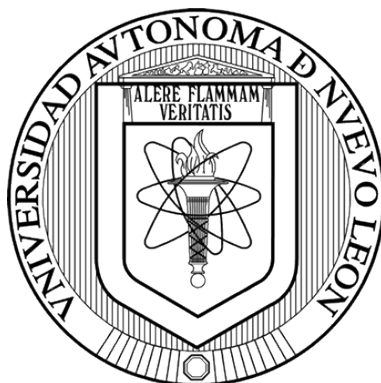


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO* DE LA
PROTEÍNA RECOMBINANTE KLA-PTEN-LTV Y DE SIRNA'S
REGULADORES DE LOS GENES *PIK3CA*, *AKT1*, *MTOR* EN CÁNCER DE
MAMA HER2 POSITIVO**

Por

ELIZETH PIOQUINTO AVILA

**Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia**

Enero, 2025

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO* DE
LA PROTEÍNA RECOMBINANTE KLA-PTEN-LTV Y DE SIRNA’S
REGULADORES DE LOS GENES *PIK3CA*, *AKT1*, *MTOR* EN
CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVO”**

Aprobación de la tesis:

Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza
Presidente

Dr. Isaías Balderas Rentería
Secretario

Dra. Yolanda Araceli Gracia Vásquez
Vocal

Dr. José Juan Pérez Trujillo
Vocal

Dr. José Ángel Merino Mascorro
Vocal

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Sub-Directora de Posgrado

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO* DE
LA PROTEÍNA RECOMBINANTE KLA-PTEN-LTV Y DE SIRNA’S
REGULADORES DE LOS GENES *PIK3CA*, *AKT1*, *MTOR* EN
CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVO”**

Revisión de la tesis:

Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza
Asesor de Tesis

Dra. Yolanda Araceli Gracia Vásquez
Comité Tutorial

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera
Comité Tutorial

Dr. Isaías Balderas Rentería
Comité Tutorial

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Sub-Directora de Posgrado

RESUMEN

M.C. Elizeth Pioquinto Avila

Fecha de Graduación: Enero 2025

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA *in vitro* DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE KLA-PTEN-LTV Y DE SIRNA's REGULADORES DE LOS GENES *PIK3CA*, *AKT1*, *MTOR* EN CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVO.

Número de páginas: 64

Candidato para el grado

de Doctorado en Ciencias con Orientación en Farmacia

Propósito y Método del Estudio: El cáncer de mama ocupa el cuarto lugar en número de muertes (670 000 a nivel mundial) y un aumento del número de nuevos casos con un total de 2, 296, 840 en el año 2022. En México es considerada la primera causa de muerte en población femenina. Actualmente existe una terapia múltiple para dicha enfermedad, pero esta carece de especificidad hacia las células tumorales, provocando daños a células normales; por lo anterior se requiere de nuevos tratamientos que sean selectivos a las células malignas y además de facilitar su internalización. En los últimos años se han estudiado los Ácidos ribonucleicos de interferencia (RNAi) con la finalidad de disminuir los niveles de expresión de ciertos genes generalmente oncogenes, por otra parte, se continúa buscando dianas terapéuticas a nivel intracelular que estén involucradas en las diferentes vías de señalización relacionadas con el crecimiento celular incontrolado.

En ese sentido, una de las proteínas relacionada con múltiples cánceres es Proteína homóloga fosfatasa y tensina (PTEN), considerada como un gen supresor de tumor, que generalmente su función está disminuida. Su principal función es desfosforilar proteínas y fosfolípidos, inhibiendo la activación de la vía PI3K/AKT.

Así mismo, en la búsqueda de tratamientos selectivos se han introducido para su estudio diversos péptidos, la clasificación es diversa, pero los que destacan por la función que desempeñan son los péptidos de penetración celular (CPP) y los péptidos *tumor homing* (THP) debido a su internalización y reconocimiento de células tumorales, respectivamente.

Por lo anterior, en la presente investigación se evaluaron 3 pequeños RNA de interferencia (siRNA's) dirigidos a bloquear la expresión de los genes *PIK3CA*, *AKT1* y *MTOR* que participan en la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR, en distintas líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivo con el propósito de causar una disminución en la proliferación celular. La evaluación de la actividad antiproliferativa y citotóxica se llevó a cabo por la técnica de WST-1, se realizaron por triplicado en tres ensayos independientes, en dichas pruebas no se observó una disminución favorable; para la

determinación de la expresión se procedió a realizar la extracción de RNA después de 24 h de tratamiento, una vez obtenido el DNA complementario (cDNA) se continuó con la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) con el reactivo SyBR Green.

Así mismo, se llevó a cabo la expresión de una proteína recombinante (KLA-PTEN-LTV) en un sistema eucariótico. La proteína nativa PTEN participa en la desfosforilación de PIP₃, siendo importante en regulación negativa de la vía de AKT, que a su vez está involucrada con el cáncer de mama HER2, por ende, se llevaron a cabo pruebas antiproliferativas en líneas celulares de cáncer de mama y se realizó un análisis de detección de la proteína. En los resultados obtenidos se observó la inhibición celular en la línea HCC-1954, la cual sobreexpresa el receptor en estudio.

Contribuciones y Conclusiones: Los siRNA's estudiados no presentaron una disminución estadísticamente significativa de la proliferación celular en las diferentes líneas celulares de cáncer de mama, a pesar de que iban dirigidos hacia genes que participan en procesos de proliferación y supervivencia; sin embargo, en la prueba de niveles de expresión se observó una disminución con respecto al control (células sin la transfección de siRNA). Por el contrario, los resultados observados con la proteína recombinante muestran una inhibición de la proliferación celular en la línea HCC-1954 y no en MCF-7; probablemente se debe al uso de los THP, ya que estos se dirigen a receptores HER2. Por último, ambas alternativas terapéuticas se diseñaron con la finalidad de ser selectivas contra células malignas.



Firma del asesor: _____

Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza

DEDICATORIA

A mi Mamá

A Mamá Mane y Papá Timo

A la familia Leyva Ángel

A Mariana, Luis y Carol

A mi Familia Materna

A los Limonenos

AGRADECIMIENTOS

A cada integrante del **Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos (antes INGGEN)** por darme la oportunidad de trabajar en estas instalaciones durante estos años.

Al **Departamento de Histología** por su invaluable apoyo en la realización de algunos ensayos. Su colaboración fue fundamental para la culminación del proyecto.

Al **Laboratorio de Expresión de Proteínas** por el gran trabajo en equipo que se desarrolló a lo largo de los años.

A la **Facultad de Ciencias Químicas** por aceptarme en la institución, brindarme apoyo económico y de equipos para la realización del proyecto. Su respaldo ha sido fundamental para mi desarrollo académico y profesional.

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías** por el apoyo económico proporcionado durante el plan de estudios de posgrado.

Al **Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza** por brindarme la oportunidad de formar un gran equipo de trabajo y, con el tiempo, forjar una amistad. Aprecio sinceramente que haya compartido sus conocimientos y experiencias de laboratorio, así como sus consejos y su apoyo incondicional a lo largo de esta etapa. Sin duda, es un excelente ser humano y gran mentor. ¡Muchas gracias!

Al **Dr. Isaías Balderas Rentería** por compartir sus valiosos conocimientos y brindarme la oportunidad de formar parte de INGGEN. Su apoyo constante como Profesor y Subdirector fue fundamental en cada situación que se presentó a lo largo del proyecto.

Al comité tutorial, en especial a la **Dra. Yolanda Araceli Gracia Vásquez** y **Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera**, por su incondicional disponibilidad para la revisión de avances, así como por las juntas de comité y predoctoral. Su apoyo y sugerencias han sido clave para el desarrollo del proyecto. Agradezco también todos los consejos personales que me han brindado.

Al comité externo, al **Dr. José Juan Pérez Trujillo** y **Dr. José Ángel Merino Mascorro**, por su aceptación y disposición. Sus sugerencias durante el predoctoral fueron invaluable y fundamentales en el desarrollo experimental del proyecto.

A la Querida **Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas** por el apoyo incondicional que me ha brindado desde el primer día en el posgrado. Gracias por todas las clases, consejos y por estar siempre presente de manera moral. ¡Muchas gracias por su apoyo!

Al **Dr. Donaciano Flores Robles** por ser el primer profesor en involucrarme en el área de investigación. Gracias por otorgarme ese impulso inicial y por compartir generosamente todos sus conocimientos y apoyo. Su influencia ha sido fundamental en mi desarrollo.

A **mis compañeros** de esta gran aventura: Sonia Montero, Jorge Solís, Evelyn Martínez, Juan Carrizalez, Ceci Jaramillo, Diego Jaramillo, Rodrigo Vázquez, Javier Hernández, Aldo González, Jessica Gómez, David Perez, Bryan Santos. Gracias por todo; ha sido una experiencia única e inolvidable. Cada momento compartido fue fundamental para la culminación de esta etapa. ¡Los llevaré siempre en mi mente!

A la **M.C. Viridiana Gutiérrez Valencia**, quiero agradecer por formar parte de esta etapa de mi vida y por proporcionarme las herramientas necesarias para llegar al final. Sin tu ayuda profesional, esto no habría sido posible. Estoy inmensamente agradecida contigo, mi estimada Viri. ¡Muchas gracias!

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
TABLA DE CONTENIDO.....	IX
LISTA DE TABLAS	XIII
LISTA DE FIGURAS	XV
NOMENCLATURA.....	XVII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer de mama.....	2
1.2. Factores de riesgo y clasificación	2
1.3. Cáncer de mama HER2 positivo.....	3
1.3.1. Estructura del receptor HER2	4
1.3.2. Activación de la vía de señalización del receptor HER2	4
1.4. Tratamiento de cáncer de mama HER2 positivo	5
1.4.1. Anticuerpos monoclonales.....	5
1.4.2. Moléculas pequeñas inhibidoras de tirosina cinasa	5
1.4.3. Terapia combinada.....	6
1.5. Nuevas dianas terapéuticas	6
1.5.1. PIP ₃	6
1.5.2. PI3K	7
1.5.3. AKT	7
1.5.4. mTOR.....	8
1.6. Nuevas estrategias terapéuticas	9

1.6.1. Péptidos como sistemas de entrega de fármacos	9
1.6.1.1. Péptidos <i>tumor homing</i>	9
1.6.1.2. Péptidos de penetración celular	10
1.6.2. Proteína PTEN	11
1.6.3. RNA´s de interferencia	13
1.7. Antecedentes	14
1.8. Justificación	18
1.9. Hipótesis	19
1.10. Objetivos.....	19
1.10.1. Objetivo general	19
1.10.2. Objetivos específicos	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1. Reactivos y equipos	21
2.2. Evaluación de siRNA´s.....	22
2.2.1. Transfección de siRNA en líneas celulares	22
2.2.2. Evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica <i>in vitro</i> de los siRNA´s en estudio por la técnica de WST-1	23
2.2.3. RT-PCR cuantitativa de los siRNA´s.....	24
2.3. Clonación de KLA-PTEN-LTV.....	25
2.3.1. Secuencia del gen PTEN	25
2.3.2. Diseño de primers.....	25
2.3.3. Propagación del gen en <i>E. coli</i> DH5α	25
2.3.3.1. Transformación de pUC57 KLA-PTEN-LTV	25
2.3.3.2. Selección de colonias transformadas.....	26
2.3.3.3. Extracción de ADN plasmídico.....	26
2.4. Construcción del plásmido recombinante.....	26
2.4.1. Digestión de pUC57 KLA-PTEN-LTV y pCEFL-EGFP	26
2.4.2. Reacción de ligación del vector con inserto de interés	28

2.4.3. Transformación de pCEFL-KLA-PTEN-LTV.....	28
2.4.4. Selección de clonas y extracción de ADN	29
2.4.5. Confirmación de transformantes por medio de PCR	29
2.5. Ensayos biológicos de la proteína recombinante	30
2.5.1. Transfección en HEK-293T para la expresión de la proteína... ..	30
2.5.2. Evaluación de la actividad anticancerígena <i>in vitro</i> de KLA-PTEN- LTV por la técnica de WST-1	31
2.5.3. Detección de la proteína recombinante	31
2.6. Manejo de residuos	32
3. RESULTADOS.....	33
3.1. Evaluación de siRNA´s.....	34
3.1.1. Citotoxicidad de siRNA´s en células Vero	34
3.1.2. Actividad antiproliferativa de los siRNA´s en estudio	35
3.1.3. RT-PCR cuantitativa de los siRNA´s	39
3.2. Clonación de KLA-PTEN-LTV	40
3.2.1. Secuencia del gen KLA-PTEN-LTV.....	40
3.2.2. Diseño de primers.....	41
3.2.3. Construcción de pCEFL-KLA-PTEN-LTV	41
3.2.3.1. Digestión de KLA-PTEN-LTV y pCEFL-EGFP	41
3.2.3.2. Confirmación de transformantes por medio de PCR.	42
3.3. Ensayos biológicos de la proteína recombinante	43
3.3.1. Actividad antiproliferativa de la proteína recombinante KLA-PTEN-LTV	43
3.3.2. Detección de la proteína recombinante	45

4. DISCUSIÓN	46
4.1. Evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica <i>in vitro</i> de los siRNA´s en estudio	47
4.2. RT-PCR cuantitativa de los siRNA´s	49
4.3 Diseño de la secuencia y actividad antiproliferativa de la proteína recombinante KLA-PTEN-LTV	49
5. CONCLUSIONES	52
6. PERSPECTIVAS.....	54
REFERENCIAS	56
ANEXO A (Preparación de medios de cultivo y soluciones)	61
ANEXO B (Secuencias de primers PI3KCA, AKT1, mTOR).....	63

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Clasificación de cáncer de mama.....	3
2. Clasificación de la familia de PI3K	7
3. Composición de la reacción de digestión (1.5 µg) para el gen de pUC57 KLA-PTEN-LTV	27
4. Composición de la reacción de digestión (1.5 µg) del plásmido pCEFL-EGFP 27	
5. Composición de la reacción de ligación (1:7) pCEFL con el inserto KLA-PTEN-LTV	28
6. Condiciones de la reacción de PCR	29
7. Condiciones de amplificación.....	30
8. Citotoxicidad en la línea celular Vero	34
9. Actividad antiproliferativa en la línea celular MCF-7	36
10. Actividad antiproliferativa en la línea celular HCC-1954	37

11. Actividad antiproliferativa en la línea celular SKBR3	38
12. Diseño de primers	41
13. Actividad antiproliferativa de la proteína recombinante	44

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de la proteína PTEN	11
2. Estructura de la nueva variante KLA-PTEN-LTV	13
3. Citotoxicidad de los siRNA´s en estudio en las células Vero	35
4. Actividad antiproliferativa de los siRNA´s en estudio en las células MCF-7	36
5. Actividad antiproliferativa de los siRNA´s en estudio en las células HCC-1954.....	37
6. Actividad antiproliferativa de los siRNA´s en estudio en las células SKBR3.....	38
7. Niveles de expresión relativa de genes en estudio	39
8. Gel de agarosa al 1 %. Digestión de KLA-PTEN-LTV y del vector pCEFL.	42
9. Gel de agarosa al 1 %. Confirmación de la transformación de KLA-PTEN- LTV	43

10.	Actividad antiproliferativa KLA-PTEN-LTV en MCF-7 y HCC-1954	44
11.	Imagen del Western blot	45

NOMENCLATURA

4E-BPs	Proteínas 4E de unión a mRNA
AGO2	Argonauta 2
AKT	Proteína cinasa B
ANOVA	Análisis de varianza
cDNA	DNA complementario
CPHPs	Péptidos <i>homing</i> de penetración celular
CPPs	Péptidos de penetración celular
dsRNA	RNA largos de doble cadena
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
EIF3	Factor de iniciación 3C
FDA	Administración de medicamentos y alimentos
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína verde fluorescente
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2

HRP	Peroxidasa de rábano picante
IFNα2	Péptido señal del interferón alfa-2
IgG	Inmunoglobulina G
Ki-67	Proteína marcadora de proliferación
MAPK	Proteína cinasa activadora de mitógeno
mRNA	ARN mensajero
mTOR	Diana de rapamicina
PBDs	Sistemas de liberación de fármacos basados en péptidos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Cinasa fosfatidilinositol 3
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PIP₃	Fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato
PIPs	Fosfoinosítidos
PTEN	Proteína homóloga fosfatasa y tensina
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
Rheb	Homólogo de Ras enriquecido de cerebro
RIPA	Ensayo de radioinmunoprecipitación
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA

RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RT	Retrotranscripción
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
S6K1	Cinasa ribosomal S6
siRNA	Pequeños RNA de interferencia
TAT	Tranactivador transcripcional esencial para la replicación de VIH
T-DM1	Ado-trastuzumab-emtansina
THP_s	Péptidos <i>tumor homing</i>
TOR	Proteína cinasa diana de rapamicina
TSC2	Complejo 2 de esclerosis tuberosa
WST-1	(4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de mama

El cáncer es de las principales causas de muerte a nivel mundial, en el año 2020 se presentaron aproximadamente 10 millones de muertes (1). Es una enfermedad que se caracteriza por la división de las células de manera descontrolada, provocando la formación de un tumor. Existen varios tipos de cáncer afectando a diferentes células del organismo. Específicamente el cáncer de mama es una de las neoplasias más frecuentes en la población mundial, en 2020 se presentaron 2, 296, 840 nuevos casos y se estimó una mortalidad de 666, 103 personas. En México se considera la primera causa de muerte en lo que respecta a la población femenina, en el año 2022 se registraron 23, 790 nuevos casos y 7, 799 defunciones. Las entidades con mayor mortalidad debido a esta enfermedad son Estado de México, Ciudad de México, Jalisco, Nuevo León y Veracruz (2).

1.2. Factores de riesgo y clasificación

Algunos de los factores de riesgo para el cáncer de mama son los biológicos: la presencia de alguna mutación en los genes BRCA1, BRCA2 y p53, tejido mamario denso; los reproductivos: exposición prolongada a estrógenos endógenos, uso de anticonceptivos orales, menarca temprana, menopausia tardía, primer embarazo después de los 30 años; y finalmente los relacionados al estilo de vida: consumo de alcohol, sobrepeso y obesidad e inactividad física (3).

El cáncer de mama se considera una enfermedad de tipo heterogénea. Es clasificada histológicamente en base a su localización de origen, en tumores ductales, los cuales representan un 80% y en tumores lobulares con tan solo un 10 al 15%. Sin embargo, la clasificación más común se basa en los perfiles de expresión de ciertos marcadores, dicha

clasificación se divide en 4 subtipos, dependiendo del tipo de receptor que se sobreexpresa o del porcentaje de la proteína marcadora de proliferación (Ki-67) (tabla 1) (4, 5).

Tabla 1. Clasificación de cáncer de mama

Subtipo	Receptor de Estrógeno	Receptor de Progesterona	Receptor de Factor de Crecimiento Epidermal Humano 2	Proteína marcadora de proliferación (Ki-67)
Luminal A	Positivo	Positivo	Negativo	<14 %
Luminal B	Positivo	Positivo	Negativo o positivo	≥ 14 %
HER2	Negativo	Negativo	Positivo	-
Triple Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	-

1.3. Cáncer de mama HER2 positivo

El receptor de factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) es una familia de receptores conformada por 4 miembros: HER1, HER2, HER3 y HER4. Son estructuralmente similares, constan de un dominio extracelular, una región transmembrana y un dominio intracelular. La función principal es regular la proliferación celular, supervivencia y diferenciación a través de las diferentes vías de transducción (6).

El gen ERBB2 codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), localizado en el cromosoma 17q12, presenta 1255 aminoácidos y tiene un peso de 185 kDa, el cual se encuentra amplificado en un 20- 25 % en cáncer de mama y por ende una sobreexpresión de la proteína HER2. Es un tipo de receptor huérfano debido a

que no cuenta con un ligando para su activación, por ende, se activa por medio de la heterodimerización con algún otro miembro de la familia (7, 8).

1.3.1. Estructura del receptor HER2

HER2 es un receptor de tipo transmembrana compuesto de tres dominios. El dominio extracelular se encuentra subdividido en cuatro: contiene dos sitios de unión a ligando rico en leucina y dos sitios ricos en cisteína; presenta la región transmembrana y el dominio intracelular con 500 residuos aproximadamente y está subdividido en tres partes: una región de yuntamembrana, dominio tirosina cinasa y una cola carboxilo terminal con varios sitios de fosforilación (6, 7).

1.3.2. Activación de la vía de señalización del receptor HER2

La activación de la familia EGFR es mediante un ligando, excepto para el receptor de HER2 que hasta el momento carece de ligando, por ello el dominio extracelular permanece en una conformación activamente constitutiva provocando la dimerización con algún miembro de EGFR, principalmente a HER3 o la sobreexpresión de la proteína provoca el incremento de una homodimerización (autofosforilación), al ocurrir dicho proceso se provoca la fosforilación de cinasa fosfatidilinositol 3 (PI3K) y por ende su dominio catalítico p110 convertirá al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) a fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato (PIP₃) que a su vez activa la vía de la proteína cinasa B (AKT), dicha vía participa en los procesos de proliferación, diferenciación, adhesión, migración, metástasis, angiogénesis, supervivencia y disminución de la apoptosis (9).

1.4. Tratamiento de cáncer de mama HER2 positivo

La terapia para el cáncer de mama HER2 positivo se establecerá de acuerdo con la etapa en que se encuentre este proceso, el cual puede ser temprano o metastásico. Sin embargo, este subtipo de cáncer se considera uno de los más agresivos, reduciendo la supervivencia de los pacientes. La Sociedad Americana de Oncología Clínica menciona 3 líneas de tratamiento con lo que se refiere a dicha enfermedad, las cuales son las siguientes: de primera línea los anticuerpos trastuzumab, pertuzumab y el quimioterapéutico taxano; segunda línea Ado-trastuzumab emtansina (T-DM1) y tercera línea lapatinib más capecitabina o paclitaxel y lapatinib más trastuzumab (5, 10).

1.4.1. Anticuerpos monoclonales

En la actualidad existen dos anticuerpos utilizados para frenar el cáncer de mama HER2 positivo. El primero es trastuzumab el cual es un anticuerpo humanizado que se une al dominio extracelular del receptor HER2 provocando un efecto anti-tumoral. Sin embargo, se presenta una resistencia del 70% en los cánceres que sobreexpresan HER2 y por ende los pacientes han presentado dicha resistencia al tratamiento. Otro anticuerpo utilizado es el pertuzumab, a diferencia del primero éste cuenta con varios epítopes por lo tanto facilita la unión al dominio extracelular y por ende bloquea la dimerización de HER2 y HER3, inhibiendo río abajo la señalización de la proteína cinasa activadora de mitógeno (MAPK) y PI3K (11, 12).

1.4.2. Moléculas pequeñas inhibidoras de tirosina cinasa

Lapanitib se aprobó por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) en el 2007, para aquellos pacientes donde no se presentaba buena respuesta a trastuzumab.

Dicha terapia inhibe la actividad tirosina cinasa de HER2 y HER1 suprimiendo la señalización de los receptores. También se administra en combinación con capecitabina, en los pacientes con cáncer de mama avanzado, así mismo se puede utilizar con otros fármacos (13).

1.4.3. Terapia combinada

Dicho tratamiento consiste en conjugar un anticuerpo monoclonal y algún quimioterapéutico, uno de ellos es TDM-1, el fármaco pertenece a los agentes antimetabólicos. El mecanismo de acción se basa en la interrupción del complejo HER2-HER3 y por ende inhibe la señalización de PI3K. Esta terapia ha mostrado eficacia en aquellos pacientes que presentan resistencia al anticuerpo o están en la etapa de metástasis (14).

1.5. Nuevas dianas terapéuticas

1.5.1. PIP₃

Los fosfoinosítidos (PIPs) son considerados fosfolípidos de tipo aniónicos, su principal función es como segundos mensajeros, por ende, regulan diversos procesos de señalización. Los lípidos de tipo fosfatidilinositol están conformados por dos cadenas de tipo acil, enlazadas a un anillo inositol por un fosfoglicerol. La formación de PIP₃, se genera debido a que el anillo inositol es fosforilado en la posición 3 por PI3K, esta formación es de tipo reversible y se requiere de fosfatasa (PTEN). PIP₃ regula una gran variedad de procesos celulares, entre los que destacan a nivel de membrana por la interacción con proteínas, así mismo en fagocitosis, pinocitosis, exocitosis y en la organización del citoesqueleto, activación de la vía de señalización AKT (14, 15)

1.5.2. PI3K

La cinasa fosfatidilinositol 3, forma parte de la familia de las cinasas lipídicas constituidas por dos subunidades (reguladora y catalítica). Hay tres clases de PI3K (tabla 2). La clase I es la más estudiada debido a su relación con el cáncer. La función de PI3KCA es la de fosforilar la posición 3 del anillo inositol de PIP₂ y por ende provocar un estímulo abajo y activar la vía de AKT. PI3K presenta diversas mutaciones en la subunidad p110 α confiriéndole una activación constitutiva. Por otra parte, la subunidad p85 también presenta mutaciones de tipo sustituciones o deleciones en el dominio SH2, así mismo se ha observado una sobreexpresión de los niveles provocando la activación de la vía y por ende la proliferación celular (16–18).

Tabla 2. Clasificación de la familia de PI3K

		Isoformas de la subunidad catalítica	Isoformas de la subunidad regulatoria
Clase I	Tipo A	p110 α , p110 β y p110 δ	p85 α , p55 α , p50 α , p85 β , p85 γ
	Tipo B	p110 γ	p101, p87
Clase II	Isoformas		
	PI3K-C2 α ,	PI3K-C2 β	PI3K-C2 γ
Clase III	VPS34-VPS15		

1.5.3. AKT

La proteína cinasa B está conformada por 3 isoformas Akt1, Akt2 y Akt3 cada una codificada por un gen diferente. El incremento de la actividad es debido al estímulo de

algunos factores de crecimiento y citocinas. AKT se encarga de regular diversos procesos celulares como metabolismo, proliferación, supervivencia celular y angiogénesis. La activación de AKT va a depender de la fosforilación de serina/treonina para que provoque la mediación de ciertos sustratos río abajo. AKT regula negativamente ciertas proteínas pro-apoptóticas y, por otra parte, es un regulador positivo de ciertas señales de factores de crecimiento y de transcripción. Akt1 presenta mutaciones de tipo somáticas y éstas se han observado en aquellos pacientes con cáncer de mama. Por otra parte, se ha encontrado amplificada y sobreexpresada la isoforma de Akt2 en algunos tipos de cáncer (19, 20).

1.5.4. mTOR

El complejo 1 TOR, su principal subunidad catalítica es la proteína cinasa diana de rapamicina (TOR). Su función es la regulación de la biogénesis ribosomal y la síntesis de proteínas, dichos procesos son regulados por la fosforilación/inactivación de los represores de proteínas 4E de unión a mRNA (4E-BPs) y por fosforilación/activación de la cinasa ribosomal S6 (S6K1). Algunos factores de crecimiento son reguladores positivos de mTORC1, esto sucede principalmente por la activación de PI3K que envía una señal río abajo y por ende activa a Akt y éste activa a mTORC1. Akt puede activar a mTORC1, por medio de una fosforilación directa al complejo 2 de esclerotic tuberosa (TSC2), la cual inhibirá la actividad de pequeñas GTPasas, y el homólogo de Ras enriquecido de cerebro (Rheb) será requerido para la activación de mTORC1. Por lo anterior, se considera que mTORC1 es una importante diana, debido a que su activación participa en la proliferación celular (21).

1.6. Nuevas estrategias terapéuticas

1.6.1. Péptidos como sistemas de entrega de fármacos

En la actualidad la quimioterapia contra el cáncer carece de especificidad y sus efectos se dirigen hacia células cancerígenas y normales; por lo anterior en los últimos años se ha estudiado la búsqueda de una terapia dirigida. El uso de péptidos como sistemas de liberación de fármacos basados en péptidos (PBDs) hacia ciertas dianas se encuentra en exploración, existen 3 diversas clases de péptidos: péptidos *tumor-homing* (THPs), péptidos de penetración celular (CPPs) y péptidos *homing* de penetración celular (CP-THPs). Las funciones de cada uno son diversas, los THPs realizan la liberación de fármacos en la superficie de la célula, los CPPs tienen la capacidad de internalizar las membranas y los CP-THPs llevan a cabo ambas funciones, el de reconocimiento a nivel celular e internalización (22, 23).

1.6.1.1. Péptidos *tumor homing*

Este tipo de péptidos se caracterizan por contener secuencias cortas de 3 a 15 aminoácidos, reconocen células tumorales (sus principales dianas son receptores células), también pueden internalizar la célula, por ende, pueden llegar a ser sistemas de liberación de fármacos y cuentan con poca afinidad a células normales, no son inmunogénicos y los costos de producción son bajos. El descubrimiento de THPs fue por medio de la tecnología de bibliotecas de visualización de fagos de manera *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo/in vivo*, a la fecha se han identificado una gran cantidad de péptidos que van dirigidos hacia diversos tipos de cáncer (22, 24).

El péptido LTVSPWY conocido como LTV, tiene una alta afinidad al receptor HER2, por ende, es considerado un THP; sin embargo, aún no se ha estudiado lo suficiente (25,

26). Con la finalidad de explorar la efectividad de LTV como péptido de entrega de fármaco, en dicho proyecto se estudió fusionado a una proteína que participa en la vía de señalización de AKT.

1.6.1.2. Péptidos de penetración celular

Los CPPs tienen permeabilidad celular hacia diferentes linajes de células. Las secuencias de dichos péptidos se usan para la generación de fusiones moleculares como péptido/proteína permeable a células, péptido/ácidos nucleicos y péptidos de complejos químicos pequeños (27). El primer CPP y más estudiado es el transactivador de transcripción de HIV-1 (TAT), siendo una estrategia prometedora para el tratamiento de diversas enfermedades. Específicamente TAT se ha usado para transportar moléculas pequeñas, anticuerpos, péptidos terapéuticos, proteínas y ha sido conjugado a liposomas, se ha funcionalizado con nanopartículas, pequeños RNA de interferencia (siRNAs) y oligonucleótidos antisentido; así mismo, se ha evaluado en diversas líneas celulares y en modelos de animales (28, 29).

Otro ejemplo de CPP es KLALKLALKALKAALK (KLA), derivado del modelo anfipático MAP–KLALKLALKALKAALKLA, desarrollado por primera vez en 1991 por Steiner *et al.* (30, 31) . Estos péptidos han demostrado una fuerte interacción con membranas celulares, permitiendo la traslocación de diferentes moléculas, entre las que destacan nanopartículas, oligonucleótidos, péptidos y proteínas (32).

1.6.2. Proteína PTEN

El gen PTEN codifica la proteína homóloga fosfatasa y tensina se localiza en el cromosoma 10q23.31 contiene 403 aminoácidos y pesa 47 kDa. PTEN es considerada un gen supresor de tumor; sin embargo, se presentan mutaciones, deleciones o pérdida de la expresión en diversos tipos de cáncer. En cáncer de mama existe una pérdida de la función que va de un 30-40 % (33).

Estructuralmente contiene 5 dominios: de unión a PIP₂, dominio fosfatasa, dominio C2, C-terminal y el dominio de unión a PDZ (figura 1). Cada uno de ellos interfieren con la estabilidad, actividad, localización de la proteína e interacción con algunas otras proteínas (34).

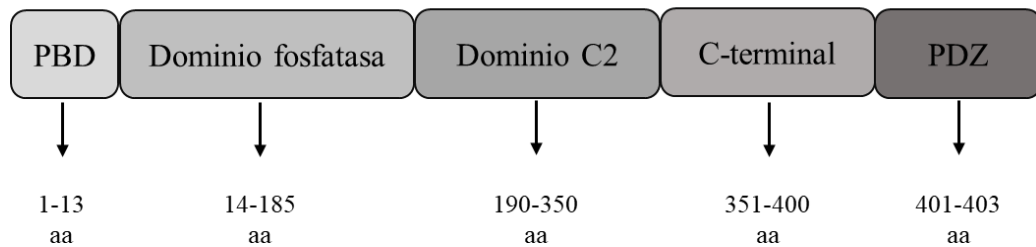


Figura 1. Estructura de la proteína PTEN

PTEN pertenece a la familia de proteínas tirosina/fosfatasa, su principal actividad dual es desfosforilar proteínas y fosfolípidos. Su sustrato es el segundo mensajero PIP₃, el cual es hidrolizado para convertirlo a PIP₂ y, por ende, al realizar dicha función inhibe la activación de la vía PI3K/AKT. Las funciones de PTEN son inhibición del crecimiento celular, la migración, detención del ciclo celular, estabilidad genética, metabolismo e

inducción de apoptosis. Se localiza principalmente a nivel de membrana, así mismo está presente en el citoplasma, núcleo, mitocondria, en membranas asociadas a mitocondrias y en algunos organelos celulares (18, 33).

Los mecanismos de regulación postraduccionales de PTEN es que participan en la inhibición de la actividad de la proteína. Algunas de las modificaciones que presenta son: fosforilaciones, acetilaciones, oxidaciones, ubiquitinaciones, entre otras (35, 36).

Se ha identificado una variante de PTEN que es PTEN-long y es considerada una fosfatasa lipídica que es permeable a la membrana, contiene 173 aminoácidos más en la parte N terminal que la proteína original PTEN, por lo tanto, contiene 576 aminoácidos. PTEN-long tiene un codón de inicio diferente, en este caso comienza en el sitio 513 pb río arriba del codón de inicio de la traducción de la proteína PTEN, el codón de inicio de PTEN-long es CUG. PTEN-long es secretada al espacio extracelular e interacciona con otras células, debido a que contiene un fragmento de poliarginina y polialanina. Su ingreso a la célula inhibe la vía de señalización PI3K de manera *in vitro* e *in vivo* (35, 37).

Son importantes las funciones que desempeña la proteína PTEN y por ende el papel que lleva a cabo en los procesos de señalización, con base a lo anterior se generó una nueva variante de PTEN (KLA-PTEN-LTV) (figura 2), con la finalidad de inactivar la vía de señalización acoplada a HER2 y así disminuir el proceso de proliferación celular.

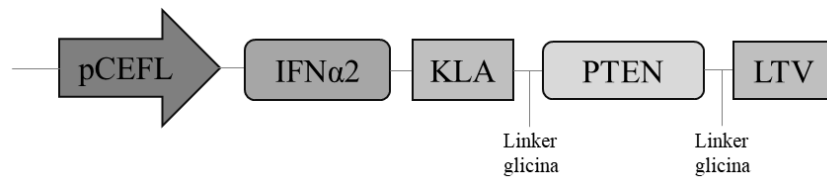


Figura 2. Estructura de la nueva variante KLA-PTEN-LTV

1.6.3. RNA's de interferencia

Los RNAi son pequeñas cadenas dobles de RNA, su función se basa en el mecanismo de regulación de la expresión de genes a nivel post-transcripcional. Son considerados como una nueva alternativa terapéutica para una gran diversidad de patologías, principalmente en el caso del cáncer (38).

El proceso por el cual regulan la expresión de genes es por medio de la degradación del mRNA. Iniciando con los RNA largos de doble cadena (dsRNA), los cuales serán cortados por la enzima Dicer, generando fragmentos pequeños de RNA de interferencia de doble cadena (siRNA), estos van a interactuar con el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), es en dicho complejo donde la endonucleasa argonauta 2 (AGO2) va a escindir la cadena pasaje (sentido) del siRNA y la cadena guía (antisentido) se asocia con RISC, es aquí donde la cadena antisentido se activa uniéndose al mRNA y comienza la degradación, provocando así la disminución de la expresión (39).

Algunas de las características de los RNA's para ser considerados estables y con una buena eficiencia son las siguientes: un tamaño de aproximadamente 21 nucleótidos y en el extremo 3' debe contener dos nucleótidos libres preferentemente U los cuales sirven para el reconocimiento de la maquinaria de los RNAi, para la estabilidad termodinámica

el extremo 5' de tipo inestable debe contener A o U para que pueda interaccionar con la proteína AGO mientras que la cadena pasajera se caracteriza por su contenido de C y G en el extremo 5' con la finalidad de no ser reconocida por AGO, así mismo, el siRNA debe contener aproximadamente 30-50 % de GC, esto con la finalidad de no disminuir la funcionabilidad (39, 40).

En la actualidad diversas compañías farmacéuticas están enfocadas en los estudios de fases clínicas de diversos siRNA con distintas dianas y hacia una gran diversidad de los diferentes tipos de cáncer, debido a que en el mercado aún no se autoriza la comercialización de un medicamento basado en esta estrategia terapéutica, por lo anterior en el presente trabajo se busca continuar con el estudio de siRNA's con la finalidad de regular la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR.

1.7. Antecedentes

La tecnología de RNAi ha sido estudiada en los últimos años para el tratamiento de diversas enfermedades causadas por una inapropiada actividad génica, particularmente el cáncer, a continuación, se mencionan antecedentes de evaluación de la interferencia de RNA sobre las dianas estudiadas en el presente trabajo. Liu et al. evaluaron la relación del factor de transcripción SALL4, el cual participa en varios carcinomas, principalmente en gliomas. Las líneas celulares U87 y U251 fueron transfectadas con siRNA, se evaluó la proliferación, el ciclo celular y la relación de SALL4 con PTEN, PI3K y AKT. Los resultados demostraron una reducción de la proliferación celular debido a la inhibición de la expresión de SALL4, también se produjo un aumento en la expresión de la proteína PTEN y por ende se reprimió la activación de PI3K/AKT (41).

Zhou *et al.* determinaron los niveles de expresión del miR-135a y la relación que tenía con los procesos de proliferación, migración, invasión, apoptosis y angiogénesis en líneas celulares de cáncer de células pequeñas de pulmón, así mismo la relación con la vía IGF-1/PI3K/AKT. Formaron 6 grupos de tratamientos: grupo 1 blanco, grupo 2 control negativo, grupo 3 miR-135a mimético, grupo 4 inhibidor de miR-135a, grupo 5 siRNA-IGF-1 y grupo 6 inhibidor de miR-135a+siRNA-IGF-1. Los resultados que obtuvieron fueron que el grupo 3 y 6 suprimieron la proliferación, invasión, migración e indujeron apoptosis en la línea celular A549, también demostraron una reducción en los niveles de proteínas de la vía en estudio (42).

Zhou *et al.* estudiaron el efecto de un factor de cohesina y del gen *NIPBL* en líneas celulares de cáncer de mama, y observaron la respuesta que presentaban con respecto al ciclo celular, apoptosis y autofagia. Se transfectaron siRNA-NIPBL1 y siRNA-NIPBL2 obteniendo mejores resultados en la línea MCF-7 y Bcap37. Dicha transformación inhibió la proliferación celular, invasión y migración. La baja regulación de NIPBL detuvo el ciclo celular en la fase G0/G1 e indujo apoptosis y autofagia, llevándolo a cabo por medio de caspasa 3 y afectando la vía de señalización de mTOR (43).

Li *et al.* evaluaron la expresión del miR-452 en tejidos de pacientes con cáncer de mama y en aquellas que presentaban metástasis, así mismo en diferentes líneas de cáncer de mama. Los niveles de expresión de miR-452 en pacientes con cáncer metastásico eran más bajos que las pacientes solo con cáncer, puede asociarse que los bajos niveles están directamente involucrados con el proceso de metástasis, por otro lado, se realizaron ensayos de migración e invasión solo en las líneas celulares, se demostró que la sobreexpresión del miR-452 logró inhibir la capacidad de migración en las líneas celulares

MCF-7 y MDA-MB.231. Además, se buscó bajar los niveles de la proteína (RAB11A) y comprobar el efecto del miR-452, se llevó a cabo una transfección con siRNA dirigido a la proteína. Se comprobó que RAB11A disminuyó en dos líneas celulares (44).

Zhao *et al.* mencionan que el factor de iniciación 3C (EIF3 por sus siglas en inglés) es un oncogen que se encuentra sobreexpresado en varios tipos de cáncer, por ende, se involucra en la tumorigénesis y en la proliferación celular, por lo que realizaron la transfección de siRNA-EIF3C en líneas celulares de cáncer de mama. Los niveles de EIF3C disminuyeron en la línea celular MDA-MB-231, se presentó una disminución de la proliferación celular y se indujo apoptosis, se observó que la vía mTOR está involucrada con la eficiencia tradicional de EIF3C (45).

Se han aprobado más de 350 proteínas terapéuticas hasta la fecha. Recientemente, con el desarrollo de nuevas tecnologías como la mutagénesis sitio-dirigida, ingeniería de proteínas y recursos computacionales, se busca disminuir las limitaciones que tienen las proteínas. En ese sentido, exploramos una enzima con actividad supresora de tumor PTEN, así mismo, buscamos mejorar la afinidad y permeabilidad celular empleando péptidos como sistema de liberación de fármacos. Presentamos estudios recientes del péptido LTV con actividad *tumor homing*, el péptido de penetración celular KLA y de PTEN como regulador negativo de la vía de señalización PI3K/AKT. Shadidi identificó un pequeño péptido con alta especificidad para la línea celular de cáncer de mama SKBR3, con ayuda de la tecnología de visualización de fagos. El péptido LTVSPWY fusionado con la proteína verde fluorescente (GFP) y conjugado con un oligonucleótido antisentido, logró reducir los niveles de la proteína HER2 hasta un 60 % en la línea celular (46).

Jie *et al.* evaluaron una nanopartícula magnética conjugada con el péptido *homing* LTV, el cual estaba modificado (pegilado con quitosano). Comprobaron si con dicha modificación el péptido continuaba siendo selectivo para aquellas células que sobreexpresan HER2, los resultados mostraron que mantuvo la afinidad para dichas células (47).

Ramaker *et al.* realizaron un estudio comparativo de 474 CPP para evaluar la capacidad de internalización. Dicho estudio se llevó a cabo en la línea celular HeLa y se evaluaron en las mismas condiciones con respecto al número de células, concentración de péptidos, condiciones de incubación, método de evaluación, entre otras. Los resultados obtenidos en dicho estudio arrojaron 20 CPP con una buena internalización y entrega de cargos; entre ellos se encuentra el péptido KLA en el quinto lugar (48).

Silva *et al.* menciona las características que tienen los CPP, en específico aquellos que son anfipáticos con conformación α -hélice como MAP, dicho péptido está compuesto por alaninas, leucinas y lisinas (KLALKLALKALKAALKLA) y su habilidad para translocar oligonucleótidos, péptidos y pequeñas proteínas. Actualmente se estudian diferentes derivados de MAP (32).

Nguyen *et al.* diseñaron una proteína PTEN mejorada (ePTEN) con la capacidad de suprimir la vía de señalización PI3K. Ellos expresaron ePTEN en células de *Dictyostelium* obteniendo resultados de disminución de los niveles de PIP3 en la membrana plasmática, así como de fosforilación de AKT, proliferación celular y migración (49).

Lavictoire *et al.* produjeron una variante de PTEN-L, donde sustituyeron la parte long de la proteína por una secuencia de la cadena ligera de la Inmunoglobulina G, ellos la llamaron lclPTEN-L. Realizaron ensayos para evaluar si la proteína internalizaba de una

célula a otra, para ello evaluaron PTEN, PTEN-L y lclPTEN-L mediante un ensayo de video microscopía. Como resultado, lclPTEN-L mostró una secreción eficiente y una buena capacidad de transferencia hacia las células (50).

1.8. Justificación

El cáncer de mama ocupa el primer lugar a nivel mundial en la población femenina debido a que causa un mayor número de fallecimientos. Existen diversos tratamientos, entre los principales se encuentran el uso de anticuerpos monoclonales, terapia hormonal y el uso de pequeñas moléculas inhibidoras de diversas proteínas; sin embargo, en los últimos años ha aumentado el número de casos en los pacientes que presenta resistencia, específicamente al anticuerpo trastuzumab. Por otro lado, se buscan nuevos fármacos que actúen principalmente en el interior de las células con la finalidad de regular ciertos procesos que nos permitan contrarrestar dicha resistencia farmacológica. Por lo anterior con el uso de proteínas-recombinantes y la regulación de la expresión de algunos genes (PI3KCA/AKT/mTORC1) se espera obtener posibles fármacos biodirigidos.

1.9. Hipótesis

La proteína recombinante KLA-PTEN-LTV y los siRNA's tendrán un efecto antiproliferativo sobre líneas celulares que sobreexpresan HER2.

1.10. Objetivos

1.10.1. Objetivo General

Evaluar la actividad antiproliferativa de la proteína KLA-PTEN-LTV *in vitro* y determinar el efecto regulatorio de siRNA's sobre la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR en líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivo.

1.10.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la actividad citotóxica de los siRNA's por medio del ensayo de WST-1 en la línea celular Vero.
- Evaluar la actividad antiproliferativa de la proteína y de los siRNA's por medio del ensayo de WST-1 en líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivo y MCF-7.
- Determinar los niveles de expresión por medio de RT-qPCR de los genes *PIK3CA*, *AKT1*, *mTOR* después del tratamiento.
- Clonación de KLA-PTEN-LTV en un sistema procariótico.
- Expresión de la proteína KLA-PTEN-LTV en un sistema eucariótico.
- Detección de la proteína recombinante KLA-PTEN-LTV.

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos y equipos

La secuencia de KLA-PTEN-LTV fue sintetizado por la empresa GenScript®. Los oligonucleótidos se solicitaron con la compañía T4 Oligo®. El plásmido pCEFL-EGFP utilizado en el presente trabajo fue donado por el laboratorio de Vías de Señalización del Departamento de Farmacología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav).

Se emplearon las siguientes líneas celulares: cáncer de mama **SKBR3** obtenidas de The American Type Culture Collection (ATCC®) con número de catálogo ATCC®: HTB-30™, **MCF-7** (ATCC®: HTB-22™), **HCC-1954** (ATCC®: CRL-2338™) y la línea celular normal de riñón de mono verde (**Vero**) (ATCC®: CCL-81™) y **HEK-293T** (ATCC®: CRL-3216™) donada por el Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Los siRNA´s se adquirieron de Merck KGaA (Darmstadt, Germany). siRNA PIK3CA con número de ID (SASI_Hs01_00219342), siRNA AKT1 (SASI_Hs01_00205550), siRNA MTOR (SASI_Hs01_00203150).

Los reactivos utilizados en este proyecto fueron: Trizol®, alcohol isopropílico, cloroformo, fenol, trisma base, tris-EDTA, glicerol, agarosa, red gel, lipofectamina 2000, SYBR Green, primers, DMSO, suero fetal bovino, tripsina-EDTA, medios de cultivo, WTS-1, enzimas de restricción, enzima T4, ADN polimerasa, antibióticos (ampicilina, penicilina/estreptomicina), reactivo de transfección Xfect™, membrana de fluoruro de polivinilideno, anticuerpos monoclonales PTEN (A2B1):sc-7974 y enolasa (L-27):sc-100812; todos ellos adquiridos de las siguientes compañías: New England BioLabs (Massachusetts, Estados Unidos), GE Healthcare (Illinois, Estados Unidos), Roche

(Indianapolis, IN, E.U.A.), Invitrogen (Carlsbal, CA, E.U.A.), Takara Bio Inc[®], (Shiga Prefecture, Japón), Danaher Corporation[®] (DC, USA), Santa Cruz Biotechnology[®], (Dallas, TX, USA), CTR Scientific (Monterrey, N.L., México), Echelon Biosciences (United States of American), Desarrollo de Especialidades Químicas S.A. de C.V. (Monterrey, N.L., México), SIGMA-ALDRICH (Saint Louis, MO, E.U.A).

Los equipos empleados: incubadora con CO₂ modelo 3403 (Thermo Scientific[®]), lector de microplacas ELISA modelo ELx800 (BIOTEK[®]), campana de flujo laminar modelo SG-303 (Baker[®]), centrífuga refrigerada modelo Sorval (Thermo Scientific[®]), microscopio invertido modelo Primovert (Carl Zeiss[®]), microcentrífuga modelo MicroC (Thermo Scientific[®]), termociclador modelo SimpliAmp (Thermo Scientific[®]), termociclador PCR-RT modelo Step one (AppleidBiosystem[®]), cámara de electroforesis modelo Mini-V 8.10 (Life Technologies[®]); la ubicación de dichos equipos se encuentra en el Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos de la Facultad de Ciencias Químicas y en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, ambos pertenecientes a la Universidad Autónoma de Nuevo León.

2.2. Evaluación de siRNA´s

2.2.1. Transfección de siRNA en líneas celulares

La transfección se realizó en todas las líneas celulares de cáncer de mama, mencionadas anteriormente y en la línea celular Vero.

Las células fueron cultivadas en medio libre de antibiótico, se colocaron 4×10^3 células por pocillo en una placa de 96 pozos para el ensayo de la actividad anticancerígena y para el caso de la actividad citotóxica, se colocaron 5×10^5 células por pocillo en una placa de

6 pocillos para el ensayo de RT-qPCR, cuando las células se encontraban con una confluencia del 60%. Para cada muestra de transfección, se preparó un complejo del siRNA y lipofectamina 2000 de la siguiente manera; 3 pmol de siRNA en 25 μ L de medio Opti-MEM sin suero. Posteriormente se diluyó 0.25 μ L de lipofectamina 2000 en 25 μ L de medio Opti-MEM, se mezcló e incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se mezcló el siRNA con la dilución de lipofectamina 2000 y se incubó durante 20 minutos. Se agregó dicho complejo (siRNA/lipofectamina 2000) en cada pocillo de la placa, se mezcló y se procedió a balancear suavemente la placa de un lado a otro. La placa se mantuvo en incubación a 37 °C con 5 % de CO₂ y se incubó de 24 a 96 horas. Una vez realizado el proceso de transfección el medio se reemplazó a las 6 horas.

2.2.2. Evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica *in vitro* de los siRNA´s en estudio por la técnica de WST-1

La actividad citotóxica se realizó con la línea celular Vero y la actividad anticancerígena con las líneas celulares de cáncer de mama antes mencionadas.

En el caso de los siRNA´s primeramente, se realizó el procedimiento de transfección mencionado anteriormente y ambas actividades se evaluaron en periodos de incubación de 24, 48, 72 y 96 h. Finalizado el período de incubación, se reemplazó el sobrenadante de la placa y se colocó en cada pocillo 10 μ L de (4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno (WST-1) y 90 μ L de medio correspondiente dependiendo de la línea celular con la que se trabajó, se incubó por 90 min a 37 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂ para finalmente medir la densidad óptica a 450 nm con un lector de microplacas (51).

El fármaco de referencia que se utilizó fue lapatinib probado a las mismas concentraciones; como control negativo se usaron las células sin ningún tratamiento y como blanco de reacción pocillos sin células solo con 90 μ L de medio y 10 μ L de reactivo WST-1. Los ensayos se realizaron independientemente y por triplicado. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 5.01 (Boston, MA, EE. UU.).

2.2.3. RT-PCR cuantitativa de los siRNA's

Los siRNA's fueron transfectados como se describió anterior y posteriormente se procedió con la iniciación del ensayo. La extracción del ARN se realizó en la línea celular SKBR3 de manera convencional con la técnica de trizol de acuerdo con las indicaciones del reactivo (Invitrogen). Se llevó a cabo el diseño de primers en base a las secuencias de los genes de interés y se analizaron con el programa OligoAnalyzer 3.1, se solicitó la síntesis con la compañía T4 Oligo; posteriormente se obtuvo el cDNA por medio de retro transcripción (RT), siguiendo las indicaciones mencionadas de SuperScrip IV *reverse transcriptase*. Posteriormente para la qPCR el periodo de incubación fue 50 °C por 2 minutos más 2 minutos para la pre-desnaturalización a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos para la desnaturalización a 95 °C, 1 minuto de alineación a 57 °C y 15 segundos para la extensión a 95 °C. La molécula reportera utilizada fue SYBR *Green*. Finalmente se realizó la cuantificación normalizada por el método matemático "Delta-delta Cq" ($\Delta\Delta Cq$) (52). El gen de referencia fue gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Cada una de las reacciones se realizaron por triplicado, como control negativo se usó una muestra sin transfectar siRNA's.

2.3. Clonación de KLA-PTEN-LTV

2.3.1. Secuencia del gen PTEN

La secuencia para el sistema de expresión del gen PTEN se obtuvo de la base de datos del GenBank a través del NCBI. La secuencia obtenida fue NG_000314.8 la cual corresponde al mRNA de PTEN. Posterior a la secuencia se realizaron 6 modificaciones de aminoácidos de acuerdo con la literatura (Nguyen et al.) y se agregaron en el extremo N-terminal el péptido de penetración celular KLA y en extremo C-terminal el péptido *homing* LTVSPWY, además, se agregaron sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción BglII y BamHI, se solicitó la síntesis de la secuencia con la empresa GenScript. Finalmente se agregó la secuencia del péptido señal del interferón alfa-2 (IFN α 2) para promover la secreción de la proteína.

2.3.2. Diseño de primers

Se llevó a cabo el diseño de un par de primers con base a la secuencia del gen de interés. Fueron analizados en el programa bioinformático OligoAnalyzer 3.1 y se solicitó la síntesis con la compañía T4 Oligo.

2.3.3. Propagación del gen en *E. coli* DH5 α

2.3.3.1. Transformación de pUC57 KLA-PTEN-LTV

Se llevó a cabo en las bacterias competentes de *E. coli* DH5 α . Se tomaron 10 ng del plásmido y se mezclaron con 50 μ L de la cepa de *E. coli*, se incubaron durante 20 minutos en hielo, posteriormente se procedió con el choque térmico, que consistió en colocar la muestra a 44 °C durante 45 segundos, una vez que transcurrió el tiempo la muestra se colocó en hielo por 2 minutos y se agregaron 800 μ L de caldo LB e incubó a 37 °C en

agitación constante a 200 rpm durante 1 hora. Después se centrifugó a 12000 rpm durante 2 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejaron aproximadamente 50 μ L, se resuspendió el pellet y se colocó en placa de LB/ampicilina por la técnica de extensión, finalmente se incubó a 37 °C durante 16 horas.

2.3.3.2. Selección de colonias transformadas

Se seleccionó una colonia y se inoculó en un tubo con 6 mL de caldo LB y 6 μ L de ampicilina, se dejó incubando a 37 °C durante 16 horas a 220 rpm.

2.3.3.3. Extracción de ADN plasmídico

Se recolectó el contenido en tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 8000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Una vez obtenido el pellet se procedió a extraer el ADN plasmídico, utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep.

2.4. Construcción del plásmido recombinante

2.4.1. Digestión de pUC57 KLA-PTEN-LTV y pCEFL-EGFP

Se realizó una doble digestión para cada muestra. Con las enzimas de restricción BglII y BamHI se llevó a cabo una mezcla de reacción (tablas 3 y 4), se dejó incubando durante 2 horas a 37 °C, una vez transcurrido el tiempo se agregó 1 μ L de fosfatasa tanto a la muestra del vector de expresión, como del gen en estudio y se incubó durante 1 hora a la misma temperatura. Posteriormente se realizó la purificación de los insertos utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep.

Tabla 3. Composición de la reacción de digestión (1.5 µg) para el gen de pUC57 KLA-PTEN-LTV

Componente	Volumen (µL)
Buffer 10x	5
Agua milli-Q	26.2
ADN	16.8
BglII (10 U/µL)	1
BamHI (10 U/µL)	2
Vol. final	50

Tabla 4. Composición de la reacción de digestión (1.5 µg) del plásmido pCEFL-EGFP

Componente	Volumen (µL)
Buffer 10x	5
Agua milli-Q	36.3
ADN	6.7
BglII (10 U/µL)	1
BamHI (10 U/µL)	1
Vol. final	50

2.4.2. Reacción de ligación del vector con inserto de interés

Una vez digeridos el plásmido pCEFL-EGFP y el inserto KLA-PTEN-LTV se continuo con la reacción de ligación para la obtención de la molécula recombinante, en la tabla 5 se muestran las condiciones utilizadas en la reacción, se dejó incubando toda la noche a 4 °C.

Tabla 5. Composición de la reacción de ligación (1:7) pCEFL con el inserto KLA-PTEN-LTV

Componente	Volumen (μL)
Buffer 10x	3
Agua milli-Q	19.7
Plásmido	3.3
Inserto	3
Enzima ligasa (5 U/μL)	1
Vol. final	30

2.4.3. Transformación de pCEFL-KLA-PTEN-LTV

Se utilizó la bacteria *E. coli* DH5 α , se tomaron 10 ng del producto de ligación y se mezclaron con 50 μ L de bacterias. Se realizó el mismo procedimiento que en el apartado 2.3.3.1.

2.4.4. Selección de clonas y extracción de ADN

Se inocularon las bacterias que crecieron, ver el apartado 2.3.3.2., para posteriormente realizar la extracción y purificación del ADN, como se menciona en el apartado 2.3.3.3.

2.4.5. Confirmación de transformantes por medio de PCR

Para la confirmación se llevó a cabo una PCR con los primers correspondientes. Se preparó la muestra de reacción en un microtubo de 200 μ L agregando los reactivos indicados en la tabla 6. Posteriormente los tubos se colocaron en un termociclador y se programó a las condiciones mencionadas en la tabla 7. Una vez finalizados los ciclos se procedió a realizar un gel de agarosa al 1 % para la visualización de las amplificaciones.

Tabla 6. Condiciones de la reacción de PCR

Componente	Muestra (μL)	Control negativo (μL)
Buffer 10x	5	5
Agua milli-Q	41	41.5
ADN	0.5	0
<i>Reverse</i> (10 μM)	1	1
<i>Forward</i> (10 μM)	1	1
dNTP's (10 mM)	1	1
Enzima Vent (5 U/μL)	0.5	0.5
Vol. Final		50

Tabla 7. Condiciones de amplificación

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	95	2
Desnaturalización	95	1
Alineación	56	1
Amplificación	72	1.5
Extensión	72	2
Mantenimiento	4	/

2.5. Ensayos biológicos de la proteína recombinante

2.5.1. Transfección en HEK-293T para la expresión de la proteína

La expresión de la proteína KLA-PTEN-LTV se realizó en la línea celular HEK-293T utilizando el reactivo Xfect. A partir de un cultivo con 70 % de confluencia de células HEK-293T se sembraron 2×10^4 células en cada inserto en una placa de 24 pocillos con 250 μ L de DMEM por 24 h a 37 °C. Posteriormente se llevó a cabo la transfección con 1 μ g de plásmido con el polímero Xfect de acuerdo con las indicaciones del inserto, incubando por 4 h a 37 °C, después de ese tiempo se retiró el complejo y se agregó medio nuevo, dejando la transfección durante 48 h a 37 °C.

2.5.2. Evaluación de la actividad anticancerígena *in vitro* de KLA-PTEN-LTV por la técnica de WST-1

Con respecto a la actividad anticancerígena de la proteína en las líneas celulares HCC-1954 y MCF-7; se realizó la transfección en células HEK-293T como se menciona en el apartado 2.3.1., una vez transcurrido el tiempo, se procedió a realizar un co-cultivo sin contacto, en el cual se usaron insertos con un tamaño de poro de 0.4 μm , donde fueron colocadas células HEK-293T que expresaban KLA-PTEN-LTV y como control el vector pCEFL EGFP usando 0.3 μL de Xfect en 1 μg de cada plásmido durante 4 h, posteriormente se realizó el cambio de medio y los insertos fueron colocados en los pozos que contenían las células HCC-1954 y MCF-7, se incubaron durante 48 h a 37 °C y una atmósfera de 5 % de CO₂. Una vez transcurrido el periodo del ensayo se retiró el inserto y medio de cultivo y se agregó reactivo de WST-1 al 10 % e incubó durante 2 h a 37 °C. Finalmente se determinó la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (51). Los ensayos se realizaron independientemente y por triplicado. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 5.01 (Boston, MA, EE. UU.).

2.5.3. Detección de la proteína recombinante

La determinación de la expresión de la proteína KLA-PTEN-LTV se llevó a cabo usando un total de 5×10^5 células HEK-293T, se colocaron en placas de 6 pocillos durante toda la noche para el análisis de Western Blot. Posteriormente fueron transfectadas con 5 μg de la construcción de ADN pCEFL-KLA-PTEN-LTV y como control el vector pCEFL-EGFP usando el reactivo Xfect de acuerdo con las instrucciones del inserto. Después de 24 h, las células fueron procesadas de la siguiente manera. Se procedió a recolectar los sobrenadantes y concentrarlos por medio de ultrafiltración. Posteriormente

las células fueron recolectadas y lisadas con buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA). Los lisados celulares fueron centrifugados y se determinó la concentración de la proteína por medio del ensayo de Bradford (53). Las células fueron separadas por medio de SDS-PAGE y transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Los anticuerpos primarios que se utilizaron fueron un anticuerpo monoclonal de ratón anti-PTEN (A2B1; sc-7974) y el anticuerpo monoclonal de ratón anti- α -enolasa (1-17; sc-100812). Posteriormente las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Inmunoglobulina G (IgG) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se usó el sustrato de máxima sensibilidad *SuperSignal West Femto* para la detección de la proteína, utilizado de acuerdo con las indicaciones de manufactura.

2.6. Manejo de residuos

El manejo de residuos se realizó con base a los lineamientos establecidos por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL. Los cultivos utilizados fueron esterilizados en autoclave y dispuestos en bolsas rojas (residuos biológico-infecciosos). Con respecto a los solventes como isopropanol, cloroformo, fueron depositados en el colector C. Geles de agarosa al 1 % se depositaron en el colector G. Guantes, puntillas, tubos eppendorf y demás material de plástico utilizados se colocaron en el contenedor de plástico impregnado con sustancias peligrosas.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS

3.1. Evaluación de siRNA's

3.1.1. Citotoxicidad de siRNA's en células Vero

Los datos de los ensayos de citotoxicidad de los siRNA's se muestran en la tabla 8, obteniendo porcentajes mínimos de muerte celular en la línea celular no cancerígena, en la figura 3 se muestra el gráfico de tiempo-respuesta de los diferentes siRNA's. Se presenta una inhibición celular de solo un 10% con el siRNA MTOR, observándose únicamente a las 24 h después del tratamiento. Se realizó una comparación de medias utilizando un análisis de varianza (ANOVA) con valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo de las diferencias entre medias, se compararon por separado cada siRNA a los diferentes tiempos y se realizó un análisis *post hoc*, de Tukey.

Tabla 8. Citotoxicidad en la línea celular Vero

Tiempo (h)	PI3KCA	AKT1	MTOR	Mix	Lapatinib
% de viabilidad ± DE					
24	96.94 ± 3.81	93.49 ± 3.45	89.91 ± 3.96	98.92 ± 5.66	87.24 ± 3.13
48	102.53 ± 6.98	105.44 ± 2.81	95.10 ± 4.48	92.00 ± 4.62	99.76 ± 7.44
72	100.72 ± 2.33	106.28 ± 1.06	106.28 ± 1.06	98.43 ± 1.89	101.31 ± 3.64
96	101.85 ± 3.71	114.21 ± 3.26	90.76 ± 4.10	95.07 ± 4.22	105.52 ± 4.39

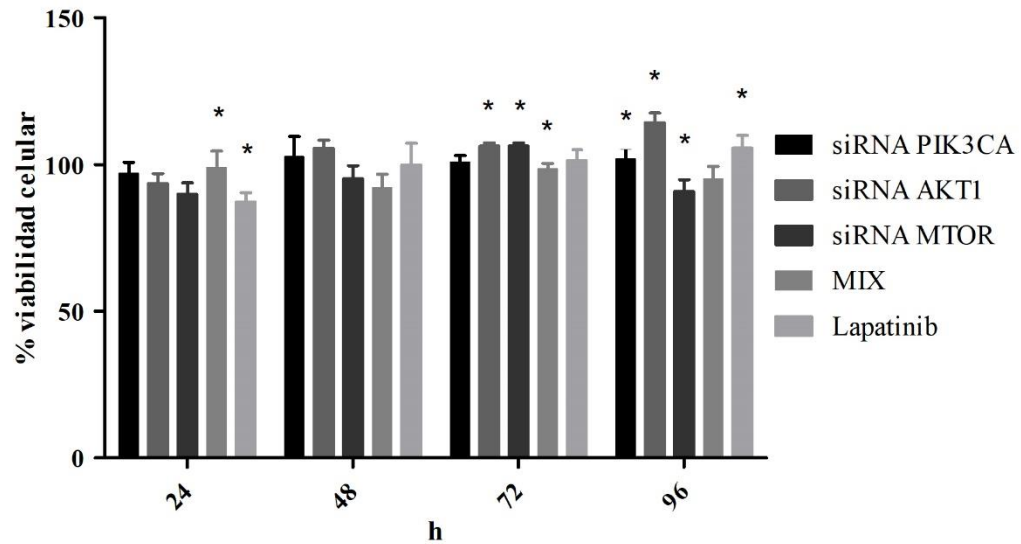


Figura 3. Citotoxicidad de los siRNA´s en estudio en las células Vero.

3.1.2. Actividad antiproliferativa de los siRNA´s en estudio

La evaluación de la actividad antiproliferativa de los siRNA´s en las líneas celulares MCF-7, HCC-1954 y SKBR3 con la técnica de WST-1. En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de MCF-7, en la tabla 10 resultados de HCC-1954 y en la tabla 11 los resultados de SKBR3. En la figura 4 se muestran las gráficas de tiempo-respuesta de los diferentes siRNA´s en la línea MCF-7, en la figura 5 los obtenidos con HCC-1954 y en la figura 6 los de SKBR3. En la línea celular de cáncer de mama que expresa receptor de estrógeno no se observó ningún efecto, mientras que de las líneas que expresan HER2 positivo, se observó un 14% de inhibición celular después de 96 h únicamente con el siRNA MTOR en HCC-1954 y en SKBR3 no se presentó ningún efecto estadísticamente

significativo entre las medias las cuales se determinaron realizando el mismo análisis que el utilizado para la actividad citotóxica.

Tabla 9. Actividad antiproliferativa en la línea celular MCF-7

Tiempo (h)	PI3KCA	AKT1	MTOR	Mix	Lapatinib
% de viabilidad ± DE					
24	102.72 ± 3.55	109.37 ± 1.47	110.19 ± 2.87	106.55 ± 4.56	86.92 ± 1.00
48	96.66 ± 4.96	97.56 ± 2.28	94.15 ± 3.19	89.65 ± 3.78	106.51 ± 2.98
72	107.24 ± 6.82	106.01 ± 3.81	98.52 ± 4.22	100.19 ± 3.96	94.05 ± 2.04
96	103.01 ± 4.35	107.38 ± 1.53	96.17 ± 1.84	96.02 ± 1.30	96.80 ± 1.19

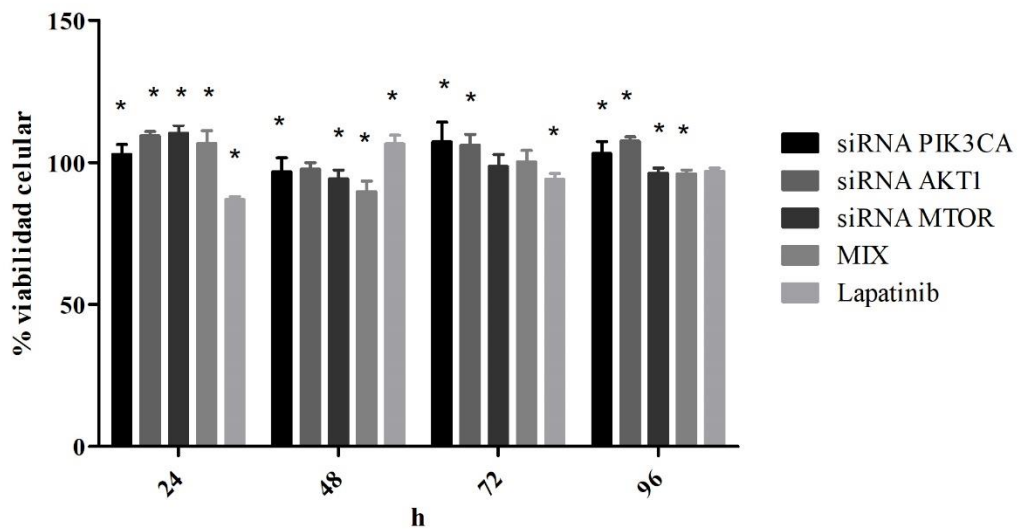


Figura 4. Actividad antiproliferativa de los siRNA´s en estudio en las células MCF-7. Las diferencias significativas se presentan (*) con un valor de $p < 0.05$.

Tabla 10. Actividad antiproliferativa en la línea celular HCC-1954

Tiempo (h)	PI3KCA	AKT1	MTOR	Mix	Lapatinib
% de viabilidad ± DE					
24	96.88 ± 5.43	100.25 ± 3.64	95.07 ± 4.76	99.27 ± 5.07	89.87 ± 2.31
48	117.74 ± 4.96	97.56 ± 2.28	94.15 ± 3.19	89.65 ± 3.78	106.51 ± 2.98
72	104.66 ± 7.50	108.71 ± 5.13	91.78 ± 6.44	89.35 ± 8.21	104.30 ± 2.36
96	108.17 ± 7.20	118.94 ± 4.12	85.97 ± 4.19	97.33 ± 2.47	88.58 ± 5.23

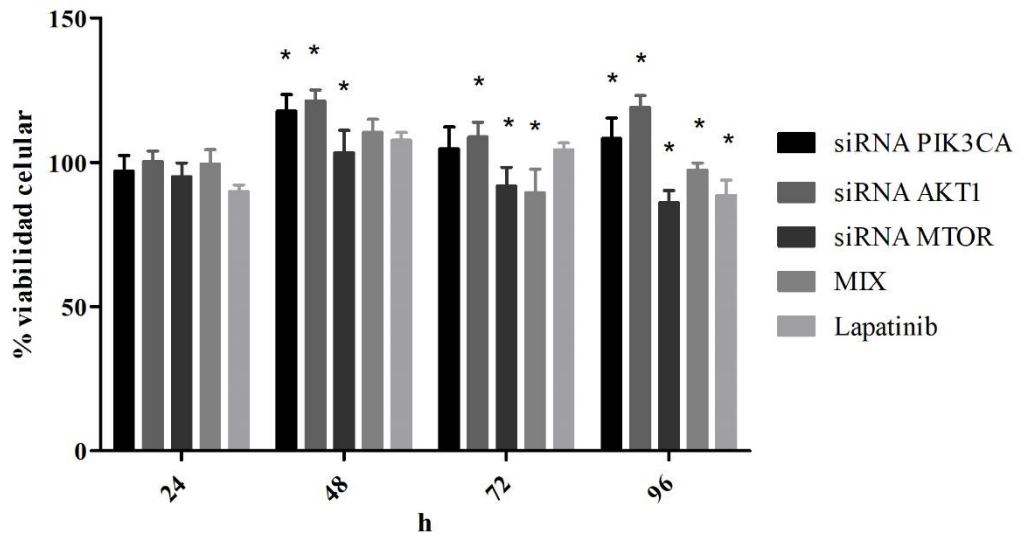


Figura 5. Actividad antiproliferativa de los siRNA´s en estudio en las células HCC-1954. Las diferencias significativas se presentan (*) con un valor de $p < 0.05$.

Tabla 11. Actividad antiproliferativa en la línea celular SKBR3

Tiempo (h)	PI3KCA	AKT1	MTOR	Mix	Lapatinib
% de viabilidad ± DE					
24	109.27 ± 5.53	104.24 ± 6.24	114.65 ± 8.73	118.83 ± 5.11	92.80 ± 2.46
48	113.49 ± 7.43	113.76 ± 6.29	112.39 ± 9.22	120.22 ± 4.04	120.78 ± 3.12
72	121.25 ± 2.64	119.60 ± 3.14	110.90 ± 3.53	113.82 ± 4.39	118.05 ± 3.39
96	121.34 ± 7.98	119.04 ± 3.25	95.05 ± 4.26	91.86 ± 7.43	100.70 ± 4.22

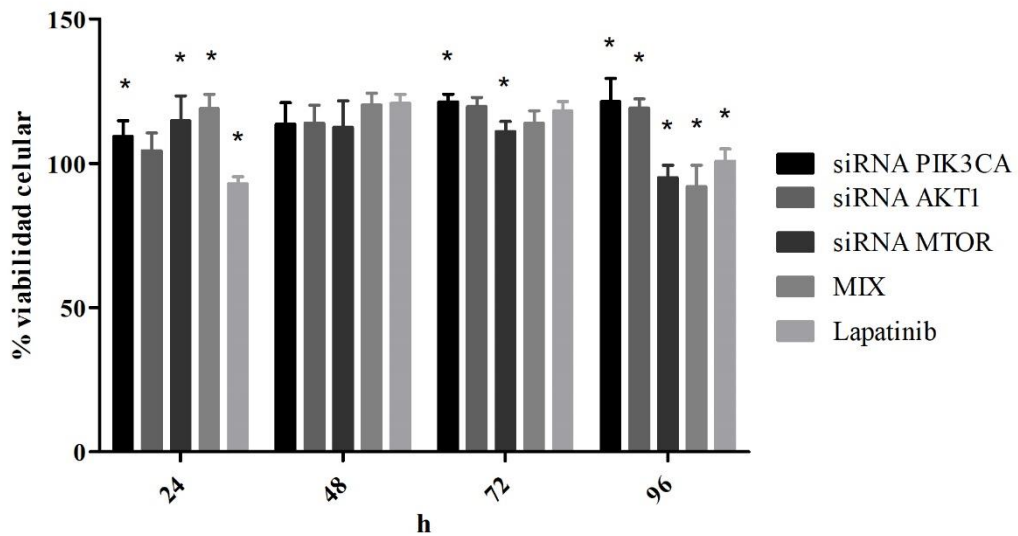


Figura 6. Actividad antiproliferativa de los siRNA's en estudio en las células SKBR3.

Las diferencias significativas se presentan (*) con un valor de $p < 0.05$.

3.1.3. RT-PCR cuantitativa de los siRNA's

Se analizó la expresión de los genes PIK3CA, AKT1 y MTOR y del gen de referencia GAPDH. En el análisis de la expresión se observó una disminución de 0.8 veces para PIK3CA, 0.57 en AKT1 y 0.23 para MTOR con respecto al control, tal como se observa en la figura 7. Se determinaron las diferencias estadísticamente significativas realizando el mismo análisis estadístico utilizado para la actividad citotóxica y antiproliferativa.

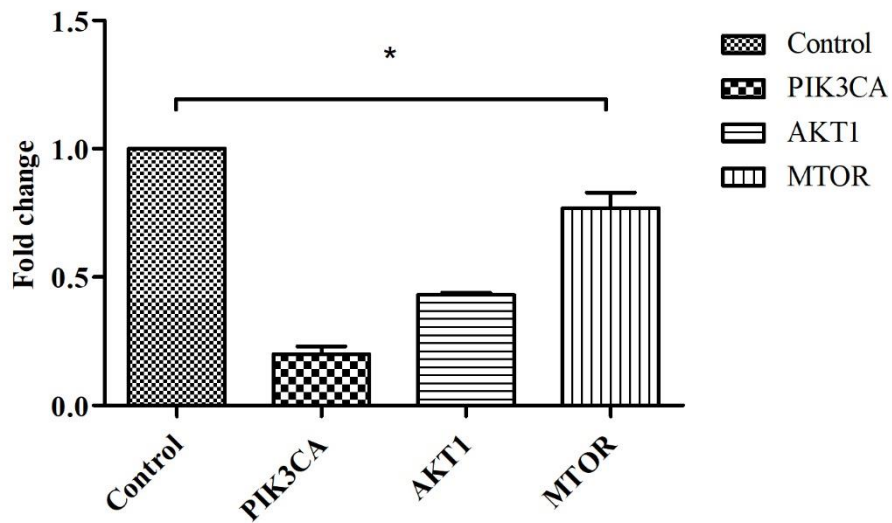


Figura 7. Niveles de expresión relativa de genes en estudio. Las diferencias significativas se presentan (*) con un valor de $p < 0.05$.

3.2. Clonación de KLA-PTEN-LTV

3.2.1. Secuencia del gen KLA-PTEN-LTV

Se muestra la secuencia de KLA-PTEN-LTV, se colocaron sitios de reconocimiento para las enzimas BglII y BamHI. Tiene un tamaño de 1497 pb.

Enzima BglII AGATCT

```
GGTACCAGATCTGCCACCATGGCCTTGACCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGCTCAGCTGCAAGTC
AAGCTGCTCTGTGGGCGCCATGGACTACAAGGACCACGACGGTACTACAAGGACCACGACATAGACTACA
AGGACGACGACGACAAGATGAAGTTAGCTTTAAAGTTAGCTTTAAAGGCTTTAAAGGCTGCTTTAAAGGGT
GGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTATGACAGCCATCATCAAAGAGATCGTTAGCAGAAACAAAAGGAGATATAG
AGAGGATGGATTGACTTAGACTTGACCTATATTTATCCAAACATTATTGCTATGGGATTTCCCTGCAGAAG
GTCTTGAAGGCGTATACAGGAACAATATTGATGATGTAGTAAGTTTTTTGGATTCAAAGCATAAAAAACCAT
TACAAGATATACAATCTTTGTGCTGATAGACATTATGACACCGCCAAATTTAATTGCAGAGTTGCACAATA
TCCTTTTGAAGACCATAACCCACCACAGCTAGAACTTATCAAACCTTTTGTGAGGATCTTGACCAATGGC
TAAGTGAAGATGACAATCATGTTGCAGCAATTCACATGAAAGCTGGAAAGGGACGAACTGGTGTAAATGATA
TGTGCATATTTATTACATCGGGGCAAATTTTTAAAGGCACAAGAGGCCCTAGATTTCTATGGGGAAGTAAG
GACCAGAGACAAAAAGGGAGTAACTATTCCCAGTCAGAGGCGCTATGTGTATTATTATAGCTACCTGTAA
AGAATCATCTGGATTATAGACCAGTGGCACTGTTGTTTCACAAGATGATGTTTGAAACTATTCCAATGTTT
AGTGGCGGAACCTTGAATCCTCAGTTTTGTGGTCTGCCAGCTAAAGGTGAAGATATATTCCTCCAATTCAGG
ACCCACACGACGGGAAGACAAGTTCATGTACTTTGAGTTCCTCAGCCGTTACCTGTGTGTGGTGATATCA
AAGTAGAGTTCTTCCACAAACAGTATAAGATGCTAAAAAAGGACAAAATGTTTCACTTTTGGGTAAATACA
TTCTTCATACCAGGACCAGAGGAAACCTCAGAAAAAGTAGAAAATGGAAGTCTATGTGATCAAGAAATCGA
TAGCATTGTCAGTATAGAGCGTGCAGATAATGACAAGGAATATCTAGTACTTACTTTAACAAAAAATGATC
TTGACAAAGCACACAAAGACAAAGCCAACCGATACTTTTCTCCAAATTTAAGGTGAAGCTGTACTTCACA
AAAACAGTAGAGGAGCCGTCAAATCCAGAGGCTAGCAGTTCAACTTCTGTAACACCAGATGTTAGTGACAA
TGAACCTGATCATTATAGATATTCTGACACCACTGACTCTGATCCAGAGAATGAACCTTTTGTATGAAGATC
AGCATAACACAAATTACAAAAGTCGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTTTTAACTGTTTCGCCTTGGTACTGA
GGATCC BamHI Enzima
```

3.2.2. Diseño de primers

A partir de la secuencia solicitada en GenScript se llevó a cabo el diseño de primers para dicha secuencia KLA-PTEN-LTV. En la tabla 12 se muestran las secuencias de cada uno.

Tabla 12. Diseño de primers

Primers	Secuencia	GC (%)	TM (°C)	Enzima
Forward	5' TAC ACC ATG GGT ATG ACA GCC ATC ATC ATC AAA G3'	45.2	61.4	BglII
Reverse	5'GCG CGG ATC CTC AGA CTT TTG TAA TTT GTG TG3'	46.7	61.3	BamHI

3.2.3. Construcción de pCEFL-KLA-PTEN-LTV

3.2.3.1. Digestión de KLA-PTEN-LTV y pCEFL-EGFP

A partir del ADN plasmídico purificado, se procedió a realizar la digestión de dicho gen de interés y del vector a utilizar para la construcción. En la figura 8 se muestra la imagen del gel, el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular, el carril 2 corresponde al vector pCFEL sin digerir, carril 3 se aprecia pCEFL digerido (fragmento de 6759 pb), carril 4 pUC57-KLA-PTEN-LTV sin digerir y carril 5 se observa la banda del corte de KLA-PTEN-LTV (fragmento de 1497 pb).

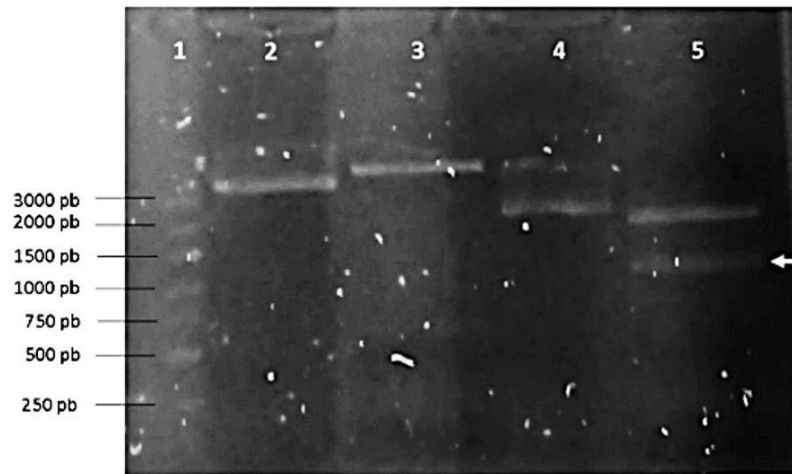


Figura 8. Gel de agarosa al 1 %. Digestión de KLA-PTEN-LTV y del vector pCEFL

3.2.3.2. Confirmación de transformantes por medio de PCR

Una vez obtenida la construcción pCEFL-KLA-PTEN-LTV se realizó una PCR para comprobar la correcta transformación en *E. coli* DH5 α , en la figura 9 el carril 1 se presenta el marcador de peso molecular, carriles 2-4 confirmación del amplicón pCEFL-KLA-PTEN-LTV.

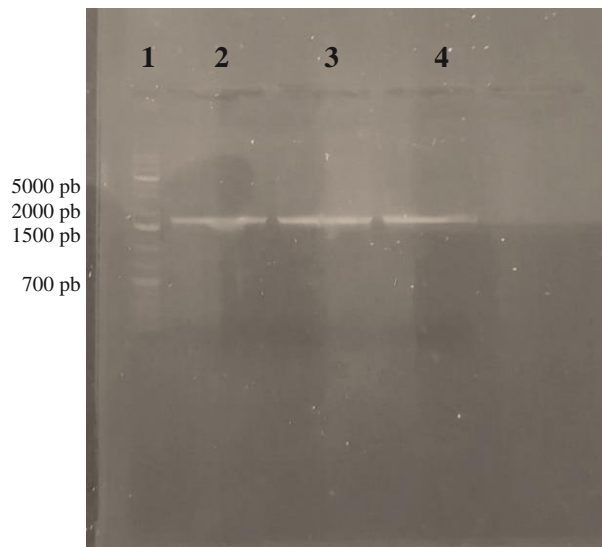


Figura 9. Gel de agarosa al 1 %. Confirmación de la transformación de KLA-PTEN-LTV

3.3. Ensayos biológicos de la proteína recombinante

3.3.1. Actividad antiproliferativa de la proteína recombinante KLA-PTEN-LTV

La evaluación de la actividad antiproliferativa de la proteína recombinante en las líneas celulares MCF-7 y HCC-1954 con la técnica de WST-1. En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos en porcentaje de inhibición y desviación estándar y en la figura 10 se observa el gráfico de actividad antiproliferativa de cada una de las líneas celulares. Se realizó una comparación de medias utilizando un análisis de varianza (ANOVA) con valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo y se realizó un análisis *post hoc*, de Tukey.

Tabla 13. Actividad antiproliferativa de la proteína recombinante

	Control	pCEFL-GFP	KLA-PTEN-LTV
% de viabilidad ± DE			
MCF-7	0 ± 0	0.11 ± 0.15	6.35 ± 1.98
HCC-1954	0 ± 0	1.63 ± 2.03	25.95 ± 0.90

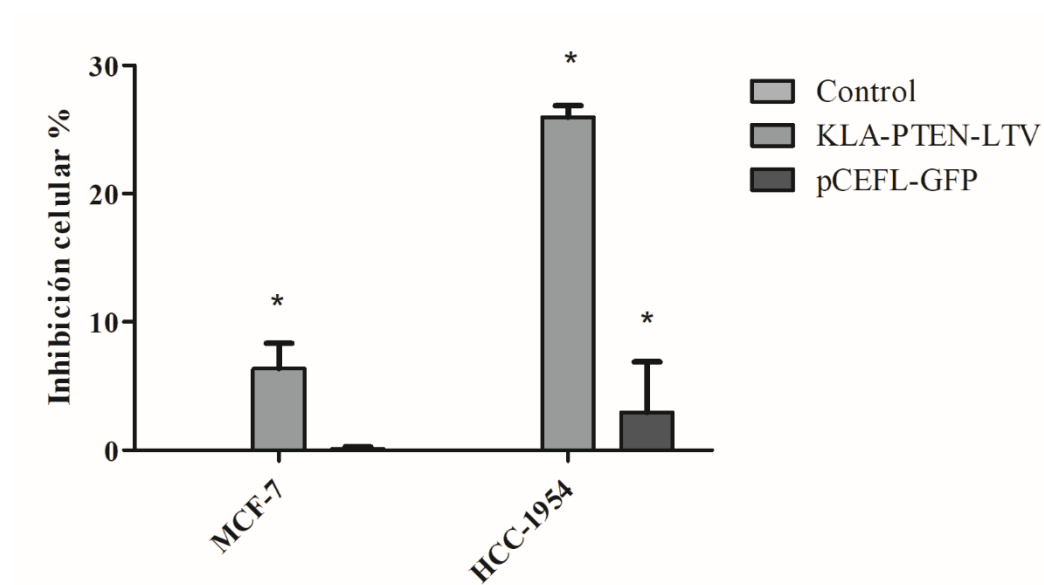


Figura 10. Actividad antiproliferativa KLA-PTEN-LTV en MFC-7 y HCC-1954.

Las diferencias significativas se presentan (*) con un valor de $p < 0.05$.

3.3.2. Detección de la proteína recombinante

La expresión de la proteína endógena y la recombinante PTEN fue analizada en los lisados celulares y sobrenadantes. En la figura 11 se muestra el análisis de Western blot de los lisados, observando una señal de 54 KDa correspondiente al tamaño de PTEN, dicha señal se observó en la construcción de KLA-PTEN-LTV.

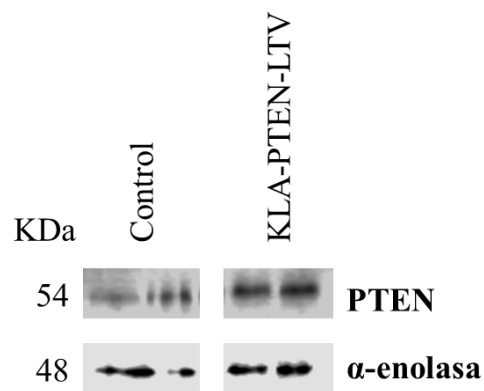


Figura 11. Imagen representativa del Western blot. Análisis de la expresión de PTEN, células HEK-293T fueron transfectadas con la construcción pCEFL-KLA-PTEN-LTV y como control células sin transfectar.

CAPÍTULO 4

4. DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica *in vitro* de los siRNA's en estudio

Los ensayos de los siRNA's realizados en la línea celular Vero, el pool y fármaco de referencia (lapatinib) analizados a 4 diferentes tiempos, no presentaron inhibición de la proliferación celular.

Con respecto a la línea celular MCF-7 y la evaluación de la actividad antiproliferativa, a ningún tiempo ocurrió una disminución de dicha actividad de manera significativa, solo un 11 % de inhibición se presentó a las 48 h con el pool de siRNA's; sin embargo, dicha línea es considerada como un control, debido a que tiene bajos niveles de expresión constitutiva de HER2 y altos niveles del receptor de estrógenos.

La línea celular HCC-1954 sobreexpresa HER2, a pesar de ello no se presentó una disminución de la viabilidad celular favorable con los siRNA en estudio y el pool. A las 96 h con el siRNA MTOR se observó un 14 % de inhibición, con el pool a 48 y 72 h se presentó una disminución de aproximadamente 10.5 %, siendo estos valores no significativos estadísticamente.

Con las células transfectadas en SKBR3, no se observó una reducción de la proliferación celular, a pesar de que dicha línea contiene una alta expresión de HER2. Solo una mínima reducción de 5 y 8 % a las 96 h con el siRNA MTOR y el pool, respectivamente.

Santi y Lee (2011) evaluaron las 3 isoformas de AKT utilizando siRNA's, solos y en combinación en la línea celular MDA-MB231, observaron la disminución de la proliferación a las 120 h después de la transfección, así mismo, el que obtuvo una menor

disminución fue con AKT2 siRNA (54). Con dichos resultados se observa que el siRNA que se evaluó en dicha investigación es con la isoforma de AKT1 y no presentó inhibición a ningún tiempo siendo este la máxima exposición a 96 h. Es importante mencionar que se tendría que estudiar porque mecanismo la isoforma AKT1 se involucra en la regulación de la proliferación celular y de supervivencia.

También se ha reportado una disminución significativa de la viabilidad celular a las 72 h en la línea celular de colon HCT116 usando siRNA's dirigidos a PIK3R1, PIK3CA, AKT1 Y AKT2; sin embargo, el más grande efecto se presentó en la vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR con el PIK3CA siRNA, así mismo se observó un efecto en la línea DLD-1. Al evaluar PIK3CA siRNA en ensayos de apoptosis, este tuvo un insignificante efecto apoptótico, dicho estudio proporcionado por Valentino *et al.* (2012) (55). Sin embargo, en la investigación realizada no se obtuvo un resultado significativo en los ensayos de proliferación celular con el uso del PIK3CA siRNA dirigido a la vía de AKT en el modelo de líneas celulares de cáncer de mama.

En 2022, Silva *et al.* Evaluaron siPIK3CA en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, por 2 métodos de transfección, usando lipofectamina y el uso de exosomas. Mostrando un efecto significativo de disminución de la viabilidad celular en ambas líneas, el efecto máximo fue detectado a las 48 h con el uso de lipofectamina, mientras con electroporación la disminución se presentó a las 3 y 6 h después del tratamiento (56). Sin embargo, en dicho estudio no se observó un efecto inhibitorio significativo con siPIK3CA esto debido a las concentraciones usadas y el tipo de líneas celulares.

4.2. RT-PCR cuantitativa de los siRNA's

Para confirmar los resultados obtenidos de la actividad antiproliferativa, se procedió a medir los niveles de expresión de los diferentes genes en estudio PIK3CA, AKT1 y MTOR por medio de qRT-PCR, en la línea celular SKBR3, la extracción de RNA fue a las 24 h después de la transfección con el respectivo siRNA.

A pesar de que los siRNA en estudio no mostraron un efecto antiproliferativo en ninguna línea celular, al observar la expresión si hubo una disminución en todas las dianas; sin embargo, el efecto no es significativo sobre la viabilidad celular.

Hasta el momento en la literatura no existen suficientes reportes sobre los niveles de expresión de los genes en estudio en la línea celular de SKBR3 y ni una cifra de referencia para el tipo de cáncer de HER2 positivo y de manera general de todos aquellos genes involucrados en la vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR. Kleivi *et al.* (2013) realizaron un estudio donde consideran que el amplicon de HER2, contiene múltiples genes implicados en el crecimiento celular y la resistencia a la terapia con el anticuerpo trastuzumab, y aunque se trata de inhibir la proliferación con algunos siRNA dirigidos a ciertas dianas, las células activan otras vías involucradas en el crecimiento celular (57).

4.3. Diseño de la secuencia y actividad antiproliferativa de la proteína recombinante

KLA-PTEN-LTV

En esta investigación, la secuencia de la proteína fue modificada con base al trabajo de Nguyen *et al.* en 2014. Crearon una nueva versión de PTEN incrementando la actividad fosfatasa e inhibiendo la fosforilación de AKT (49, 58). Por lo anterior, nosotros decidimos usar la variante de PTEN y mejorar la actividad agregando CPP en el extremo

N-terminal y un THP en el extremo C-terminal con la finalidad de tener afinidad a células de cáncer de mama HER2, generando la proteína quimérica KLA-PTEN-TLV.

PTEN-L es una variante traduccional de PTEN. PTEN-L puede ser secretada por la célula e internalizada en otras células, tal como lo describe Hopkins *et al.* (37). En nuestro estudio, el análisis de Western Blot reveló una mayor expresión intracelular de la proteína PTEN en las células HEK-293T transfectadas (1.3 veces KLA-PTEN-LTV, en comparación con la expresión endógena); sin embargo, no se detectó en los sobrenadantes. De forma similar a los resultados presentados por Lavictoire *et al.*, expresaron y evaluaron PTEN-L y su variante IcIPTEN-L, ambas proteínas se detectaron en los lisados celulares; sin embargo, PTEN-L no fue detectada en los sobrenadantes. Los autores propusieron que las células U87MG podrían recaptar las proteínas secretadas (50). Dicha hipótesis podría explicar la falta de KLA-PTEN-LTV a nivel extracelular y la acumulación a nivel del espacio intracelular. Por esta razón, establecimos el sistema de co-cultivo sin contacto como ensayo cualitativo para analizar la expresión, internalización y citotoxicidad de la proteína CPP-PTEN-THP.

Wu *et al.* expresaron PTEN y PTEN-long para observar el efecto de inhibición de la replicación de virus de Hepatitis C. La expresión intracelular de ambas proteínas se realizó con la transfección de células Huh-17, evaluadas con ensayos de luciferasa. La expresión intracelular fue evaluada con Western Blot usando anticuerpos específicos solo fue detectada PTEN y PTEN-long no fue visible (59). Estos resultados demuestran que es posible que PTEN-long tiene la capacidad de salir e ingresar a la célula, así mismo ciertas variantes como es el caso de nuestra proteína KLA-PTEN-LTV.

Para la evaluación de la actividad inhibitoria se utilizaron las líneas de cáncer de mama HCC-1954, la cual sobreexpresa HER2- positivo y MCF-7, negativa para HER2. Nuestros resultados mostraron un efecto citotóxico preferente a la línea HCC-1954, con una inhibición de 26 % y no observando tal efecto en las células MCF-7. Dichos resultados nos indican la posibilidad de que el péptido KLA interactúa con la membrana celular; Remaker *et al.* informó resultados similares con la línea celular HeLa en 2018, el péptido KLA fue uno de los 5 péptidos con mayor actividad de penetración celular (48). No obstante, es importante mencionar que, a pesar de ser un método cualitativo y rápido, el uso de un sistema de co-cultivo sin contacto para dicho fin tiene ciertas limitaciones, como las variaciones en las tasas de transfección y en los niveles de expresión de proteínas. Cabe mencionar que, en los últimos años, el estudio de la conjugación peptídica a diversos cargos moleculares ha mostrado un efecto favorable en la terapia del cáncer. Además, la proteína KLA-PTEN-LTV podría tener una actividad inhibitoria superior frente a las células HCC-1954 por dos razones: la primera se debería por la falta de PTEN endógeno funcional en esta línea celular, y la segunda por la afinidad del péptido LTV por HER2. Por lo tanto, se propone que la proteína pudiese ejercer el mismo efecto contra otras células cancerosas con sobreexpresión de HER2.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES

- Los siRNA´s en estudio no presentan citotoxicidad en la línea celular Vero.
- Ningún siRNA presentó actividad antiproliferativa en las líneas de cáncer de mama estudiadas.
- Se observó una disminución de los niveles de expresión de los siRNA´s en estudio en la línea celular SKBR3.
- El PIK3CA siRNA fue el que presentó una mayor disminución de la expresión.
- Se logró la expresión de la proteína recombinante en un sistema eucariótico.
- La proteína KLA-PTEN-LTV ejerce un efecto inhibitorio en la línea que sobreexpresa el receptor de HER2.

CAPÍTULO 6

6. PERSPECTIVAS

En el presente proyecto se evaluaron 2 tipos de estrategias terapéuticas, los siRNA´s y una proteína recombinante acoplada a CPPs y LTV como péptido *tumor homing*. Los resultados obtenidos en dicha investigación fueron contundentes para confirmar parte de lo que se menciona en la literatura y a su vez de beneficio para el planteamiento de nuevas expectativas.

Con respecto a siRNA´s es de suma importancia confirmar la transfección con la utilización de otros métodos, por ejemplo, con la incorporación de nanopartículas o el uso de marcaje; también es importante considerar evaluar diferentes concentraciones y otros tipos de líneas celulares.

En relación con la proteína KLA-PTEN-LTV será fundamental aumentar la expresión. Para mejorar la expresión se debe hacer uso de otros sistemas que permitan llevar a cabo la purificación de la proteína y realizar más estudios de evaluación biológica.

REFERENCIAS

- 1 Ferlay J EMLFLMCMMLPMZASIBF: Global Cancer Observatory: Cancer Today. . <https://gco.iarc.who.int/today>, 2024.
- 2 Estadísticas a propósito del día internacional de la lucha contra el cáncer de mama. México, 2023.
- 3 Shang C and Xu D: Epidemiology of Breast Cancer. *Oncologie* 24: 649–663, 2022. DOI: 10.32604/oncologie.2022.027640.
- 4 Smolarz B, Nowak AZ and Romanowicz H: Breast Cancer—Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers* 14: 2569, 2022. DOI: 10.3390/cancers14102569.
- 5 Loibl S, Poortmans P, Morrow M, Denkert C and Curigliano G: Breast cancer. *The Lancet* 397: 1750–1769, 2021. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32381-3.
- 6 Bai X, Sun P, Wang X, Long C, Liao S, Dang S, Zhuang S, Du Y, Zhang X, Li N, He K and Zhang Z: Structure and dynamics of the EGFR/HER2 heterodimer. *Cell Discov* 9: 18, 2023. DOI: 10.1038/s41421-023-00523-5.
- 7 Sigismund S, Avanzato D and Lanzetti L: Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol* 12: 3–20, 2018. DOI: 10.1002/1878-0261.12155.
- 8 Uribe ML, Marrocco I and Yarden Y: EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance. *Cancers* 13: 2748, 2021. DOI: 10.3390/cancers13112748.
- 9 Hou Y, Nitta H and Li Z: HER2 Intratumoral Heterogeneity in Breast Cancer, an Evolving Concept. *Cancers* 15: 2664, 2023. DOI: 10.3390/cancers15102664.
- 10 Morganti S, Ivanova M, Ferraro E, Ascione L, Vivinet G, Bonizzi G, Curigliano G, Fusco N and Criscitiello C: Loss of HER2 in breast cancer: biological mechanisms and technical pitfalls. *Cancer Drug Resistance* 5: 971–980, 2022. DOI: 10.20517/cdr.2022.55.
- 11 Najjar MK, Manore SG, Regua AT and Lo H-W: Antibody-Drug Conjugates for the Treatment of HER2-Positive Breast Cancer. *Genes* 13: 2065, 2022. DOI: 10.3390/genes13112065.
- 12 Cheng J, Liang M, Carvalho MF, Tigue N, Faggioni R, Roskos LK and Vainshtein I: Molecular Mechanism of HER2 Rapid Internalization and Redirected Trafficking Induced by Anti-HER2 Biparatopic Antibody. *Antibodies* 9: 49, 2020. DOI: 10.3390/antib9030049.

- 13 Stanowicka-Grada M and Senkus E: Anti-HER2 Drugs for the Treatment of Advanced HER2 Positive Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol* 24: 1633–1650, 2023. DOI: 10.1007/s11864-023-01137-5.
- 14 Luchini A, Nzulumike ANO, Lind TK, Nylander T, Barker R, Arleth L, Mortensen K and Cárdenas M: Towards biomimics of cell membranes: Structural effect of phosphatidylinositol triphosphate (PIP3) on a lipid bilayer. *Colloids Surf B Biointerfaces* 173: 202–209, 2019. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.09.031.
- 15 Lee MF and Trotman LC: PTEN: Bridging Endocytosis and Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Med* 10: a036103, 2020. DOI: 10.1101/cshperspect.a036103.
- 16 Thorpe LM, Yuzugullu H and Zhao JJ: PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer* 15: 7–24, 2015. DOI: 10.1038/nrc3860.
- 17 Dirican E and Akkiprik M: Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1 and phosphatase and tensin homolog as therapeutic targets in breast cancer. *Tumor Biology* 39, 2017. DOI: 10.1177/1010428317695529.
- 18 Nussinov R, Zhang M, Tsai C-J and Jang H: Phosphorylation and Driver Mutations in PI3K α and PTEN Autoinhibition. *Molecular Cancer Research* 19: 543–548, 2021. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-20-0818.
- 19 Revathidevi S and Munirajan AK: Akt in cancer: Mediator and more. *Semin Cancer Biol* 59: 80–91, 2019. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.06.002.
- 20 Shariati M and Meric-Bernstam F: Targeting AKT for cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 28: 977–988, 2019. DOI: 10.1080/13543784.2019.1676726.
- 21 Sun S-Y: mTOR-targeted cancer therapy: great target but disappointing clinical outcomes, why? *Front Med* 15: 221–231, 2021. DOI: 10.1007/s11684-020-0812-7.
- 22 Shoombuatong W, Schaduangrat N, Pratiwi R and Nantasenamat C: THPep: A machine learning-based approach for predicting tumor homing peptides. *Comput Biol Chem* 80: 441–451, 2019. PMID: 31151025. DOI: 10.1016/J.COMPBIOLCHEM.2019.05.008.
- 23 González-Cruz AO, Hernández-Juárez J, Ramírez-Cabrera MA, Balderas-Rentería I and Arredondo-Espinoza E: Peptide-based drug-delivery systems: A new hope for improving cancer therapy. *J Drug Deliv Sci Technol* 72, 2022. DOI: 10.1016/j.jddst.2022.103362.
- 24 Gautam A, Kapoor P, Chaudhary K, Kumar R, Drug Discovery Consortium O and Raghava GPS: Tumor Homing Peptides as Molecular Probes for Cancer Therapeutics, Diagnostics and Theranostics. *Curr Med Chem* 21: 2367–2391, 2014. DOI: 10.2174/0929867321666140217122100.
- 25 Hu C, Chen X, Zhao W, Chen Y and Huang Y: Design and Modification of Anticancer Peptides. *Drug Des* 5, 2016. DOI: 10.4172/2169-0138.1000138.
- 26 Sioud M: Phage Display Libraries: From Binders to Targeted Drug Delivery and Human Therapeutics. *Mol Biotechnol* 61: 286–303, 2019. DOI: 10.1007/S12033-019-00156-8.

- 27 Xie J, Bi Y, Zhang H, Dong S, Teng L, Lee RJ and Yang Z: Cell-Penetrating Peptides in Diagnosis and Treatment of Human Diseases: From Preclinical Research to Clinical Application. *Front Pharmacol* 11:697 2020. DOI: 10.3389/fphar.2020.00697.
- 28 Rizzuti M, Nizzardo M, Zanetta C, Ramirez A and Corti S: Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide. *Drug Discov Today* 20: 76–85, 2015. DOI: 10.1016/J.DRUDIS.2014.09.017.
- 29 Moku G, Layek B, Trautman L, Putnam S, Panyam J and Prabha S: Improving Payload Capacity and Anti-Tumor Efficacy of Mesenchymal Stem Cells Using TAT Peptide Functionalized Polymeric Nanoparticles. *Cancers* 11: 491, 2019. DOI: 10.3390/CANCERS11040491.
- 30 Scheller A, Oehlke J, Wiesner B, Dathe M, Krause E, Beyermann M, Melzing M and Bienert M: Structural requirements for cellular uptake of α -helical amphipathic peptides. *J Pept Sci* 5: 185–194, 1999. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1387(199904)5:4<185
- 31 Steiner V, Schär M, Börnsen KO and Mutter M: Retention behaviour of a template-assembled synthetic protein and its amphiphilic building blocks on reversed-phase columns. *J Chromatogr A* 586: 43–50, 1991. DOI: 10.1016/0021-9673(91)80023-A.
- 32 Silva S, Kurrikoff K, Langel Ü, Almeida AJ, Vale N, Silva S, Kurrikoff K, Langel Ü, Almeida AJ and Vale N: A Second Life for MAP, a Model Amphipathic Peptide. *Int J Mol Sci* 23: 8322, 2022. DOI: 10.3390/IJMS23158322.
- 33 Liu A, Zhu Y, Chen W, Merlino G and Yu Y: PTEN Dual Lipid- and Protein-Phosphatase Function in Tumor Progression. *Cancers* 14: 3666, 2022. DOI: 10.3390/cancers14153666.
- 34 Masson GR and Williams RL: Structural Mechanisms of PTEN Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 10: a036152, 2020. DOI: 10.1101/cshperspect.a036152.
- 35 Hopkins BD, Hodakoski C, Barrows D, Mense SM and Parsons RE: PTEN function: The long and the short of it. *Trends Biochem Sci* 39: 183–190, 2014. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.02.006.
- 36 González-García A, Garrido A and Carrera AC: Targeting PTEN Regulation by Post Translational Modifications. *Cancers* 14: 5613, 2022. DOI: 10.3390/cancers14225613.
- 37 Hopkins BD, Fine B, Steinbach N, Dendy M, Rapp Z, Shaw J, Pappas K, Yu JS, Hodakoski C, Mense S, Klein J, Pegno S, Sulis ML, Goldstein H, Amendolara B, Lei L, Maurer M, Bruce J, Canoll P, Hibshoosh H and Parsons R: A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter signaling and survival. *Science* 341: 399–402, 2013. DOI: 10.1126/science.1234907.
- 38 Zhang C and Zhang B: RNA therapeutics: updates and future potential. *Sci China Life Sci* 66: 12–30, 2023. DOI: 10.1007/s11427-022-2171-2.
- 39 Salim U, Kumar A, Kulshreshtha R and Vivekanandan P: Biogenesis, characterization, and functions of mirtrons. *WIREs RNA* 13: e1680, 2022. DOI: 10.1002/wrna.1680.

- 40 Traber GM and Yu A-M: RNAi-Based Therapeutics and Novel RNA Bioengineering Technologies. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 384: 133–154, 2023. DOI: 10.1124/jpet.122.001234.
- 41 Liu C, Wu H, Li Y, Shen L, Yu R, Yin H, Sun T, Sun C, Zhou Y and Du Z: SALL4 suppresses PTEN expression to promote glioma cell proliferation via PI3K/AKT signaling pathway. *J Neurooncol* 135: 263–272, 2017. DOI: 10.1007/s11060-017-2589-3.
- 42 Zhou Y, Li S, Li J, Wang D and Li Q: Effect of microRNA-135a on Cell Proliferation, Migration, Invasion, Apoptosis and Tumor Angiogenesis Through the IGF-1/PI3K/Akt Signaling Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry* 42: 1431–1446, 2017. DOI: 10.1159/000479207.
- 43 Zhou H, Zheng L, Lu K, Gao Y, Guo L, Xu W and Wang X: Downregulation of Cohesin Loading Factor Nipped-B-Like Protein (NIPBL) Induces Cell Cycle Arrest, Apoptosis, and Autophagy of Breast Cancer Cell Lines. *Medical Science Monitor* 23: 4817–4825, 2017. DOI: 10.12659/MSM.906583.
- 44 Li W, Li G, Fan Z and Liu T: Tumor-suppressive microRNA-452 inhibits migration and invasion of breast cancer cells by directly targeting RAB11A. *Oncol Lett* 14: 2559–2565, 2017. DOI: 10.3892/ol.2017.6426.
- 45 Zhao W, Li X, Wang J, Wang C, Jia Y, Yuan S, Huang Y, Shi Y and Tong Z: Decreasing Eukaryotic Initiation Factor 3C (EIF3C) Suppresses Proliferation and Stimulates Apoptosis in Breast Cancer Cell Lines Through Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway. *Medical Science Monitor* 23: 4182–4191, 2017. DOI: 10.12659/MSM.906389.
- 46 Shadidi M and Sioud M: Identification of novel carrier peptides for the specific delivery of therapeutics into cancer cells. *The FASEB Journal* 17: 256–258, 2003. DOI: 10.1096/fj.02-0280fje.
- 47 Du Y-Z, Jie, Cai, Wang, Ying, Yu and Zhang M: Actively-targeted LTVSPWY peptide-modified magnetic nanoparticles for tumor imaging. *Int J Nanomedicine* 7: 3981–3989, 2012. DOI: 10.2147/IJN.S33593.
- 48 Ramaker K, Henkel M, Krause T, Röckendorf N and Frey A: Cell penetrating peptides: A comparative transport analysis for 474 sequence motifs. *Drug Deliv* 25: 928–937, 2018. DOI: 10.1080/10717544.2018.1458921.
- 49 Nguyen HN, Yang JM, Afkari Y, Park BH, Sesaki H, Devreotes PN and Iijima M: Engineering ePTEN, an enhanced PTEN with increased tumor suppressor activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E2684–E2693, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1409433111.
- 50 Lavictoire SJ, Gont A, Julian LM, Stanford WL, Vlasschaert C, Gray DA, Jomaa D and Lorimer IAJ: Engineering PTEN-L for Cell-Mediated Delivery. *Mol Ther Methods Clin Dev* 9: 12–22, 2017. DOI: 10.1016/J.OMTM.2017.11.006.
- 51 Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y and Ueno K: Novel cell proliferation and cytotoxicity assays using a tetrazolium salt that produces a water-soluble formazan dye. *In Vitro Toxicol* 8: 187–190, 1995.

- 52 Schmittgen TD and Livak KJ: Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3: 1101–1108, 2008. DOI: 10.1038/nprot.2008.73.
- 53 Sedmark J and Grossberg S: A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem* 79: 544–552, 1977. DOI: 10.1016/0003-2697(77)90428-6.
- 54 Santi SA and Lee H: Ablation of Akt2 Induces Autophagy through Cell Cycle Arrest, the Downregulation of p70S6K, and the Dereglulation of Mitochondria in MDA-MB231 Cells. *PLoS One* 6: e14614, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0014614.
- 55 Valentino JD, Elliott VA, Zaytseva YY, Rychahou PG, Mustain WC, Wang C, Gao T and Evers BM: Novel small interfering RNA cotargeting strategy as treatment for colorectal cancer. *Surgery* 152: 277–285, 2012. DOI: 10.1016/j.surg.2012.05.006.
- 56 Silva R, Ferreira D and Rodrigues LR: Exosome-based delivery of RNAi leads to breast cancer inhibition. *J Drug Deliv Sci Technol* 78: 103931, 2022. DOI: 10.1016/j.jddst.2022.103931.
- 57 Sahlberg KK, Hongisto V, Edgren H, Mäkelä R, Hellström K, Due EU, Moen Volla HK, Sahlberg N, Wolf M, Børresen-Dale A-L, Perälä M and Kallioniemi O: The HER2 amplicon includes several genes required for the growth and survival of HER2 positive breast cancer cells. *Mol Oncol* 7: 392–401, 2013. DOI: 10.1016/j.molonc.2012.10.012.
- 58 Nguyen HN, Afkari Y, Senoo H, Sesaki H, Devreotes PN and Iijima M: Mechanism of human PTEN localization revealed by heterologous expression in *Dictyostelium*. *Oncogene* 33: 5688–5696, 2014. DOI: 10.1038/onc.2013.507.
- 59 Wu Q, Li Z and Liu Q: Treatment with PTEN-Long protein inhibits hepatitis C virus replication. *Virology* 511: 1–8, 2017. DOI: 10.1016/j.virol.2017.08.002.

APÉNDICE A

Preparación de medios de cultivo y soluciones

Amortiguador PBS 1X

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

Buffer de lisis IX

Disolver 50 µL de buffer de lisis 20X en 950 µL de agua destilada.

Buffer de reacción 2X

Mezclar 400 µL de buffer de reacción 5X, 10 µL de DTT 1M y 590 µL de agua destilada.

Buffer salino de citrato sodio (SSC 20X)

Disolver 175.3 g de NaCl 3M, 88.2 g citrato de sodio dihidratado 300mM en 800 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7 y aforar a 1 L. Almacenar a 4°C.

Etanol al 70%

Mezclar 365 mL de etanol al 96% y 135 mL de agua destilada.

Gel de agarosa al 1%

Disolver 0.3 g de agarosa en 30 mL de TBE IX.

Medio EMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%

Disolver 9.53 g de medio EMEM, 1.2 g de NaHCO₃, 1 mL de antibiótico (penicilina/estreptomicina), 100 mL de suero fetal bovino en 700 mL de agua destilada, ajustar pH a 7.4 y aforar a 1 L. Filtrar, dejar a prueba de esterilidad y almacenar a 4°C.

Medio LB

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

Reactivo Bradford 5X

Disolver 0.05 g de azul brillante de Coomassie G-250, 25 mL de etanol absoluto, 50 mL de ácido fosfórico aforar a 500 mL con agua destilada; se vacía a un frasco color ámbar y se deja en agitación toda la noche, guardar a 4°C. Para utilizar el reactivo debe estar a IX.

TAE 50X

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

TBE 10X

Se disuelven 108 g de Tris 0.8M, 55 g de ácido bórico 0.89M y 9.3 g de EDTA 25mM en 800 mL de agua destilada, ajustar a 1 L.

APÉNDICE B

Secuencias de primers PI3KCA, AKT1, mTOR

Primers	Secuencia PI3KCA	GC	TM
		(%)	(°C)
<i>Forward</i>	5' GGG CTT TCT GTC TCC TCT AAA C3'	50	62
<i>Reverse</i>	5' ATG TCT GGG TTC TCC CAA TTC3'	47.6	62

Primers	Secuencia AKT1	GC	TM
		(%)	(°C)
<i>Forward</i>	5' CTA CAA CCA GGA CCA TGA GAA G3'	50	62
<i>Reverse</i>	5' TCT TGA GCA GCC CTG AAA G3'	52.6	62

Primers	Secuencia mTOR	GC	TM
		(%)	(°C)
<i>Forward</i>	5' GCT GTG AGG TCT GAG TTT AAG G3'	50	62
<i>Reverse</i>	5' ATT GCC TTC TGC CTC TTA TGG3'	47.6	62

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Elizeth Pioquinto Avila

Candidato para el grado de
Doctorado en Ciencias con Orientación en Farmacia

TESIS: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA *in vitro* DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE KLA-PTEN-LTV Y DE SIRNA'S REGULADORES DE LOS GENES *PIK3CA*, *AKT1*, *MTOR* EN CÁNCER DE MAMA HER2 POSITIVO.

Campo de estudio: Ciencias de la salud

Biografía:

Datos personales: Nacida en Chilpancingo, Guerrero el 21 de marzo de 1989, hija de María del Carmen Avila Pastor.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Guerrero, grado obtenido Licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo en 2014.

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia en 2017.