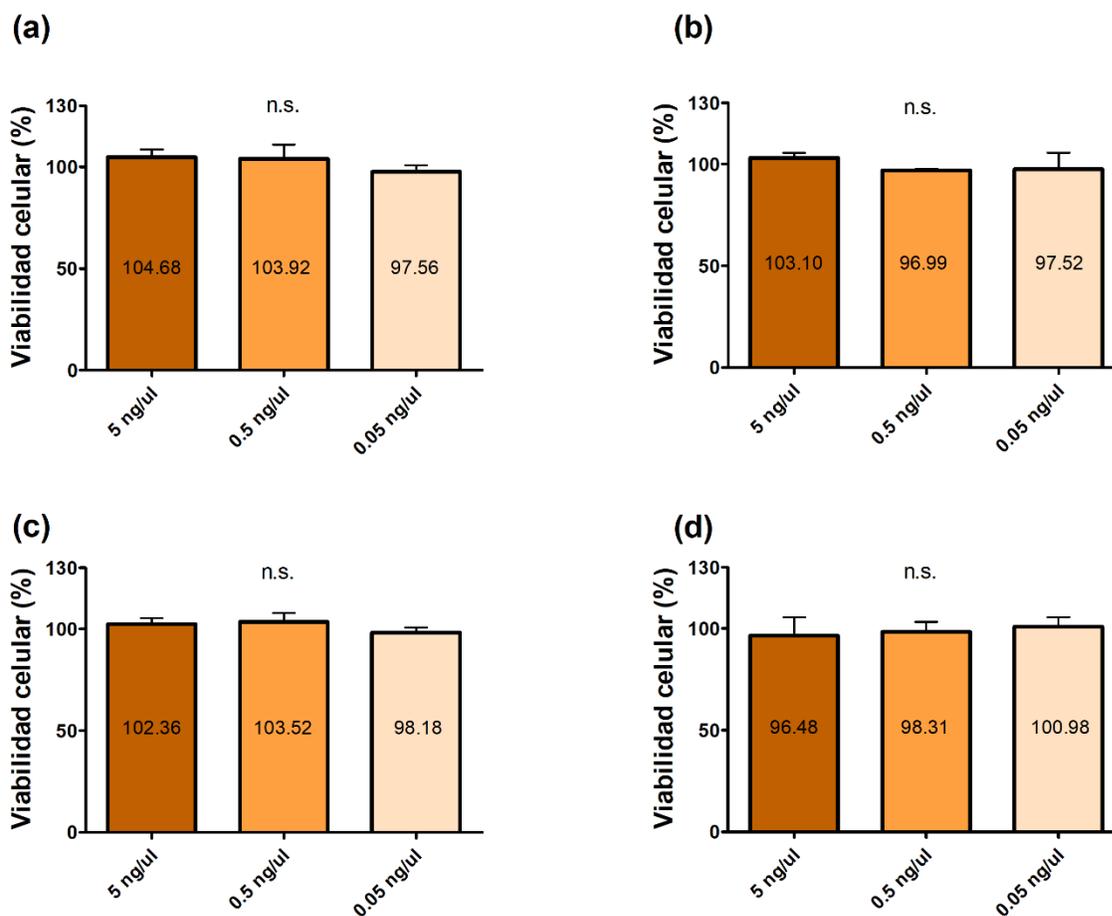


Figura 21. Viabilidad celular únicamente con los péptidos en las diferentes líneas celulares. (a) Vero CCL-81, (b) LNCaP, (c) PC-3, (d) DU 145. n.s., no significativo.

La citotoxicidad de AuNPs, pMax:AuNPs y pMyc:AuNPs en Vero CCL-81 fue evidente (Figura 22a). La viabilidad fue reducida a 65 ± 5.02 % utilizando $5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ de AuNPs. pMax:AuNPs redujeron la viabilidad a 77.63 ± 1.63 %, mientras que pMyc:AuNPs la redujeron a 63.06 ± 8.12 % en la misma concentración. Por otro lado, pMyc:pMax:AuNPs tuvo un efecto citotóxico mínimo al reducir la viabilidad a 95.89 ± 7.73 % a $5 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

Como lo discutió Sani y col.s en 2021, existen resultados variables de AuNPs en células Vero, que dependen de la bioactividad de las moléculas conjugadas a las AuNPs (Sani et al., 2021). Debido

a esta bioactividad de las moléculas conjugadas, existen estudios donde se muestra una citotoxicidad (Chuang et al., 2013; Chueh et al., 2014), mientras que en otros las AuNPs no muestran citotoxicidad significativa. El tamaño y la carga de AuNPs afectan de manera significativa la citotoxicidad en las células Vero (Cho et al., 2014; Venkatpurwar et al., 2012).

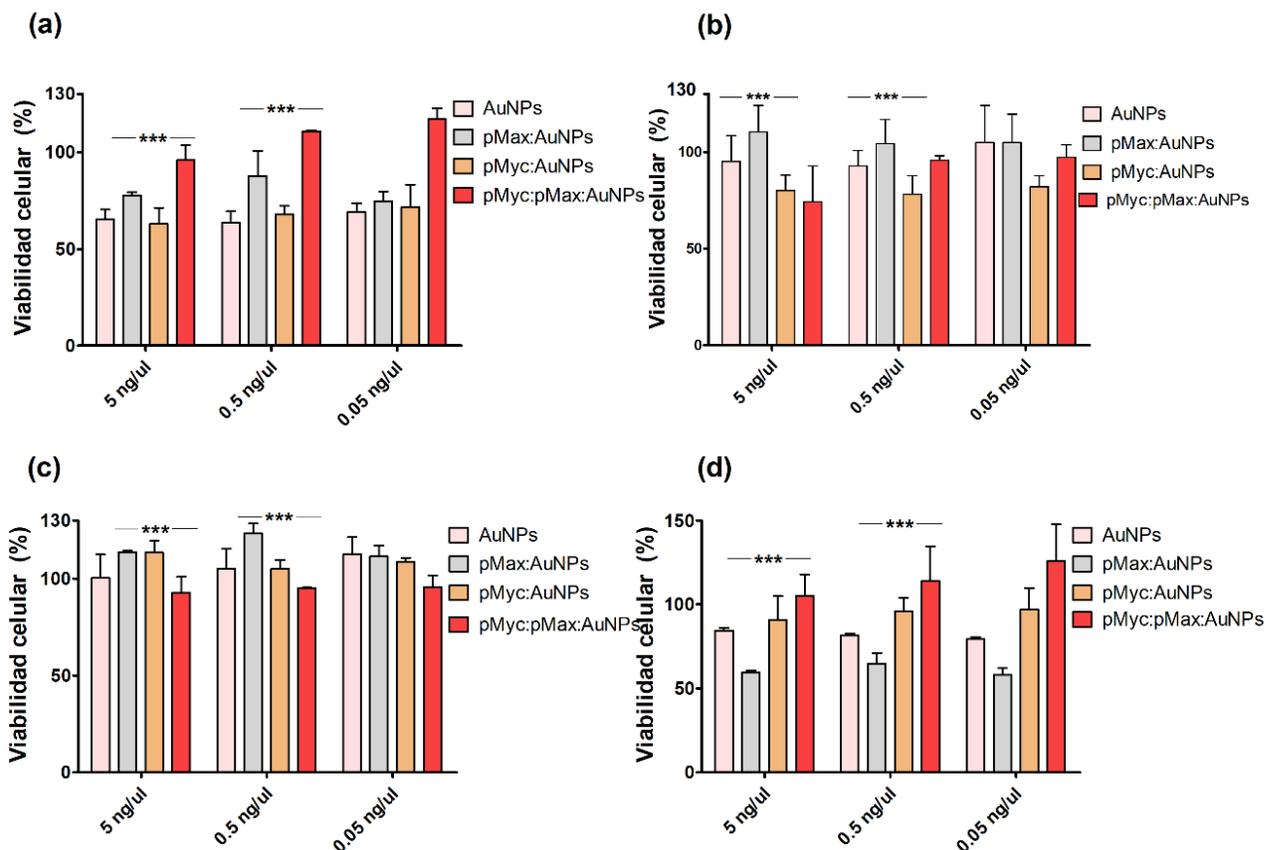


Figura 22. Viabilidad celular con los diferentes nanosistemas en las cuatro líneas celulares. (a) Vero CCI-81, (b) LNCaP, (c) PC-3, (d) DU145. *** p < 0.001.

En nuestro trabajo, esperábamos una mayor sensibilidad de las células LNCaP a pMyc:AuNPs y pMyc:pMax:AuNPs de acuerdo con los datos de la Tabla 8 debido a la mayor cantidad de lecturas normalizadas por millón de Myc (nRPM). Inhibir estos niveles oncogénicos de Myc debería tener un mayor efecto en la proliferación celular, como se muestra en los resultados.

Tabla 8. Niveles de mRNA y proteína de Myc y Max en las células utilizadas

Línea celular	Myc mRNA (nRPM)	Max mRNA (nRPM)	Expresión relativa de proteína Myc ^(a)	Expresión relativa de proteína Max ^(a)	Expresión relativa Myc/Max ^(a)
PC-3	256.91	502.38	0.63	1.51	0.42
DU145	ND	ND	0.00	0.08	0.00
LNCaP Clone FGC	1548.99	315.14	0.96	0.33	2.95
Vero CCL-81	ND	ND	ND	ND	ND

nRPM, lecturas normalizadas por cada millón; ND, datos no disponibles. (a) Perfil cuantitativo de miles de proteínas mediante espectrometría de masas a través de 375 líneas celulares del Laboratorio de Proteómica Gygi (Nusinow et al., 2020)

Los resultados de los ensayos de viabilidad celular mostraron que en las células LNCaP (Figura 22b), el efecto citotóxico más significativo fue a 5 ng/μL con el nanosistema pMyc:AuNPs, disminuyendo la viabilidad 79.98 ± 8.00 %. pMyc:pMax:AuNPs redujo la viabilidad a 84.41 ± 7.31 %. Utilizando diversos compuestos que interrumpían la dimerización pMyc:pMax, Carabet y cols. en 2018 redujeron la viabilidad celular de células LNCaP a < 20 %. En 2022, Holmes y cols. utilizaron una pequeña molécula inhibidora de Myc (MYCi975) para reducir la viabilidad a 28.4 %. Los ensayos tanto de Carabet y Holmes involucraron tratamientos en el orden de micromolar (Carabet et al., 2018; Holmes et al., 2022).

En cuanto a las células PC-3, los resultados mostraron muy poca citotoxicidad (figura 22c). Sin embargo, pMyc:pMax:AuNPs fue el único NS con un efecto citotóxico, disminuyendo la viabilidad celular a 92.9 ± 8.10 % a 5 ng/μL. De manera interesante, PC-3 tiene mayor cantidad de nRPM de Max (502.38) comparado con el nRPM de Myc (256.91), de acuerdo con el portal DepMap (Tabla 8). Estos resultados pueden sugerir la resistencia a una proliferación guiada por Myc debido a una mayor cantidad de proteínas Max en estas células.

En células DU145 (figura 20d), tanto AuNPs y pMyc:AuNPs tuvieron efectos citotóxicos significativos; las AuNPs redujeron la viabilidad celular a 84.97 ± 2.04 %, mientras que

pMyc:AuNPs los redujeron a 82.98 ± 1.42 % a una concentración de 5 ng/ μ L. Sin embargo, un efecto citotóxico significativo fue logrado con pMax:AuNPs al disminuir la viabilidad celular a 59.84 ± 1.38 %. En 2004, Cassinelli y cols. mostraron que las células DU145 tenían una menor cantidad de proteína Myc que las PC-3 (Cassinelli et al., 2004). En 2010, Kim y cols. determinaron que los niveles de expresión de Myc en DU145 es similar a los niveles de expresión en LNCaP (Kim et al., 2010). Estos reportes muestran la complejidad de la dinámica molecular de Myc y Max en diferentes líneas celulares. Sin embargo, es esencial notar que los resultados presentados por Kim y cols. fueron obtenidos cualitativamente a través de Western blot. Además, los datos de DepMap muestran una relativamente baja expresión de proteína Myc (Tabla 8); esto puede sugerir que pMax:AuNPs agotan los niveles de proteína de Myc existente en estas células y ejercen su efecto citotóxico de esta manera.

En la Tabla 9 se encuentran los resultados de la caracterización física con los resultados de viabilidad celular; es posible hacer la comparación entre ambas características. Tanto las AuNPs y los nanosistemas tienen diámetros, HD y potenciales z similares; estos resultados sugieren que la diferencia en la citotoxicidad es debido a los péptidos que están conjugados a las AuNPs.

Tabla 9. Comparativa entre características físicas de los nanosistemas con la citotoxicidad más alta mostrada en las diferentes líneas celulares.

	HD (nm)	Potencial zeta	Péptidos (nM)	C.T. Vero CCL81 (%)	C.T. LNCAP (%)	C.T. PC-3 (%)	C.T. DU145 (%)
AuNPs	243.03 ± 12.83	-9.05 ± 6.09	0.00	36.32	2.18	0	20.43
pMyc:AuNPs	264.97 ± 4.39	-5.05 ± 3.42	163.60	36.94	13.27	0	16.4
pMax:AuNPs	262.57 ± 23.40	-7.67 ± 5.71	200.86	25.43	0	0	43.01
pMyc:pMax:AuNPs	225.03 ± 17.65	-10.09 ± 4.04	223.93	4.11	17.75	7.1	0

HD, diámetro hidrodinámico; C.T., citotoxicidad.

Como se muestra en la Figura 21, los péptidos por sí mismos no muestran citotoxicidad hacia ninguna de las líneas celulares empleadas; sin embargo, una vez que han sido conjugados a las AuNPs, éstos muestran diferentes niveles de citotoxicidad dependiendo del linaje celular evaluado. Los resultados de citotoxicidad, así como los de transcriptómica obtenidos posteriormente, sugieren que los nanosistemas fueron internalizados mediante uno de los siguientes mecanismos: macropinocitosis, el modelo de barril o el modelo tipo alfombra (Bechara & Sagan, 2013; Böhmová et al., 2018; Huang & García, 2013; Islam et al., 2014; Longoria-García et al., 2022; Manzanares et al., 2020). Los mecanismos de macropinocitosis y el modelo de alfombra son los más probables debido al alto HD de los nanocomplejos, esto debido a que se ha determinado que es la vía de endocitosis más común para nanoestructuras de grande tamaño (Manzanares et al., 2020). Basado en la literatura, los mecanismos de internalización hipotéticos de estos nanosistemas se muestran en la Figura 23.

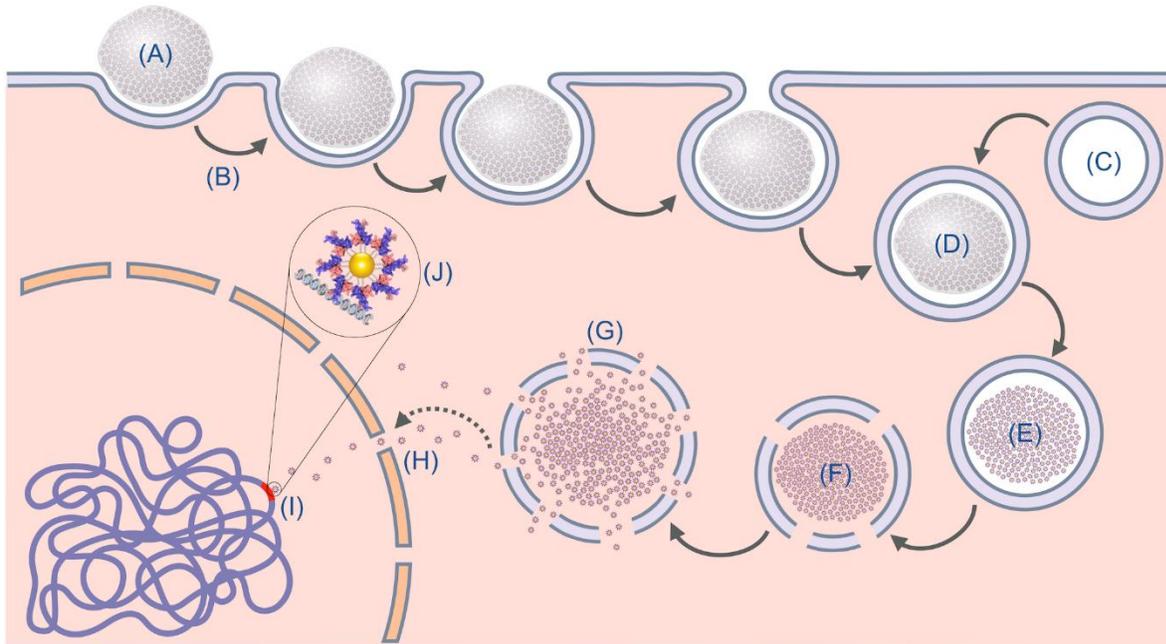


Figura 23. Esquema de macropinocitosis del mecanismo de internalización de los nanocomplejos. (A) Nanocomplejo, (B) Macropinocitosis, (C) Lisosoma, (D) Endosoma temprano, (E) Endosoma tardío, (F) Lisosomas de especies reactivas de oxígeno, (G) Liberación del nanosistema, (H) Transporte nuclear, (I) Interacción del nanosistema con el ADN, (J) Acercamiento de la interacción teórica entre el nanosistema con el ADN.

6.6 Perfil transcriptómico de DU145 tratadas con los nanosistemas

A partir de esta sección se prestará atención a los resultados de RNA-Seq de las células DU145 control, las tratadas con pMax:AuNPs y las tratadas con AuNPs debido a la citotoxicidad obtenida y para poder determinar el efecto asociado a únicamente pMax. En la Figura 24 se muestran los resultados de la distribución de las lecturas obtenidas a lo largo del genoma de referencia.

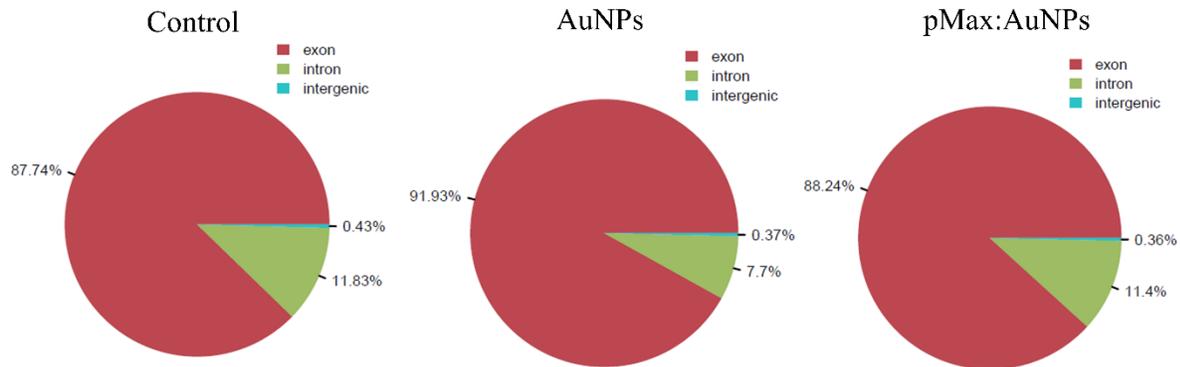


Figura 24. Distribución de las lecturas obtenidas de la secuenciación para las células control, células tratadas con AuNPs y células tratadas con pMax:AuNPs.

La mayor parte de las lecturas obtenidas mostraron pertenecer a exones del genoma de referencia con valores arriba del 87 %. Algunas lecturas obtenidas pertenecen a intrones con valores de hasta casi el 12 % mientras que un porcentaje menor a 0.44 % de las lecturas alinearon contra regiones intergénicas del genoma. Este efecto ha sido visto y discutido por otros investigadores; está atribuido a los fenómenos de splicing alternativo y retención de intrones (Agostini et al., 2021; Zheng et al., 2020). Esto mismo se puede visualizar en la Figura 25 donde podemos apreciar las comparativas entre diferentes iteraciones tanto de genes como de transcritos diferencialmente expresados. El máximo número de genes con sobreexpresión fue de 225 y de subexpresión fue de 71; mientras tanto, existe una diferencia sustancial contra el número de transcritos diferencialmente expresados. El mayor número de transcritos con sobreexpresión fue de 1,336 mientras que el mayor con subexpresión fue 1,430.

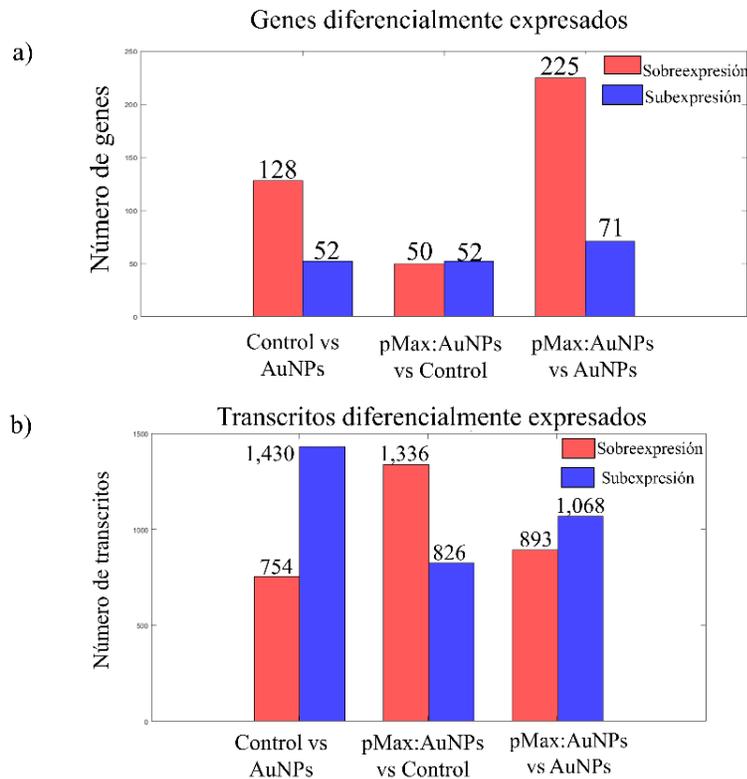


Figura 25. Resultados de expresión diferencial. a) número de genes diferencialmente expresados en las 3 iteraciones comparativas y b) número de transcritos diferencialmente expresados en las 3 iteraciones comparativas.

6.7 Comparación del perfil transcripcional de células DU145

Para determinar el efecto asociado a únicamente pMax, se realizaron 3 diferentes comparativas: AuNPs vs Control, pMax:AuNPs vs Control y pMax:AuNPs vs AuNPs. La Figura 26 muestra los mapas de calor de la expresión diferencial en las diferentes comparativas. Se puede apreciar que existen diferencias en la expresión de distintos genes entre los tratamientos y el control.

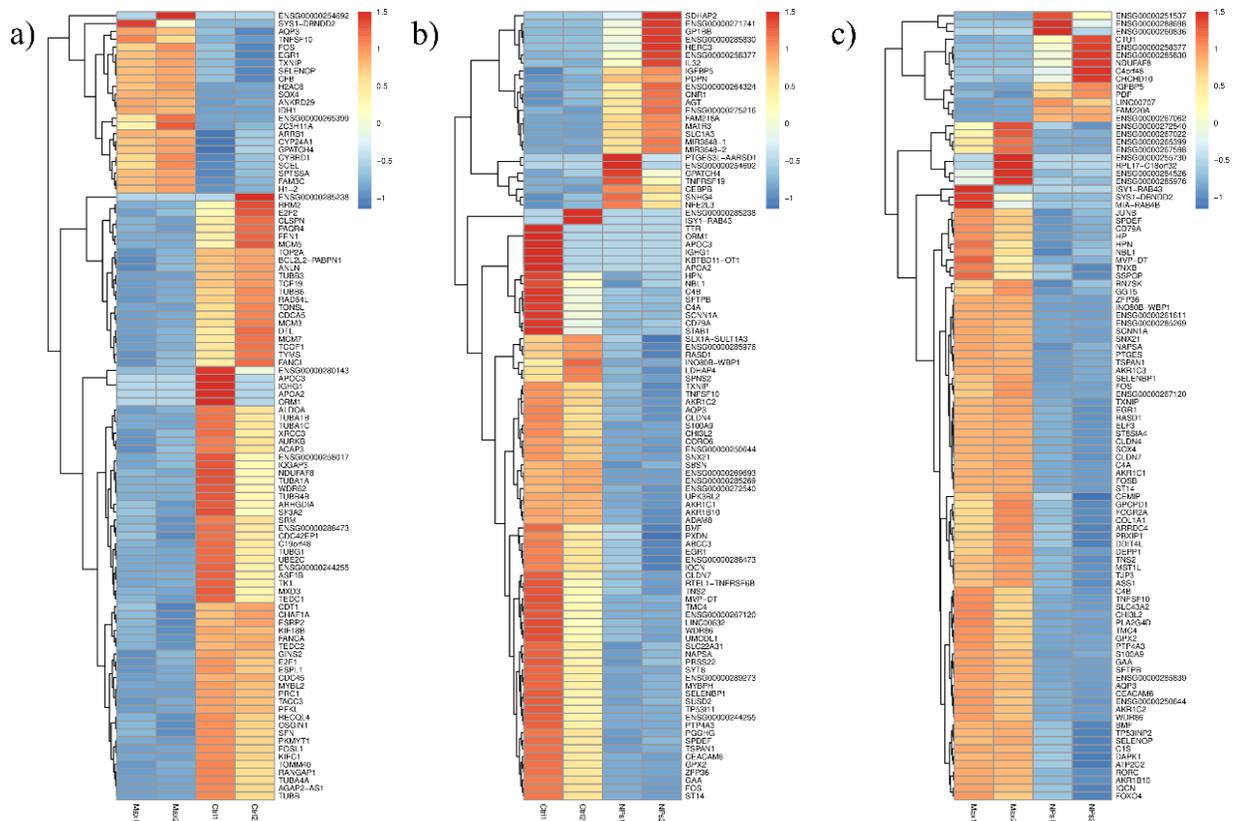


Figura 26. Mapas de calor mostrando la expresión génica diferencial en a) pMax:AuNPs vs Control, b) Control vs AuNPs y c) pMax:AuNPs vs AuNPs.

No solo existieron diferencias en genes individuales, sino también en términos ontológicos específicos a genes. Algunos de los términos ontológicos más relevantes en la comparativa entre pMax:AuNPs y control fueron: Ciclo celular mitótico, regulación del complejo transcripcional de la RNA polimerasa III, inicio de la replicación del ADN, replicación del ADN y estímulo xenobiótico. Por otro lado, algunos términos ontológicos más significativos para la comparativa entre pMax:AuNPs y AuNPs fueron: región extracelular, espacio extracelular, proceso metabólico de la daunorrubicina, proceso metabólico de la doxorrubicina, respuesta celular a estímulo por ácido jasmónico y regulación positiva de la muerte celular. Estos resultados se pueden apreciar en las Figuras 27 y 28.

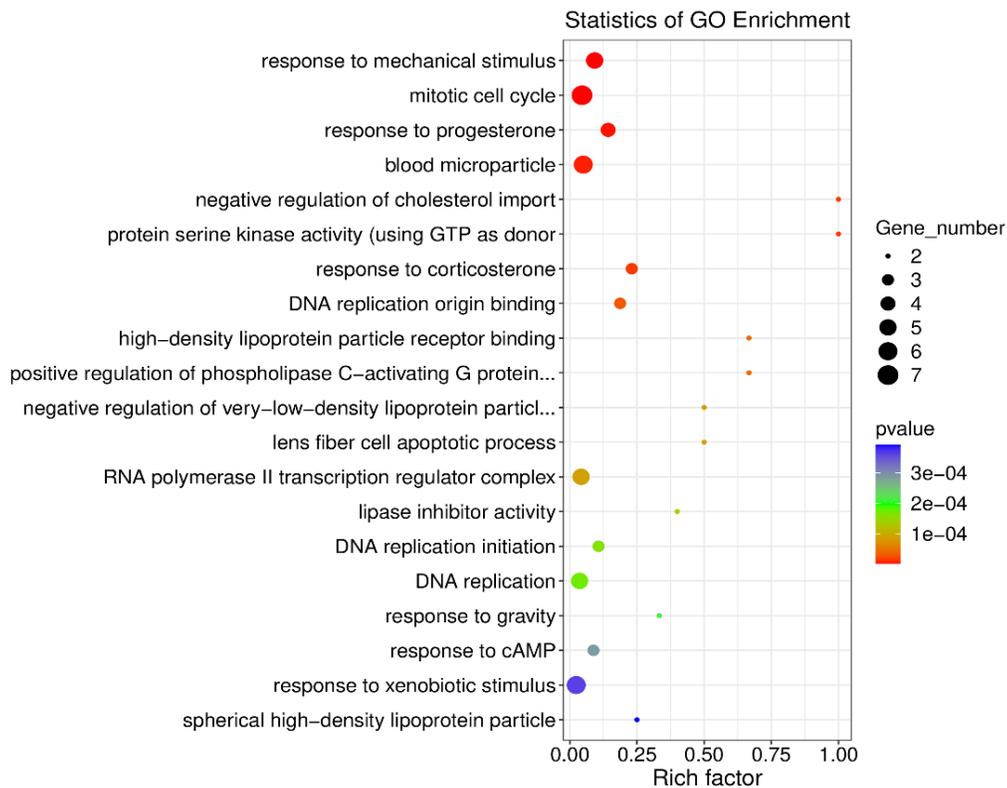


Figura 27. Términos ontológicos más significativos en pMax:AuNPs vs Control.

Estos resultados sugieren que existe un efecto asociado únicamente al pMax. Aunado a lo anterior es importante mencionar que, si bien en este trabajo no se incluyó un tratamiento quimioterapéutico, se están modulando genes relacionados con algunos fármacos de esta índole como la daunorrubicina y la doxorrubicina.

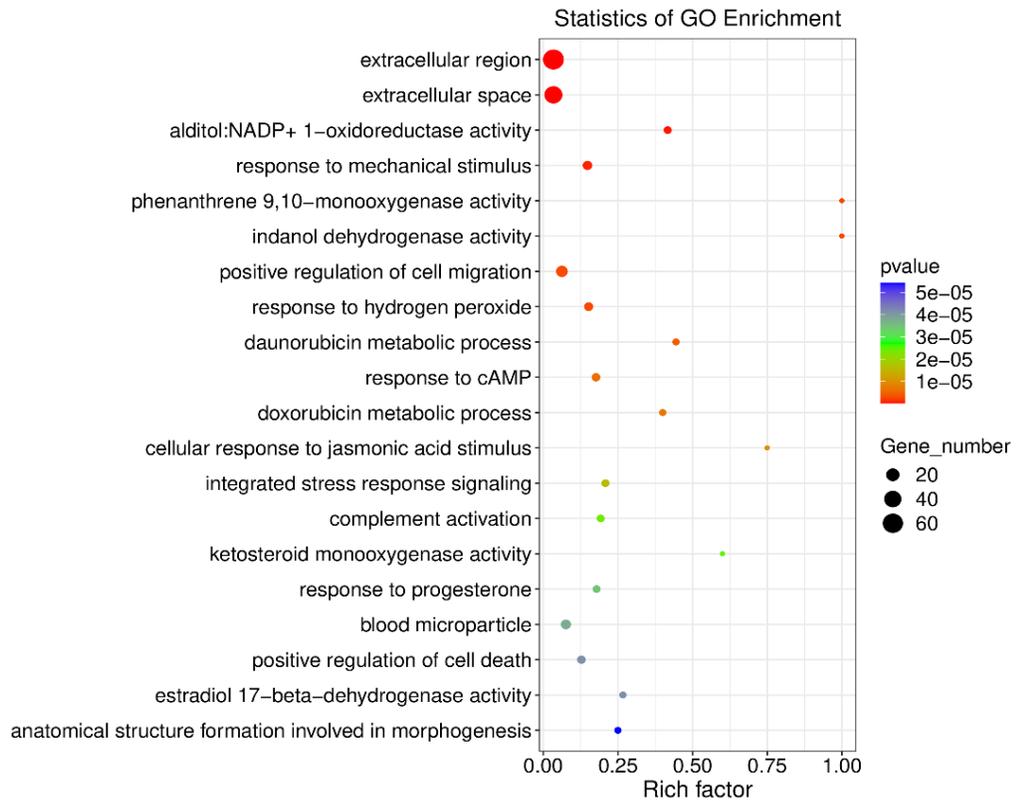


Figura 28. Términos ontológicos más significativos en pMax:AuNPs vs AuNPs.

Aunado a lo anterior, no solamente genes o términos ontológicos se encuentran modulados de manera significativa debido al tratamiento de las células ya sea con AuNPs o pMax:AuNPs. También existen modulaciones de programas transcripcionales completos, en la Figura 29 se muestran de manera representativa algunas de las gráficas obtenidas del GSEA.

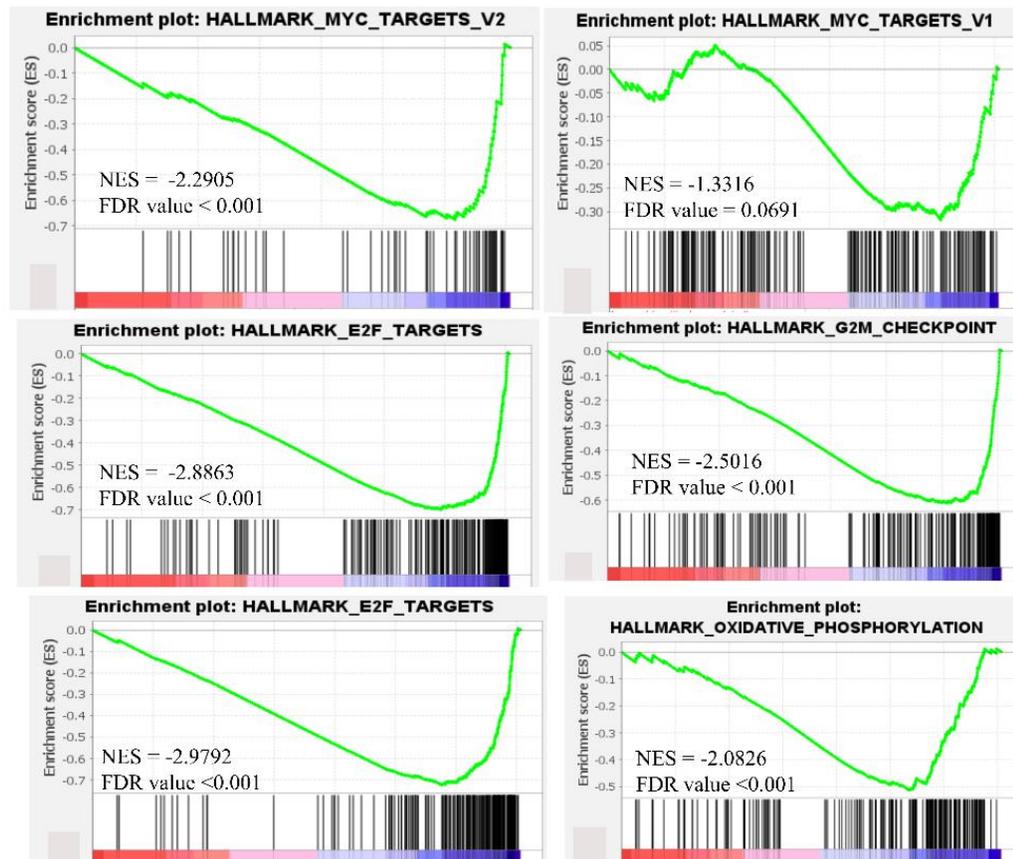


Figura 29. Gráficas representativas de GSEA de programas transcripcionales modulados a la baja por el tratamiento de pMax:AuNPs en células DU145.

Sin embargo, los programas transcripcionales modulados con mayor significancia se muestran en la Tabla 10 y en la Tabla 11. Debido a que los péptidos carecen de dominios de transactivación, así como la naturaleza de la red de interacción de Myc, Max, y las proteínas de la familia de las MXD, era de esperarse que existiera una menor cantidad de programas transcripcionales regulados al alza.

Tabla 10. Programas transcripcionales más significativos regulados a la baja por el tratamiento con pMax:AuNPs en células DU145.

Conjunto de genes significativos	pMax:AuNPs vs Control (NES)	pMax:AuNPs vs AuNPs (NES)
Blancos de Myc V1	-2.2905	-2.8032
Blancos de Myc V2	-1.3316	-2.2989
Blancos de E2F	-2.8863	-2.9792
Puntos de revisión de G2M	-2.5016	-2.7401
Reparación de ADN	-1.4667	-1.6465
Huso mitótico	-1.7571	-1.7796
Señalización MTORC1	N/A	-1.8300
Fosforilación oxidativa	N/A	-2.0826
Transición epitelial mesenquimal	N/A	-1.3393
Angiogénesis	N/A	-1.1919

N/A, no aplica; NES, Puntaje de enriquecimiento normalizado.

Tabla 11. Programas transcripcionales más significativos regulados al alza por el tratamiento con pMax:AuNPs en células DU145.

Conjunto de genes significativos	pMax:AuNPs vs Control (NES)	pMax:AuNPs vs AuNPs (NES)
Respuesta inflamatoria aguda	1.1515	1.9264
Activación del complemento	1.1545	2.3653
Expresión de genes inducidos por IFN	N/A	2.1168
Regulación positiva de la producción de factor de necrosis tumoral	N/A	1.8383

N/A, no aplica; NES, Puntaje de enriquecimiento normalizado

Es posible determinar que existen programas transcripcionales regulados a la baja asociados únicamente a pMax. Los programas transcripcionales de Señalización de MTORC1, Fosforilación oxidativa, Transición epitelial mesenquimal y Angiogénesis están asociados a proliferación celular y tumoral, por lo que los resultados sugieren que pMax tiene un efecto antiproliferativo, ya que estos programas no se vieron significativos en la comparativa pMax:AuNPs vs Control. Mientras tanto el NS completo modula programas de progresión de ciclo celular, reparación de ADN y estabilidad de huso mitótico. Por otro lado, los resultados de GSEA de programas transcripcionales regulados al alza indican que los programas de Expresión de genes inducidos por IFN y de

Regulación positiva de la producción de factor de necrosis tumoral están asociados únicamente al pMax y no a las AuNPs.

6.8 Firma transcriptómica de pMax

Finalmente utilizando la herramienta de ToppGene se obtuvieron las firmas transcriptómicas a la baja y al alza de los 10 genes más significativos. En la Tabla 12 y Tabla 13 aparece la firma transcriptómica de pMax:AuNPs asociada únicamente a pMax tanto a la baja como al alza.

Tabla 12. Firma transcriptómica de los 10 genes más significativos modulados a la baja en células DU145 tratadas con pMax:AuNP.

Gen	Término(s) ontológico(s)
UQR10	Oxidoreducción, fosforilación oxidativa
RPL26	Componente estructural del ribosoma, actividad molecular estructural
MT-C03	Actividad oxidoreductasa, actividad de transportador transmembranal primario
MT-ND4	Fosforilación oxidativa, síntesis de ATP guiado por protones
GAPDH	Actividad oxidoreductasa, traducción
TMSB10	Ensamblado de complejos que contienen proteínas
RPL41	Componente estructural del ribosoma, traducción citoplasmática
S100A6	Envoltura de organelo, envoltura
MIF	Actividad isomerasa, oxidoreductasa intramolecular
MT-TE	Actividad de adaptador al triplete de codones aminoacídicos, traducción

Los genes presentes en la firma transcriptómica a la baja están asociados a procesos de fosforilación oxidativa y de estructura y función ribosomal. Estos resultados sugieren que pMax disminuye la habilidad de las células DU145 de producir ATP y proteínas. Por otro lado, los términos ontológicos asociados a los genes de la firma transcriptómica al alza están asociados con procesos regulación de la muerte celular y de metástasis, por lo que los resultados sugieren que pMax reduce de estas dos maneras la proliferación celular.

Tabla 13. Firma transcriptómica de los 10 genes más significativos modulados al alza en células DU145 tratadas con pMax:AuNPs.

Gen	Término(s) ontológico(s)
PSAP	Cascada de MAPK, respuesta a estrés oxidativo
TGM2	Adhesión celular, regulación de la muerte celular programada
H1-0	Regulación positiva de la función molecular, respuesta celular a estímulo
LPCAT1	Regulación negativa del proceso metabólico del fosfato, lisosoma primario
AQP3	Respuesta celular a hipoxia, regulación de proceso del sistema inmune
CTSB	Regulación de la muerte celular programada, regulación del proceso apoptótico
CDH3	Adhesión celular, señalización de la vía Wnt
SPINT2	Regulación de la motilidad celular, regulación negativa de la proliferación celular
DDIT4	Respuesta a lípidos, adhesiones focales
B4Galt1	Adhesión celular, regulación de la muerte celular programada

7. Discusión

La metodología utilizada en este proyecto para el diseño y simulación de la estabilidad térmica de pMyc y pMax ya ha sido empleada por otros investigadores obteniendo predicciones altamente estables que corroboraron mediante simulaciones de dinámica molecular (Mohammad et al., 2021). El dímero de proteínas nativas Myc:Max tiene su temperatura óptima de dimerización a los 37 °C, sin embargo la desnaturalización de ambas proteínas inicia a partir de los 38 °C (Lavigne et al., 1998); por otro lado pMyc, pMax como pMyc:pMax mostraron una estabilidad térmica predicha de hasta 75 °C. Una mayor estabilidad térmica en péptidos y proteínas es una ventaja de interés para aplicaciones biomédicas.

Otros investigadores han utilizado a Myc y Max en ensayos EMSA, sin embargo, ellos se ven forzados a utilizar anticuerpos por lo que la comparación con nuestros resultados no es tan directa. Aún con lo anterior, cabe destacar que ya se han realizado una amplia gama de EMSA evaluando la interacción Myc:ADN, Max:ADN y Myc:Max:ADN (Yang et al., 2012). Los resultados EMSA de este trabajo muestran un claro retraso en el corrimiento electroforético, por lo que se sugiere la interacción entre pMyc:pMax con las CME de los oligonucleótidos.

Los resultados de cambios batocrómicos en las AuNPs sugieren la conjugación exitosa de los péptidos hacia las nanopartículas; este fenómeno ya ha sido descrito por otros investigadores que conjugaron AuNPs con tetrafurano y realizaron una caracterización completa con UV-Vis, además de algunas propiedades electrónicas (Cirri et al., 2015). Los resultados de TEM y DLS la formación de nanocomplejos de alrededor de 250 nm, por lo que la macropinocitosis es el mecanismo propuesto para la internalización celular y éste ya ha sido confirmado para AuNPs (Srijampa et al., 2019).

Los resultados de viabilidad celular obtenidos en este trabajo demuestran claramente los retos del trabajo con una estrategia terapéutica contra el cáncer a nivel genómico. La heterogeneidad de las células de un mismo tipo de cáncer puede desembocar en resultados contradictorios e inclusive con potencial para aumentar la proliferación celular. Tales son los casos de pMax:AuNPs en LNCaP y en PC-3 y pMyc:pMax:AuNPs en DU145. Existen reportes donde tratamientos terapéuticos *in vitro* contra células cancerosas resulta contraproducente y aumenta la viabilidad celular (Montrose et al., 2014; Swedberg et al., 2018). De manera interesante, el Omomyc también ha presentado resultados en donde aumenta la viabilidad celular en células Ramos de Linfoma de Burkitt hasta un 25 %, mientras no tiene efecto alguno en células HDMYZ de Linfoma de Hodgkin manteniendo una viabilidad celular de alrededor del 100 % (Demma et al., 2020). Para que este tipo de estrategias pueda llegar a la clínica, es imperativo poder determinar si el tratamiento será efectivo contra el tipo de células cancerosas que sean las más prevalentes en el paciente. Los resultados del ensayo clínico fase I de Omomyc demuestran la seguridad del péptido; sin embargo, de los 19 participantes del estudio solamente en 1 se tuvo una reducción del volumen tumoral, en 12 se logró la estabilización de la enfermedad, mientras que en el resto la enfermedad progresó. Si bien no es precisamente el objetivo del estudio, nos da una panorámica de los retos a los que se enfrentará el equipo de trabajo del Omomyc en el estudio clínico fase II que se encuentra en reclutamiento al momento de la escritura de este documento (Garralda et al., 2024).

Por otro lado, pMax:AuNPs mostró resultados promisorios en DU145; de manera específica resultados asociados únicamente a pMax. Existieron diferencias transcripcionales en las células comparando los tratamientos con el NS completo contra las AuNPs sin péptidos conjugados. De manera global los términos ontológicos asociados a pMax involucran respuesta a mecanismos asociados a la muerte celular y evitar la proliferación celular. Algunos de ellos son regulación

positiva de la muerte celular, metabolismo de la daunorrubicina y de la doxorubicina. Si bien el tratamiento terapéutico estándar para el CaP es el docetaxel, ya existen reportes en donde se han obtenido resultados promisorios utilizando doxorubicina (Shu et al., 2018). Inclusive se han utilizado NS para la entrega mejorada de doxorubicina *in vitro* (Pearce et al., 2017; Wadajkar et al., 2013). Estos resultados sugieren que una terapia combinada de doxorubicina o daunorrubicina con pMax:AuNPs pudiera sensibilizar las células hacia el fármaco, teniendo un mayor efecto terapéutico. Sin embargo, se requieren más ensayos para poder determinar esto.

Los resultados de GSEA sugieren que se está haciendo la modulación transcripcional de los genes blanco de Myc. Los programas transcripcionales modulados a la baja están relacionados con la replicación del AD y progresión del ciclo celular. Mientras tanto los programas transcripcionales modulados a la baja asociados a pMax involucran programas de proliferación celular. Estos mismos programas transcripcionales han sido modulados por Omomyc en células de melanoma (Zacaría-Fluck et al., 2023), por lo que la evidencia sugiere que pMax:AuNPs pudiera tener un efecto terapéutico en otros tipos de cáncer. Aunado a lo anterior, los NES son muy similares a los reportado para Omomyc por lo que se esperaría tener resultados similares.

Por último, los genes en la firma transcripcional a la baja presentan términos ontológicos de oxidorreducción, fosforilación oxidativa, traducción y ribosoma. Estos resultados sugieren que uno de los mecanismos de reducción de viabilidad celular es mediante la interrupción de la producción de ATP y de proteína. Por otro lado, los genes en la firma transcripcional al alza presentan términos ontológicos de regulación de muerte y adhesión celular. Lo que sugiere que pMax reduce la proliferación celular y metástasis en ensayos *in vitro*.

8. Conclusiones

Los péptidos pMyc y pMax mostraron tener una especificidad *in vitro* por las secuencias canónicas E-box. Al conjugar los péptidos a AuNPs, se observó un efecto batocrómico característico del desplazamiento del máximo punto de absorbancia de las AuNPs. Mientras tanto, la caracterización por DLS mostró que tanto AuNPs como los NS se comportan en suspensión como nanocomplejos de alrededor de 250 nm.

Si bien, los péptidos por sí mismos no mostraron un efecto citotóxico en las diferentes líneas celulares, una vez conjugados a AuNPs tuvieron efecto variables donde el más relevante fue una citotoxicidad de pMax:AuNPs de alrededor del 45 % en DU145. Mientras tanto, los resultados de hemólisis mostraron una hemocompatibilidad *in vitro*.

Existió una diferencia importante entre los transcritos de células tratadas con AuNPs y pMax:AuNPs, por lo que los resultados sugieren que pMax está teniendo un efecto importante en la modulación transcripcional adicional a la modulación de las AuNPs. pMax:AuNPs mostró la modulación de programas transcripcionales esenciales para la proliferación celular como la reparación del ADN, estabilidad del uso mitótico y progresión del ciclo celular. Aunado a lo anterior, los programas transcripcionales modificados por pMax:AuNPs son los mismos que han sido reportados para Omomyc.

Finalmente, la firma transcriptómica obtenida para pMax:AuNPs sugiere que el mecanismo de citotoxicidad en células DU145 es debido a la interrupción de la fosforilación oxidativa y la traducción, mientras que se activa la muerte celular programada. Por lo que se determinó que el NS pMax:AuNPs indujo un cambio en la firma transcriptómica de células DU145.

9. Referencias

- Agostini, F., Zagalak, J., Attig, J., Ule, J., & Luscombe, N. M. (2021). Intergenic RNA mainly derives from nascent transcripts of known genes. *Genome Biology*, 22(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02350-x>
- Agudo, A., Cantor, K. P., Chan, P. C., Chorus, I., Falconer, I. R., Fan, A., & Fujiki, H. (2010). World health organization international agency for research on cancer. In J. Mitchell (Ed.), *Iarc Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans* (1st ed., Vol. 94). WHO Press.
- Akrami, M., Balalaie, S., Hosseinkhani, S., Alipour, M., Salehi, F., Bahador, A., & Haririan, I. (2016). Tuning the anticancer activity of a novel pro-apoptotic peptide using gold nanoparticle platforms. *Scientific Reports*, 6(March), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep31030>
- Aldaco-Sarvide, F., Pérez-Pérez, P., Cervantes-Sánchez, G., Torrecillas-Torres, L., Erazo-Valle-Solís, A. A., Cabrera-Galeana, P., Motola-Kuba, D., Anaya, P., Rivera-Rivera, S., & Cárdenas-Cárdenas, E. (2018). Mortality from cancer in Mexico: 2015 update. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 17(1), 28–34. <https://doi.org/10.24875/j.gamo.M18000105>
- Alharbi, R. A., Pettengell, R., Pandha, H. S., & Morgan, R. (2013). The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia*, 27(5), 1000–1008. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.356>
- Alimova, I., Pierce, A., Danis, E., Donson, A., Birks, D. K., Griesinger, A., Foreman, N. K., Santi, M., Soucek, L., Venkataraman, S., & Vibhakar, R. (2019). Inhibition of MYC attenuates tumor cell self-renewal and promotes senescence in SMARCB1-deficient Group 2 atypical teratoid rhabdoid tumors to suppress tumor growth in vivo. *International Journal of Cancer*, 144(8), 1983–1995. <https://doi.org/10.1002/ijc.31873>
- Alkhateeb, A., Rezaeian, I., Singireddy, S., Cavallo-Medved, D., Porter, L. A., & Rueda, L. (2019). Transcriptomics Signature from Next-Generation Sequencing Data Reveals New Transcriptomic Biomarkers Related to Prostate Cancer. *Cancer Informatics*, 18. <https://doi.org/10.1177/1176935119835522>
- Allevato, M., Bolotin, E., Grossman, M., Mane-Padros, D., Sladek, F. M., & Martinez, E. (2017). Sequence-specific DNA binding by MYC/MAX to low-affinity non-E-box motifs. *PLoS*

ONE, 12(7), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180147>

- Annibali, D., Whitfield, J. R., Favuzzi, E., Jauset, T., Serrano, E., Cuartas, I., Redondo-Campos, S., Folch, G., González-Juncà, A., Sodrì, N. M., Massó-Vallés, D., Beaulieu, M. E., Swigart, L. B., Mc Gee, M. M., Somma, M. P., Nasi, S., Seoane, J., Evan, G. I., & Soucek, L. (2014). Myc inhibition is effective against glioma and reveals a role for Myc in proficient mitosis. *Nature Communications*, 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms5632>
- Avramis, V. I., Sencer, S., Periclou, A. P., Sather, H., Bostrom, B. C., Cohen, L. J., Ettinger, A. G., Ettinger, L. J., Franklin, J., Gaynon, P. S., Hilden, J. M., Lange, B., Majlessipour, F., Mathew, P., Needle, M., Neglia, J., Reaman, G., & Holcenberg, J. S. (2002). A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: A Children's Cancer Group study. *Blood*, 99(6), 1986–1994. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.6.1986>
- Beaulieu, M. E., Jauset, T., Massó-Vallés, D., Martínez-Martín, S., Rahl, P., Maltais, L., Zacarias-Fluck, M. F., Casacuberta-Serra, S., Del Pozo, E. S., Fiore, C., Foradada, L., Cano, V. C., Sánchez-Hervás, M., Guenther, M., Sanz, E. R., Oteo, M., Tremblay, C., Martín, G., Letourneau, D., ... Soucek, L. (2019). Intrinsic cell-penetrating activity propels omomyc from proof of concept to viable anti-myc therapy. *Science Translational Medicine*, 11(484), 1–14. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar5012>
- Bechara, C., & Sagan, S. (2013). Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Letters*, 587(12), 1693–1702. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.031>
- Bertok, T., Sediva, A., Katrlík, J., Gemeiner, P., Mikula, M., Nosko, M., & Tkac, J. (2013). Label-free detection of glycoproteins by the lectin biosensor down to attomolar level using gold nanoparticles. *Talanta*, 108, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.02.052>
- Böhmová, E., Machová, D., Pechar, M., Pola, R., Venclíková, K., Janoušková, O., & Etrych, T. (2018). Cell-penetrating peptides: A useful tool for the delivery of various cargoes into cells. *Physiological Research*, 67, s267–s279. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933975>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.

<https://doi.org/10.3322/caac.21492>

- Calo-Lapido, R., Penas, C., Jiménez-Balsa, A., Vázquez, M. E., & Mascareñas, J. L. (2019). A chemical approach for the synthesis of the DNA-binding domain of the oncoprotein MYC. *Organic & Biomolecular Chemistry*, *17*(28), 6748–6752. <https://doi.org/10.1039/C9OB01209E>
- Carabet, L. A., Lallous, N., Leblanc, E., Ban, F., Morin, H., Lawn, S., Ghaidi, F., Lee, J., Mills, I. G., Gleave, M. E., Rennie, P. S., & Cherkasov, A. (2018). Computer-aided drug discovery of Myc-Max inhibitors as potential therapeutics for prostate cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *160*, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.023>
- Carabet, L. A., Rennie, P. S., & Cherkasov, A. (2019). Therapeutic inhibition of myc in cancer. Structural bases and computer-aided drug discovery approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(1). <https://doi.org/10.3390/ijms20010120>
- Carvajal, L. A., Ben Neriah, D., Senecal, A., Benard, L., Thiruthuvanathan, V., Yatsenko, T., Narayanagari, S. R., Wheat, J. C., Todorova, T. I., Mitchell, K., Kenworthy, C., Guerlavais, V., Annis, D. A., Bartholdy, B., Will, B., Anampa, J. D., Mantzaris, I., Aivado, M., Singer, R. H., ... Steidl, U. (2018). Dual inhibition of MDMX and MDM2 as a therapeutic strategy in leukemia. *Science Translational Medicine*, *10*(436). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao3003>
- Cassinelli, G., Supino, R., Zuco, V., Lanzi, C., Scovassi, A. I., Semple, S. C., & Zunino, F. (2004). Role of c-myc protein in hormone refractory prostate carcinoma: cellular response to paclitaxel. *Biochemical Pharmacology*, *68*(5), 923–931. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.06.002>
- Chang, T., Wang, L., Zhao, K., Ge, Y., He, M., & Li, G. (2016). Duplex identification of staphylococcus aureus by aptamer and gold nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, *16*(6), 5513–5519. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.11656>
- Chen, B., Hsu, R., Li, Z., Kogut, P. C., Du, Q., Rouser, K., Camoretti-Mercado, B., & Solway, J. (2012). Upstream stimulatory factor 1 activates GATA5 expression through an E-box motif. *Biochemical Journal*, *446*(1), 89–98. <https://doi.org/10.1042/BJ20111942>
- Chen, H., Liu, H., & Qing, G. (2018). Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment.

Signal Transduction and Targeted Therapy, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41392-018-0008-7>

Chen, Yan, Williams, V., Filippova, M., Filippov, V., & Duerksen-Hughes, P. (2014). Viral carcinogenesis: Factors inducing DNA damage and virus integration. *Cancers*, 6(4), 2155–2186. <https://doi.org/10.3390/cancers6042155>

Chen, Yunching, Wu, J. J., & Huang, L. (2010). Nanoparticles targeted with NGR motif deliver c-myc siRNA and doxorubicin for anticancer therapy. *Molecular Therapy*, 18(4), 828–834. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.291>

Child, H. W. (2012). *Nanoparticles for Biomedical Applications*. University of Glasgow, College of Medical, Veterinary and Life Sciences.

Cho, T. J., MacCuspie, R. I., Gigault, J., Gorham, J. M., Elliott, J. T., & Hackley, V. A. (2014). Highly Stable Positively Charged Dendron-Encapsulated Gold Nanoparticles. *Langmuir*, 30(13), 3883–3893. <https://doi.org/10.1021/la5002013>

Chuang, S.-M., Lee, Y.-H., Liang, R.-Y., Roam, G.-D., Zeng, Z.-M., Tu, H.-F., Wang, S.-K., & Chueh, P. J. (2013). Extensive evaluations of the cytotoxic effects of gold nanoparticles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(10), 4960–4973. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.025>

Chueh, P. J., Liang, R.-Y., Lee, Y.-H., Zeng, Z.-M., & Chuang, S.-M. (2014). Differential cytotoxic effects of gold nanoparticles in different mammalian cell lines. *Journal of Hazardous Materials*, 264, 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.11.031>

Cirri, A., Silakov, A., & Lear, B. J. (2015). Ligand Control over the Electronic Properties within the Metallic Core of Gold Nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(40), 11750–11753. <https://doi.org/10.1002/anie.201505933>

Conacci-Sorrell, M., McFerrin, L., & Eisenman, R. N. (2014). An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(1), 1–24. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014357>

Demma, M. J., Hohn, M. J., Sun, A., Mapelli, C., Hall, B., Walji, A., & O’Neil, J. (2020). Inhibition of Myc transcriptional activity by a mini-protein based upon Mxd1. *FEBS Letters*, 594(10), 1467–1476. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13759>

- Esser, A. K., Ross, M. H., Fontana, F., Su, X., Gabay, A., Fox, G. C., Xu, Y., Xiang, J., Schmieder, A. H., Yang, X., Cui, G., Scott, M., Achilefu, S., Chauhan, J., Fletcher, S., Lanza, G. M., & Weilbaecher, K. N. (2020). Nanotherapy delivery of c-myc inhibitor targets protumor macrophages and preserves antitumor macrophages in breast cancer. *Theranostics*, *10*(17), 7510–7526. <https://doi.org/10.7150/thno.44523>
- Fiorentino, F. P., Tokgün, E., Solé-Sánchez, S., Giampaolo, S., Tokgün, O., Jauset, T., Kohno, T., Perucho, M., Soucek, L., & Yokota, J. (2016). Growth suppression by MYC inhibition in small cell lung cancer cells with TP53 and RB1 inactivation. *Oncotarget*, *7*(21), 31014–31028. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8826>
- Gamrad, L., Rehbock, C., Westendorf, A. M., Buer, J., Barcikowski, S., & Hansen, W. (2016). Efficient nucleic acid delivery to murine regulatory T cells by gold nanoparticle conjugates. *Scientific Reports*, *6*(June), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep28709>
- Garralda, E., Beaulieu, M. E., Moreno, V., Casacuberta-Serra, S., Martínez-Martín, S., Foradada, L., Alonso, G., Massó-Vallés, D., López-Estévez, S., Jauset, T., Corral de la Fuente, E., Doger, B., Hernández, T., Perez-Lopez, R., Arqués, O., Castillo Cano, V., Morales, J., Whitfield, J. R., Niewel, M., ... Calvo, E. (2024). MYC targeting by OMO-103 in solid tumors: a phase 1 trial. *Nature Medicine*, *30*(March). <https://doi.org/10.1038/s41591-024-02805-1>
- Gonzalez, V., & Hurley, L. H. (2010). The c-MYC NHE III1: Function and regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *50*, 111–129. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094649>
- Gorodetska, I., Kozeretska, I., & Dubrovskaya, A. (2019). BRCA genes: The role in genome stability, cancer stemness and therapy resistance. *Journal of Cancer*, *10*(9), 2109–2127. <https://doi.org/10.7150/jca.30410>
- Guerrero, S., Herance, J. R., Rojas, S., Mena, J. F., Gispert, J. D., Acosta, G. A., Albericio, F., & Kogan, M. J. (2012). Synthesis and In Vivo Evaluation of the Biodistribution of a 18 F-Labeled Conjugate Gold-Nanoparticle-Peptide with Potential Biomedical Application. *Bioconjugate Chemistry*, *23*(3), 399–408. <https://doi.org/10.1021/bc200362a>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer Review Douglas. *Cell*, *100*(7), 57–70. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Holmes, A. G., Parker, J. B., Sagar, V., Truica, M. I., Soni, P. N., Han, H., Schiltz, G. E., Abdulkadir, S. A., & Chakravarti, D. (2022). A MYC inhibitor selectively alters the MYC and MAX cistromes and modulates the epigenomic landscape to regulate target gene expression. *Science Advances*, *8*(17), 1–18. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abh3635>
- Huang, K., & García, A. E. (2013). Free energy of translocating an arginine-rich cell-penetrating peptide across a lipid bilayer suggests pore formation. *Biophysical Journal*, *104*(2), 412–420. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.10.027>
- International, A. (2017). *Standard Practice for Assessment of Hemolytic Properties of Materials*. <https://doi.org/10.1520/F0756-17>
- International Agency for Research on Cancer. (2018). *Cancer Today*. World Health Organization. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=1&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&
- Islam, M. Z., Ariyama, H., Alam, J. M., & Yamazaki, M. (2014). Entry of cell-penetrating peptide transportan 10 into a single vesicle by translocating across lipid membrane and its induced pores. *Biochemistry*, *53*(2), 386–396. <https://doi.org/10.1021/bi401406p>
- Iurlaro, R., León-Annicchiarico, C. L., & Muñoz-Pinedo, C. (2014). Regulation of Cancer Metabolism by Oncogenes and Tumor Suppressors. In *Methods in Enzymology* (Vol. 542, pp. 59–80). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00003-0>
- Jabir, M. S., Taha, A. A., Sahib, U. I., Taqi, Z. J., Al-Shammari, A. M., & Salman, A. S. (2019). Novel of nano delivery system for Linalool loaded on gold nanoparticles conjugated with CALNN peptide for application in drug uptake and induction of cell death on breast cancer cell line. *Materials Science and Engineering C*, *94*, 949–964. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.014>
- Jeong, W. jin, Bu, J., Kubiawicz, L. J., Chen, S. S., Kim, Y. S., & Hong, S. (2018). Peptide–nanoparticle conjugates: a next generation of diagnostic and therapeutic platforms? *Nano*

Convergence, 5(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s40580-018-0170-1>

- Jiang, Y., Zhao, W., Zhou, H., Zhang, Q., & Zhang, S. (2022). ATP-Triggered Intracellular In Situ Aggregation of a Gold-Nanoparticle-Equipped Triple-Helix Molecular Switch for Fluorescence Imaging and Photothermal Tumor Therapy. *Langmuir*, 38(12), 3755–3764. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c03331>
- Jung, L. A., Gebhardt, A., Koelmel, W., Ade, C. P., Walz, S., Kuper, J., Von Eyss, B., Letschert, S., Redel, C., D'Artista, L., Biankin, A., Zender, L., Sauer, M., Wolf, E., Evan, G., Kisker, C., & Eilers, M. (2017). OmoMYC blunts promoter invasion by oncogenic MYC to inhibit gene expression characteristic of MYC-dependent tumors. *Oncogene*, 36(14), 1911–1924. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.354>
- Karp, G. (2016). Biología Celular y Molecular. In *McGraw Hill Educación* (6ta ed.). McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
- Kim, J., Roh, M., & Abdulkadir, S. A. (2010). Pim1 promotes human prostate cancer cell tumorigenicity and c-MYC transcriptional activity. *BMC Cancer*, 10(1), 248. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-248>
- Koh, C. M., Bieberich, C. J., Dang, C. V., Nelson, W. G., Yegnasubramanian, S., & De Marzo, A. M. (2010). MYC and prostate cancer. *Genes and Cancer*, 1(6), 617–628. <https://doi.org/10.1177/1947601910379132>
- Kumar, A., Ma, H., Zhang, X., Huang, K., Jin, S., Liu, J., Wei, T., Cao, W., Zou, G., & Liang, X.-J. (2012). Gold nanoparticles functionalized with therapeutic and targeted peptides for cancer treatment. *Biomaterials*, 33(4), 1180–1189. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.058>
- Lavigne, P., Crump, M. P., Gagné, S. M., Hodges, R. S., Kay, C. M., & Sykes, B. D. (1998). Insights into the mechanism of heterodimerization from the ¹H-NMR solution structure of the c-Myc-Max heterodimeric leucine zipper. *Journal of Molecular Biology*, 281(1), 165–181. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1914>
- Lee, E. Y. H. P., & Muller, W. J. (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(a003236), 1–18. <https://doi.org/10.2174/978160805016111201010064>

- Lee, J., Chatterjee, D. K., Lee, M. H., & Krishnan, S. (2014). Gold nanoparticles in breast cancer treatment: Promise and potential pitfalls. *Cancer Letters*, 347(1), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.02.006>.Gold
- Li, L., Sun, W., Zhang, Z., & Huang, Y. (2016). Time-staggered delivery of docetaxel and H1-S6A,F8A peptide for sequential dual-strike chemotherapy through tumor priming and nuclear targeting. *Journal of Controlled Release*, 232, 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.04.021>
- Li, N., Yang, H., Yu, Z., Li, Y., Pan, W., Wang, H., & Tang, B. (2017). Nuclear-targeted siRNA delivery for long-term gene silencing. *Chemical Science*, 8(4), 2816–2822. <https://doi.org/10.1039/C6SC04293G>
- Liu, M., Li, C., Pazgier, M., Li, C., Mao, Y., Lv, Y., Gu, B., Wei, G., Yuan, W., Zhan, C., Lu, W. Y., & Lu, W. (2010). D-peptide inhibitors of the p53-MDM2 interaction for targeted molecular therapy of malignant neoplasms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(32), 14321–14326. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008930107>
- Liu, Y., Wang, H., Kamei, K., Yan, M., Chen, K.-J., Yuan, Q., Shi, L., Lu, Y., & Tseng, H.-R. (2011). Delivery of Intact Transcription Factor by Using Self-Assembled Supramolecular Nanoparticles. *Angewandte Chemie*, 123(13), 3114–3118. <https://doi.org/10.1002/ange.201005740>
- Longoria-García, S., Sánchez-Domínguez, C. N., & Gallardo-Blanco, H. L. (2022). Recent applications of cell-penetrating peptide guidance of nanosystems in breast and prostate cancer (Review). *Oncology Letters*, 23(3), 1–13. <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13223>
- Lu, Z., & Yin, Y. (2012). Colloidal nanoparticle clusters: functional materials by design. *Chemical Society Reviews*, 41(21), 6874. <https://doi.org/10.1039/c2cs35197h>
- Manzanares, D., Pérez-Carrión, M. D., Blanco, J. L. J., Mellet, C. O., Fernández, J. M. G., & Ceña, V. (2020). Cyclodextrin-based nanostructure efficiently delivers sirna to glioblastoma cells preferentially via macropinocytosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms21239306>
- Massó-Vallés, D., & Soucek, L. (2020). Blocking Myc to Treat Cancer: Reflecting on Two

- Decades of Omomyc. *Cells*, 9(4), 883. <https://doi.org/10.3390/cells9040883>
- Matea, C. T., Mocan, T., Tabaran, F., Iancu, C., & Mocan, L. C. (2015). Rational design of gold nanocarrier for the delivery of JAG-1 peptide. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0100-x>
- Mathur, D., Prakash, S., Anand, P., Kaur, H., Agrawal, P., Mehta, A., Kumar, R., Singh, S., & Raghava, G. P. S. (2016). PEPLife: A Repository of the Half-life of Peptides. *Scientific Reports*, 6(July), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep36617>
- Mohammad, A., Alshawaf, E., Marafie, S. K., Abu-Farha, M., Abubaker, J., & Al-Mulla, F. (2021). Higher binding affinity of furin for SARS-CoV-2 spike (S) protein D614G mutant could be associated with higher SARS-CoV-2 infectivity. *International Journal of Infectious Diseases*, 103, 611–616. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.033>
- Montrose, K., Yang, Y., & Krissansen, G. W. (2014). The tetrapeptide core of the carrier peptide Xentry is cell-penetrating: Novel activatable forms of Xentry. *Scientific Reports*, 4, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep04900>
- Morgan, R., Pirard, P. M., Shears, L., Sohal, J., Pettengell, R., & Pandha, H. S. (2007). Antagonism of HOX/PBX dimer formation blocks the in vivo proliferation of melanoma. *Cancer Research*, 67(12), 5806–5813. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4231>
- Munshi, A., & Sharma, V. (2018). Omics and Edible Vaccines. In *Omics Technologies and Bio-Engineering* (pp. 129–141). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815870-8.00008-5>
- Nair, S. K., & Burley, S. K. (2003). X-Ray Structures of Myc-Max and Mad-Max Recognizing DNA. *Cell*, 112(2), 193–205. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01284-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01284-9)
- Niu, J., Chu, Y., Huang, Y.-F., Chong, Y.-S., Jiang, Z.-H., Mao, Z.-W., Peng, L.-H., & Gao, J.-Q. (2017). Transdermal Gene Delivery by Functional Peptide-Conjugated Cationic Gold Nanoparticle Reverses the Progression and Metastasis of Cutaneous Melanoma. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(11), 9388–9401. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b16378>
- Noguchi, H., Bonner-Weir, S., Wei, F. Y., Matsushita, M., & Matsumoto, S. (2005). BETA2/NeuroD protein can be transduced into cells due to an arginine- and lysine-rich sequence. *Diabetes*, 54(10), 2859–2866. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.10.2859>
- Nusinow, D. P., Szpyt, J., Ghandi, M., Rose, C. M., McDonald, E. R., Kalocsay, M., Jané-

- Valbuena, J., Gelfand, E., Schweppe, D. K., Jedrychowski, M., Golji, J., Porter, D. A., Rejtar, T., Wang, Y. K., Kryukov, G. V., Stegmeier, F., Erickson, B. K., Garraway, L. A., Sellers, W. R., & Gygi, S. P. (2020). Quantitative Proteomics of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Cell*, *180*(2), 387-402.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.023>
- Pearce, A. K., Simpson, J. D., Fletcher, N. L., Houston, Z. H., Fuchs, A. V., Russell, P. J., Whittaker, A. K., & Thurecht, K. J. (2017). Localised delivery of doxorubicin to prostate cancer cells through a PSMA-targeted hyperbranched polymer theranostic. *Biomaterials*, *141*, 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.07.004>
- Pfeifer, G. P., & Besaratinia, A. (2012). UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochemical and Photobiological Sciences*, *11*(1), 90–97. <https://doi.org/10.1039/c1pp05144j>
- Pucci, F., Kwasigroch, J. M., & Rومان, M. (2017). SCooP: an accurate and fast predictor of protein stability curves as a function of temperature. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *33*(21), 3415–3422. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx417>
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., & Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: Weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer*, *11*(11), 761–774. <https://doi.org/10.1038/nrc3106>
- Ream, J. A., Lewis, L. K., & Lewis, K. A. (2016). Rapid agarose gel electrophoretic mobility shift assay for quantitating protein: RNA interactions. *Analytical Biochemistry*, *511*, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.07.027>
- Reth, M. (2013). Matching cellular dimensions with molecular sizes. *Nature Immunology*, *14*(8), 765–767. <https://doi.org/10.1038/ni.2621>
- Roser, M., & Ritchie, H. (2015). *Cancer*. <https://ourworldindata.org/cancer#citation>
- Saini, R., Saini, S., & Sharma, S. (2010). Nanotechnology: The future medicine. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, *3*(1), 32. <https://doi.org/10.4103/0974-2077.63301>
- Sani, A., Cao, C., & Cui, D. (2021). Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *26*, 100991. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100991>
- Sarfraz, N., & Khan, I. (2021). Plasmonic Gold Nanoparticles (AuNPs): Properties, Synthesis and their Advanced Energy, Environmental and Biomedical Applications. *Chemistry - An Asian*

Journal, 16(7), 720–742. <https://doi.org/10.1002/asia.202001202>

- Satriano, C., Munzone, A., Cucci, L. M., Giacomelli, C., Trincavelli, M. L., Martini, C., Rizzarelli, E., & La Mendola, D. (2018). Angiogenin-mimetic peptide functionalised gold nanoparticles for cancer therapy applications. *Microchemical Journal*, 136, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.09.016>
- Savino, M., Annibali, D., Carucci, N., Favuzzi, E., Cole, M. D., Evan, G. I., Soucek, L., & Nasi, S. (2011). The action mechanism of the Myc inhibitor termed Omomyc may give clues on how to target Myc for cancer therapy. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022284>
- Shu, Y., Xie, B., Liang, Z., & Chen, J. (2018). Quercetin reverses the doxorubicin resistance of prostate cancer cells by downregulating the expression of c-met. *Oncology Letters*, 15(2), 2252–2258. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7561>
- Singh, S., Gupta, A., Qayoom, I., Teotia, A. K., Gupta, S., Padmanabhan, P., Dev, A., & Kumar, A. (2020). Biofabrication of gold nanoparticles with bone remodeling potential: an in vitro and in vivo assessment. *Journal of Nanoparticle Research*, 22(6), 152. <https://doi.org/10.1007/s11051-020-04883-x>
- Sorolla, A., Wang, E., Golden, E., Duffy, C., Henriques, S. T., Redfern, A. D., & Blancafort, P. (2020). Precision medicine by designer interference peptides: applications in oncology and molecular therapeutics. *Oncogene*, 39(6), 1167–1184. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1056-3>
- Soucek, L., Helmer-Citterich, M., Sacco, A., Jucker, R., Cesareni, G., & Nasi, S. (1998). Design and properties of a Myc derivative that efficiently homodimerizes. *Oncogene*, 17(19), 2463–2472. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202199>
- Srijampa, S., Buddhisa, S., Ngermpimai, S., Sangiamdee, D., Chompoosor, A., & Tippayawat, P. (2019). Effects of Gold Nanoparticles with Different Surface Charges on Cellular Internalization and Cytokine Responses in Monocytes. *BioNanoScience*, 9(3), 580–586. <https://doi.org/10.1007/s12668-019-00638-8>
- Stine, Z. E., Walton, Z. E., Altman, B. J., Hsieh, A. L., & Dang, C. V. (2015). MYC, metabolism, and cancer. *Cancer Discovery*, 5(10), 1024–1039. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15->

- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(43), 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- Swedberg, J. E., Ghani, H. A., Harris, J. M., De Veer, S. J., & Craik, D. J. (2018). Potent, Selective, and Cell-Penetrating Inhibitors of Kallikrein-Related Peptidase 4 Based on the Cyclic Peptide MCoTI-II. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *9*(12), 1258–1262. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00422>
- Taha, A. A., AL-Jawad, S. M. H., & AL-Barram, L. F. A. (2019). Improvement of Cancer Therapy by TAT Peptide Conjugated Gold Nanoparticles. *Journal of Cluster Science*, *30*(2), 403–414. <https://doi.org/10.1007/s10876-019-01497-9>
- Tang, R., Kim, C. S., Solfiell, D. J., Rana, S., Mout, R., Velázquez-Delgado, E. M., Chompoosor, A., Jeong, Y., Yan, B., Zhu, Z. J., Kim, C., Hardy, J. A., & Rotello, V. M. (2013). Direct delivery of functional proteins and enzymes to the cytosol using nanoparticle-stabilized nanocapsules. *ACS Nano*, *7*(8), 6667–6673. <https://doi.org/10.1021/nn402753y>
- Taylor, B. S., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, B. S., Arora, V. K., Kaushik, P., Cerami, E., Reva, B., Antipin, Y., Mitsiades, N., Landers, T., Dolgalev, I., Major, J. E., Wilson, M., Socci, N. D., Lash, A. E., Heguy, A., ... Gerald, W. L. (2010). Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. *Cancer Cell*, *18*(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.05.026>
- Tindall, E. A., Hayes, V. M., & Petersen, D. C. (2010). Inflammatory genetic markers of prostate cancer Risk. *Cancers*, *2*(2), 1198–1220. <https://doi.org/10.3390/cancers2021198>
- Tiwari, P., Vig, K., Dennis, V., & Singh, S. (2011). Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Nanomaterials*, *1*(1), 31–63. <https://doi.org/10.3390/nano1010031>
- Trinh, T. B., Upadhyaya, P., Qian, Z., & Pei, D. (2016). Discovery of a Direct Ras Inhibitor by Screening a Combinatorial Library of Cell-Permeable Bicyclic Peptides. *ACS Combinatorial Science*, *18*(1), 75–85. <https://doi.org/10.1021/acscmbosci.5b00164>

- Venkatpurwar, V., Mali, V., Bodhankar, S., & Pokharkar, V. (2012). In vitro cytotoxicity and in vivo sub-acute oral toxicity assessment of porphyrin reduced gold nanoparticles. *Toxicological & Environmental Chemistry*, *94*(7), 1357–1367. <https://doi.org/10.1080/02772248.2012.697731>
- Verimli, N., Demiral, A., Yılmaz, H., Çulha, M., & Erdem, S. S. (2019). Design of Dense Brush Conformation Bearing Gold Nanoparticles as Theranostic Agent for Cancer. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *189*(3), 709–728. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03151-6>
- Vines, J. B., Yoon, J. H., Ryu, N. E., Lim, D. J., & Park, H. (2019). Gold nanoparticles for photothermal cancer therapy. *Frontiers in Chemistry*, *7*(APR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00167>
- Vita, M., & Henriksson, M. (2006). The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Seminars in Cancer Biology*, *16*(4), 318–330. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.07.015>
- Wadajkar, A. S., Menon, J. U., Tsai, Y. S., Gore, C., Dobin, T., Gandee, L., Kangasniemi, K., Takahashi, M., Manandhar, B., Ahn, J. M., Hsieh, J. T., & Nguyen, K. T. (2013). Prostate cancer-specific thermo-responsive polymer-coated iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, *34*(14), 3618–3625. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.062>
- Wang, E., Sorolla, A., Cunningham, P. T., Bogdawa, H. M., Beck, S., Golden, E., Dewhurst, R. E., Florez, L., Cruickshank, M. N., Hoffmann, K., Hopkins, R. M., Kim, J., Woo, A. J., Watt, P. M., & Blancafot, P. (2019). Tumor penetrating peptides inhibiting MYC as a potent targeted therapeutic strategy for triple-negative breast cancers. *Oncogene*, *38*(1), 140–150. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0421-y>
- Wang, X., Qian, X., Beitler, J. J., Chen, Z. G., Khuri, F. R., Lewis, M. M., Shin, H. J. C., Nie, S., & Shin, D. M. (2011). Detection of circulating tumor cells in human peripheral blood using surface-enhanced raman scattering nanoparticles. *Cancer Research*, *71*(5), 1526–1532. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3069>
- Wang, Y., Geer, L. Y., Chappey, C., Kans, J. A., & Bryant, S. H. (2000). Cn3D: sequence and structure views for Entrez. *Trends in Biochemical Sciences*, *25*(6), 300–302. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01561-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01561-9)

- Wasylishen, A. R., & Penn, L. Z. (2010). Myc: The beauty and the beast. *Genes and Cancer*, *1*(6), 532–541. <https://doi.org/10.1177/1947601910378024>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Wu, X., Upadhyaya, P., Villalona-Calero, M. A., Briesewitz, R., & Pei, D. (2013). Inhibition of Ras-effector interactions by cyclic peptides. *MedChemComm*, *4*(2), 378–382. <https://doi.org/10.1039/c2md20329d>
- Xu, X., Liu, Y., Yang, Y., Wu, J., Cao, M., & Sun, L. (2022). One-pot synthesis of functional peptide-modified gold nanoparticles for gene delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *640*, 128491. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.128491>
- Yang, M., Li, W., Liu, Y. Y., Fu, S., Qiu, G. Bin, Sun, K. L., & Fu, W. N. (2012). Promoter hypermethylation-induced transcriptional down-regulation of the gene MYCT1 in laryngeal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, *12*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-219>
- Zacarías-Fluck, M. F., Massó-Vallés, D., Giuntini, F., González-Larreategui, Í., Kaur, J., Casacuberta-Serra, S., Jauset, T., Martínez-Martín, S., Martín-Fernández, G., del Pozo, E. S., Foradada, L., Grueso, J., Nonell, L., Beaulieu, M. E., Whitfield, J. R., & Soucek, L. (2023). Reducing MYC's transcriptional footprint unveils a good prognostic gene signature in melanoma. *Genes and Development*, *37*(7–8), 303–320. <https://doi.org/10.1101/gad.350078.122>
- Zhang, W., & Zhang, K. (2022). A transcriptomic signature for prostate cancer relapse prediction identified from the differentially expressed genes between TP53 mutant and wild-type tumors. *Scientific Reports*, *12*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14436-y>
- Zhang, Ye, Li, M., Gao, X., Chen, Y., & Liu, T. (2019). Nanotechnology in cancer diagnosis: Progress, challenges and opportunities. *Journal of Hematology and Oncology*, *12*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0833-3>
- Zhang, Yuan, Peng, L., Mumper, R. J., & Huang, L. (2013). Combinational delivery of c-myc

siRNA and nucleoside analogs in a single, synthetic nanocarrier for targeted cancer therapy. *Biomaterials*, 34(33), 8459–8468. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.050>

Zhao, J., Xu, L., Sun, J., Song, M., Wang, L., Yuan, S., Zhu, Y., Wan, Z., Larsson, S., Tsilidis, K., Dunlop, M., Campbell, H., Rudan, I., Song, P., Theodoratou, E., Ding, K., & Li, X. (2023). Global trends in incidence, death, burden and risk factors of early-onset cancer from 1990 to 2019. *BMJ Oncology*, 2(1), e000049. <https://doi.org/10.1136/bmjonc-2023-000049>

Zheng, J. T., Lin, C. X., Fang, Z. Y., & Li, H. D. (2020). Intron Retention as a Mode for RNA-Seq Data Analysis. *Frontiers in Genetics*, 11(July), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00586>