UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

“PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA E4ORF4 UNIDA AL PÉPTIDO PENETRANTE CELULAR MAP COMO UN NUEVO AGENTE CONTRA EL CÁNCER”

Por

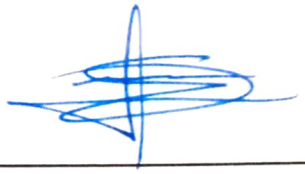
JAVIER HERNANDEZ JUÁREZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia

Abril, 2025

"PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA E4ORF4 UNIDA AL PÉPTIDO PENETRANTE CELULAR MAP COMO UN NUEVO AGENTE CONTRA EL CÁNCER"

Aprobación de la Tesis:



Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza

Presidente

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera

Secretario (a)

Dra. Patricia González Barranco

Vocal

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

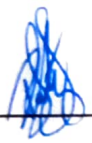
Subdirectora de Estudios de Posgrado

"PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA E4ORF4 UNIDA AL PÉPTIDO PENETRANTE CELULAR MAP COMO UN NUEVO AGENTE CONTRA EL CÁNCER"

Revisión de la Tesis:

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera

Comité Tutorial

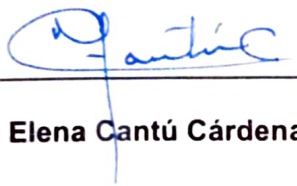


Dra. Patricia González Barranco

Comité Tutorial

Dra. Flora Eduarda Cruz López

Comité Tutorial



Dra. María Elena Cantú Cárdenas

Subdirectora de Estudios de Posgrado

RESUMEN

QFB. Javier Hernández Juárez **Fecha de Graduación: Marzo 2025**

Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA E4ORF4 UNIDA AL PÉPTIDO PENETRANTE CELULAR MAP COMO UN NUEVO AGENTE CONTRA EL CÁNCER.

Número de páginas: 91

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

Propósito y Método de Estudio: Los esquemas de tratamiento para el cáncer más utilizados hoy en día dependen en gran medida de agentes quimioterapéuticos clásicos. Estos fármacos no solo generan efectos adversos y tóxicos en los pacientes, sino que en varios casos los tumores generan resistencia a estos a través de distintos mecanismos como la degradación de estos, el pobre ingreso a tumores, proteínas de transporte ABC, cambios en las dianas que tengan estos agentes, entre otros, por lo que se buscan alternativas con agentes más selectivos y menos propensos a resistencias. Los virus oncolíticos son especies de virus que tienen la capacidad de reproducirse y diseminarse preferentemente en tejidos tumorales, lo cual los ha convertido en

herramientas para el tratamiento dirigido contra cáncer. Otra estrategia empleada ha sido el aislamiento y desarrollo de biofármacos basados en genes específicos de estos virus que mantengan la actividad anticancerígena del virión completo. El adenovirus humano es el virus más utilizado en estas dos estrategias, del cual se descubrió que una de sus proteínas implicada en su ciclo viral, E4orf4, es capaz de inducir la muerte celular en células malignas a través de una gran gama de distintos mecanismos dependientes principalmente de la asociación con la fosfatasa PP2A y la quinasa c-Src. Para poder utilizar proteínas como biofármacos se debe de emplear además una estrategia que garantice la entrega de la proteína a las células diana; una de las estrategias es el uso de péptidos penetrantes celulares (CPPs por sus siglas en inglés) capaces de internalizarse en células. El péptido anfipático modelo (MAP por sus siglas en inglés) fue uno de los primeros CPPs que se comenzaron a estudiar para su uso en la entrega de diferentes cargas, desde pequeñas moléculas de pobre ingreso celular hasta biomoléculas como ácidos nucleicos y proteínas, a células humanas.

El objetivo en el presente estudio fue el desarrollo de una proteína quimérica conformada por el CPP MAP y la proteína viral E4orf4, la evaluación *in silico* de su estructura terciaria y sus interacciones con sus 2 colaboradores principales, la evaluación de su actividad anticancerígena en líneas celulares neoplásicas y citotoxicidad en la línea celular Vero, y el estudio de su internalización en células cancerígenas.

Contribuciones y Conclusiones: Las proteínas MAP-E4orf4 y E4orf4 fueron suministradas al software AlphaFold para la predicción de sus estructuras

terciarias, confirmando que la adición de MAP a la proteína E4orf4 no altera la conformación espacial de E4orf4. Los dockings entre estas proteínas y las principales dianas de E4orf4 (PP2A y Src) mostraron un aumento en las interacciones entre MAP-E4orf4 y Src a comparación de cuando se encuentra ausente MAP y un cambio en las regiones en interacción entre PP2A con nuestras dos proteínas, ambos fenómenos pudiendo tener efectos en la actividad anticancerígena. Los ensayos de viabilidad y toxicidad con MAP-E4orf4 demostraron un buen nivel de actividad anticancerígena hacia las células de carcinoma epitelial de pulmón A549, siendo este trabajo la primera vez en que E4orf4 ha sido evaluado como proteína recombinante en las líneas celulares A549, MCF7 y Vero. Finalmente, la internalización en las células A549 demostró que MAP-E4orf4 es capaz de ingresar a las células y conservar su localización intracelular reportada en la literatura. Se espera que este trabajo impulse el estudio de E4orf4 como un potencial biofármaco en la guerra contra el cáncer.

Firma del asesor: _____

Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza

DEDICATORIA

A todos mis compañeros del posgrado que pasaron por obstáculos igual o mayormente escabrosos que los míos, que a través de la tempestad nunca dejaron de luchar y seguir adelante.

A mi pequeña hermana Mariana, aunque no tan pequeña, espero este trabajo pueda servirle de ejemplo que cualquier cosa que se proponga en la vida es posible con esfuerzo y creen en uno mismo.

A mis padres que nunca dejaron de creer en mi cuando yo mismo dudaba, que desde pequeño apoyaron siempre mi interés por la ciencia y el mundo natural.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por proveer de los recursos necesarios.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por la beca otorgada.

A la facultad de Ciencias Químicas por proveer de la infraestructura, insumos y espacios para la conducción de este trabajo.

Al Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza por toda la disposición y apoyo brindados desde mis años en la licenciatura hasta el presente.

A los miembros de mi Comité Tutorial por prestarme su tiempo y retroalimentar mi trabajo para pulirlo lo mejor posible.

A la Dra. María Elena Cantú Cárdenas por su constante labor en el apoyo a los estudiantes del plantel.

Al Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos por todas facilidades en el desarrollo del proyecto.

Al Departamento de Histología, en especial al Dr. José Juan Pérez Trujillo por su apoyo en la realización de ensayos con anticuerpos. Su colaboración fue muy valiosa.

A Aldo González por ayudarme cuando lo necesitara, aun cuando tuviera sus propios pendientes que hacer (y por todas las referencias a Bob Esponja).

A mis padres, Mariana Juárez y Julián Hernández, que siempre han estado apoyándome desde el día uno, a través de todas las dificultades presentadas y dándome siempre toda su confianza y cariño.

A mis amigos de la facultad, que me han acompañado con risas y diversión, apoyándome durante mi camino en el posgrado.

A mi mejor amigo Armando Osuna, que con tantos años de amistad y las distancias que nos separan sigue y siempre seguirá siendo mi mejor amigo.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo **Página**

DEDICATORIA ..... **VII**

AGRADECIMIENTOS ..... **VIII**

TABLA DE CONTENIDO ..... **XI**

LISTA DE TABLAS ..... **XV**

LISTA DE FIGURAS ..... **XVI**

NOMENCLATURA ..... **XVIII**

1. INTRODUCCIÓN **1**

1.1. El cáncer 2

1.1.1. Estadísticas del cáncer en México 4

1.1.2. Etiología del cáncer 6

1.2. Estrategias de tratamiento 9

1.2.1. Remoción quirúrgica 9

1.2.2. Radioterapia 9

1.2.3 Quimioterapia 10

1.2.4. Terapias dirigidas 11

1.3. Virus oncolíticos 13

1.3.1. Funciones de E4orf4 en el contexto viral 14

1.4. Péptidos Penetrantes Celulares 15

1.5. Antecedentes 17

1.5.1. Early Region 4 Open Reading Frame 4 (E4orf4) fuera del contexto viral 17

1.5.2. Péptido Celular Penetrante MAP 20

1.6. Justificación 21

1.7. Hipótesis 21

1.8. Objetivos 22

1.8.1. Objetivo General 22

1.8.2. Objetivos Específicos 22

2. MATERIALES Y MÉTODOS 23

2.1. Diseño de la construcción pET30a-MAP-E4orf4 y su integración en el sistema de expresión *E.coli* BL21 (DE3) 25

2.1.1. Diseño de la construcción pET30a-MAP-E4orf4 25

2.1.2. Preparación de células calcio-competentes de *E. coli* para las cepas DH5α y BL21 (DE3) 26

2.1.3. Transformación de las construcciones en cepas de *E. coli* DH5α y BL21(DE3) 27

2.2. Evaluaciones *in silico* de la proteína MAP-E4orf4 28

2.2.1. Modelado de las estructuras terciaras por AlphaFold2 28

2.2.2. Dockings computacionales proteína-proteína de E4orf4 y MAP-E4orf4 con PP2A y Src 28

2.3. Producción de la proteína MAP-E4orf4 29

2.3.1. Inducción y expresión de la proteína MAP-E4orf4 29

2.3.2. Purificación de las proteínas por la metodología IMAC 30

2.4 Identificación de la proteína MAP-E4orf4 por Western Blot 32

2.5. Evaluación de la citotoxicidad de MAP-E4orf4 en distintas líneas de cáncer 32

2.6. Evaluación de la internalización de MAP-E4orf4 por medio de microscopía de fluorescencia..... 34

2.7 Análisis estadístico y gráficas..... 36

2.8. Manejo de Residuos..... 36

3. RESULTADOS 37

3.1. Diseño de la construcción pET30a-MAP-E4orf4 38

3.2. Análisis computacionales 39

3.2.1. Modelado de las estructuras tridimensionales de las proteínas MAP-E4orf4 y E4orf4 39

3.2.2. Obtención de los dockings entre los principales colaboradores de E4orf4 (PP2A-B55 y c-Src) con MAP-E4orf4 y E4orf4. 41

3.3. Expresión y purificación de las proteínas 43

3.4 Análisis por Western Blot de MAP-E4orf4 46

3.5. Evaluación de la viabilidad de MAP-E4orf4 y E4orf4 en distintas líneas de cáncer y su citotoxicidad en la línea celular Vero..... 47

3.6 Evaluación de la internalización de MAP-E4orf4 en la línea celular de cáncer A549 51

4. DISCUSIÓN 53

4.1. Predicción y modelado de las estructuras tridimensionales 54

4.2. Análisis de los dockings moleculares 55

4.3. Expresiones y purificaciones de las proteínas 57

4.4 Evaluación de la citotoxicidad de MAP-E4orf4 y E4orf4 en distintas líneas celulares 58

4.5 Evaluación de la internalización de MAP-E4orf4 en células cancerígenas por microscopía de fluorescencia 63

5. CONCLUSIONES 64

6. PERSPECTIVAS 66

7. REFERENCIAS 68

ANEXO A PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO 86

ANEXO B ANÁLISIS ESTADÍSTICO 89

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO 91

LISTA DE TABLAS

Tabla Página

Tabla 1. Resumen de los datos estadísticos registrado por GLOBOCAN para México en el año 2020 5

Tabla 2. ANOVA de dos factores de los ensayos de viabilidad celular 89

Tabla 3. Prueba *post-hoc* Tukey HSD sobre las líneas celulares y condiciones. Resultados mostrados estadísticamente significativos ($p<0.05$) 90

LISTA DE FIGURAS

Figura **Página**

Figura 1. Secuencias nucleotídica y aminoacídica de la proteína recombinante MAP-E4orf4. 38

Figura 2. Visualización de las estructuras predichas por AlphaFold V2. A) MAP-E4orf4. B) E4orf4. 40

Figura 3. Alineación entre las estructuras predichas de E4orf4 y MAP-E4orf4. 41

Figura 4. Visualización del mejor modelo de cada uno de los 4 dockings realizados. A) MAP-E4orf4 con PP2A-B55, B) MAP-E4orf4 con c-Src, C) E4orf4 con PP2A-B55, D) E4orf4 con c-Src 42

Figura 5. Niveles de expresión de MAP-E4orf4 a 2 tiempos de inducción. Arriba de los carriles se menciona si pertenecen a la fracción Soluble o Insoluble (representado como “Ins”), así como el periodo de inducción al que pertenecen (4 h o 18 h)..... 43

Figura 6. Ensayos de lisis con el buffer B-PER con o sin lisozima presente. Los carriles de izquierda a derecha son: Marcador de peso molecular, Lisado.... control de BL21 sin transformar, Fracción soluble obtenida con Sample Buffer de células transformadas, Lisado obtenido usando B-PER sin lisozima y los 3 carriles siguientes con diferentes cantidades de lisado utilizando B-PER con lisozima 44

Figura 7. Purificación de MAP-E4orf4 por medio de un equipo de FPLC..... 45

Figura 8. Western Blot de la proteína expresada MAP-E4orf4..... 46

Figura 9. Viabilidad de MAP-E4orf4 en las líneas celulares A549, MCF7 y Vero por ensayo de MTT. A) Línea celular A549, B) Línea celular MCF7, C) Línea celular Vero. Se muestran barras de error estándar (SE) a 95 %..... 47

Figura 10. Curva Dosis-Respuesta obtenida de los ensayos de MTT en la línea A549. El eje X es el logaritmo en base 10 de las concentraciones de tratamiento con MAP-E4orf4. 49

Figura 11. Imágenes capturadas por microscopía de fluorescencia de la internalización de MAP-E4orf4 en células A549, magnificación total 400X..... 51

NOMENCLATURA

°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ANOVA	Análisis de Varianza
$CaCl_2$	Cloruro de Calcio
DDR	Respuesta de Daño al ADN, por sus siglas en inglés *DNA Damage Response*
df	Grados de libertad, del inglés *degrees of freedom*
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC50	Concentración efectiva máxima media, del inglés *Half maximal effective concentration*
F	Estadística F
g	Gramo
HSD	Del inglés *Honesty Significance Test*
IPTG	Isopropil-β-galactosidasa
JNK	Quinasa N-terminal Jun
L	Litro
LB	Caldo Luria
LB	Caldo de Lisogenia
mA	Miliamperio

$MgCl_2$	Cloruro de Magnesio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MSS	Media de la suma de cuadrados, del inglés *Mean Sum of Squares*
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
nM	Nanomolar
PAR	Poli(ADP)
PARP-1	Poli(ADP-ribosa) Polimerasa 1
PBS	Buffer de Fosfatos Salino
pLDDT	Del inglés *predicted Local Distance Difference Test*
PP2A	Protein Fosfatasa 2
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
SS	Suma de cuadrados, del inglés *Sum of Squares*
ZnCl2	Cloruro de Zinc

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cáncer

El cáncer engloba una gran variedad de trastornos que tienen en común la división descontrolada de células y la pobre o ausente respuesta del organismo ante este. Se pueden ver registros y evidencia de estas patologías desde épocas prehistóricas, como se ha visto en distintos restos fósiles [1].

Debido al carácter multifactorial del cáncer, su mera clasificación se presta a distintas interpretaciones con base en las variables que se tomen para dicha categorización. Las dos clasificaciones más básicas ampliamente utilizadas son en primera instancia, basándose en el tipo de tejido en el que se origina la neoplasia, y en segunda instancia tomando en cuenta el sitio anatómico de inicio. Del primero, las principales clases consideradas son las siguientes:

- Sarcomas: Cáncer que se origina en el tejido conectivo y de soporte, incluyendo cartílagos, tendones, huesos, músculo, tejido adiposo, entre otros. De estos se pueden subdividir en 2 clasificaciones en base a la incidencia en la población, el primero es el osteosarcoma seguido por sarcomas de tejido blando, el cual engloba el resto de los subtipos ya mencionados.
- Carcinomas: Los carcinomas se desarrollan en células epiteliales como la epidermis y en órganos internos como el hígado. Es la clasificación con más tipos de cáncer y la más presente entre la población con tumores.

- Mieloma: Crecimiento maligno de células plasmáticas; linfocitos B activados, conllevan a una sobreproducción de anticuerpos y otros componentes proteicos.
- Linfomas: Con el desarrollo en la investigación del cáncer, las diferencias entre linfoma y leucemia son cada vez más vagas. La definición clásica define linfoma cuando el crecimiento inicia en el sistema linfático, pudiendo posteriormente diseminarse a médula ósea.
- Leucemias: Crecimientos cancerígenos ya sea en la línea mieloide o la línea linfoide que tiene como origen la médula ósea. Pueden diseminarse a través del sistema linfático, acumularse en médula ósea y causar dolor óseo (síntoma clásico). Las diferencias establecidas entre las leucemias linfoides y los linfomas no son del todo claras en la actualidad, por lo que distintos autores utilizan de manera intercambiable el término leucemia linfoide con linfoma.
- Tumores del Sistema Nervioso Central: Grupo heterogéneo de neoplasias que se originan en el cerebro o la médula espinal. Estos tumores afectan principalmente estructuras cerebrales como neuronas, células gliales, meninges, nervios craneales y vasos sanguíneos [2].

Las células cancerígenas se diferencian de las células sanas por medio de distintas características que las hacen únicas. En primer lugar, se encuentran cambios en la transcripción y traducción de genes que conllevan a una proliferación

descontrolada y desmedida por parte de las células cancerígenas. Estos cambios pueden atribuirse ya sea a la duplicación de oncogenes, mutaciones que alteren sus tasas de transcripción o cambios epigenéticos que conlleven a este cambio en el número de transcritos.

Otro tipo de mutaciones que pueden provocar el desarrollo de un crecimiento cancerígeno en células son aquellos que hacen que proteínas involucradas en vías de señalización (por ejemplo, *Ras*) posean una actividad constitutiva elevada que no permita su correcta regulación. Otro elemento de gran importancia es la actividad de la telomerasa en células malignas, donde se ha asociado una alta actividad de esta enzima con la transformación inicial de las células, efectivamente "inmortalizando" a estas células. Además, una vez presente una población de células cancerígenas, estas pueden reclutar elementos del sistema inmunológico que ayudan en su proliferación y aunado a esto se llega también a observar el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) que proveerán al tumor de los nutrientes necesarios para continuar con su proliferación [2].

1.1.1. Estadísticas del cáncer en México

Según cifras por la Global Cancer Observatory (GLOBOCAN), para el año 2020 se estimó la aparición de 19.3 millones de casos nuevos de cáncer y 10 millones defunciones por cáncer a nivel mundial. Para México, los tipos de cáncer con mayor predominancia indistintamente del sexo fueron el cáncer de mama, próstata y colorrectal en ese orden, mientras que en la población masculina el cáncer de próstata obtuvo la mayor tasa de incidencia y en la femenina este lugar lo tomó el cáncer de mama [3] (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de los datos estadísticos registrado por GLOBOCAN para México en el año 2020

	HOMBRES	MUJERES	AMBOS SEXOS
POBLACIÓN	63,071,486	65,861,267	128,932,753
NÚMERO DE CASOS NUEVOS	89,536	105,963	195,499
TASA DE INCIDENCIA ESTANDARIZADA POR EDADES (MUNDIAL)	139.7	142.4	140.4
RIESGO DE DESARROLLAR CÁNCER ANTES DE LOS 75 AÑOS (RIESGO ACUMULADO %)	14.7	14.1	14.3
NÚMERO DE DEFUNCIONES POR CÁNCER	44,140	46,082	90,222
TASA DE MORTALIDAD ESTANDARIZADA	67.2	60.4	63.2

POR EDADES (MUNDIAL)			
RIESGO DE MORIR DE CÁNCER ANTES DE LOS 75 AÑOS (RIESGO ACUMULADO %)	6.9	6.5	6.7
CASOS PREVALENTES A 5 AÑOS	237,855	292,747	530,602
LOS 5 TIPOS DE CÁNCER CON MAYOR FRECUENCIA EXCLUYENDO CÁNCER DE PIEL NO-MELANOMA	Próstata Colorrectal Estómago Pulmón Linfoma no-Hodgkiano	Mama Cérvix uterino Tiroides Colorrectal Corpus uterino	Mama Próstata Colorrectal Tiroides Cérvix uterino

Nota: Las tasas expresadas están dadas por cada 100,000 habitantes.

1.1.2. Etiología del cáncer

La aparición y desarrollo de cáncer es un fenómeno de carácter multifactorial y polifacético. Independientemente del detonante, la transformación ocurre por cambios en el fenotipo de una célula que la lleva a su división descontrolada. Estos

cambios pueden ser de naturaleza autosómica o somática; ocurriendo de manera espontánea o por un factor externo. No se puede determinar con precisión un solo detonante que dé lugar a la transformación inicial.

En la actualidad el paradigma más aceptado es que este inicio es de carácter multifactorial, donde la combinación de factores intrínsecos del individuo y extrínsecos dan inicio a la malignidad (esta no es una regla absoluta, existen factores bien identificados que incrementan considerablemente la probabilidad de desarrollar cáncer). Algunos de estos son de índole controlable, factores como la exposición a luz UV solar y exposición a químicos cancerígenos pueden ser disminuidos por el individuo mismo, mientras que factores genéticos y epigenéticos predisponen al individuo de manera un tanto independiente de sus acciones.

De manera general se pueden enlistar los distintos factores que detonan o contribuyen al desarrollo de cáncer de la siguiente manera:

1. Factores genéticos: En esta categoría no solo se incluyen las mutaciones en el DNA, sino además las alteraciones del epigenoma que contribuyen, en conjunto con los cambios en las secuencias de DNA, al desarrollo de malignidades [4] y pueden ser tanto células germinales como somáticas [5]. Las mutaciones heredadas representan una proporción pequeña de todos los casos de cáncer, pero pueden aumentar significativamente el riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer en individuos con antecedentes familiares [6]. Algunas de las mutaciones hereditarias asociadas con un incremento en el riesgo de cáncer incluyen las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2

para el cáncer de mama y ovario, y las mutaciones en el gen APC en la poliposis adenomatosa familiar [7].

2. Factores ambientales: La exposición a agentes carcinogénicos, radiaciones ionizantes y ciertos virus también puede contribuir al desarrollo del cáncer [8]. El tabaquismo, por ejemplo, es un factor de riesgo muy establecido para el desarrollo de cáncer de pulmón y otros tipos de cáncer [9]. La exposición al asbesto se ha relacionado con el mesotelioma pleural, y la exposición a radiaciones ionizantes como la radiación UV emitida por el sol está asociada con un mayor riesgo de cáncer de piel, incluyendo melanoma.
3. Factores de estilo de vida: La obesidad, la falta de actividad física, el consumo excesivo de alcohol y una dieta poco saludable son factores del estilo de vida que pueden aumentar el riesgo de desarrollar cáncer en algún punto de la vida [10]. La obesidad se ha relacionado con un mayor riesgo de cáncer de mama, colon y endometrio, mientras que una dieta rica en frutas, verduras y fibra se ha asociado con una disminución del riesgo de cáncer [11].
4. Agentes biológicos: Los virus son el agente causal de alrededor del 10 % de los casos de cáncer en el mundo. Algunos de los virus causantes de neoplasias más comunes son el virus de Epstein-Barr (VEB), virus del papiloma humano (VPH) y virus de la hepatitis B y C (VHB y VHC). La forma en la que estos virus inducen la transformación de las células que infecta se debe principalmente a 2 efectos: la potenciación de oncogenes o inactivación de genes supresores de tumores y el aumento en la inestabilidad genómica. La presencia de inflamación crónica por agentes biológicos puede ser

también el detonante que de inicio al cáncer, como en el caso de *Helicobacter pylori* [12].

1.2. Estrategias de tratamiento

En la actualidad se siguen desarrollando nuevas terapias y esquemas para el tratamiento contra el cáncer. Sin embargo, todas estas se pueden englobar en 2 tipos de terapias: terapia clásica y terapia dirigida. En la terapia clásica se tiene la intervención quirúrgica, radioterapia tradicional y quimioterapia clásica. En la terapia dirigida, este término engloba un gran número de agentes inmunológicos, inmunomoduladores, efectores de vías de señalización, radioterapias dirigidas, entre otros, todos teniendo en común el hecho de que sus efectos son más selectivos hacia las células cancerígenas con menos efecto en las células sanas.

1.2.1. Remoción quirúrgica

La intervención quirúrgica es el tratamiento con más tiempo en práctica y, en muchos casos, es la opción terapéutica principal para el cáncer de tejidos sólidos. La cirugía tiene como objetivo extirpar el tumor y, si es necesario, los ganglios linfáticos y tejidos circundantes que pudieran resguardar células malignas [13]. Dependiendo del tipo y estadio del cáncer, la cirugía puede ser curativa o paliativa. Es muy común la combinación del tratamiento quirúrgico con un esquema de radioterapia y/o de quimioterapia, dependiendo del tipo de cáncer particular del paciente [14].

1.2.2. Radioterapia

La radioterapia es una modalidad de tratamiento que utiliza radiación ionizante para destruir células cancerosas o impedir su crecimiento y reproducción

[14]. La radioterapia puede ser aplicada externamente, a través de máquinas que emiten haces de radiación dirigidos hacia el tumor, o internamente, mediante la suministración de sustancias o materiales radiactivos en el cuerpo del paciente [15]. La radioterapia se emplea como tratamiento primario, adyuvante o neoadyuvante, y puede combinarse con cirugía y/o quimioterapia para mejorar el control local y la supervivencia global del paciente [16].

1.2.3 Quimioterapia

La quimioterapia es un enfoque terapéutico que emplea fármacos citotóxicos para inhibir la división celular y causar la muerte de células cancerosas [17]. Estos fármacos pueden actuar a través de diferentes mecanismos, como la interferencia con la síntesis de ADN, la inhibición de la replicación del ADN o la alteración del citoesqueleto celular, entre otros [18].

La selección de los agentes quimioterapéuticos y su combinación en regímenes específicos depende del tipo y estadio del cáncer, la biología tumoral, la tolerabilidad y los objetivos terapéuticos [19]. Además, la quimioterapia puede ser administrada en diferentes momentos del tratamiento, como terapia primaria, adyuvante (después de la cirugía) o neoadyuvante (antes de la cirugía) [20].

Una limitación importante de la quimioterapia es su toxicidad inherente debido a la poca selectividad de estos agentes hacia las células cancerígenas ya que sus efectos alteran células con alta división, como las células de la médula ósea, del tracto gastrointestinal y los folículos pilosos [21]. Esto puede causar efectos secundarios significativos, como mielosupresión, náuseas, vómitos, diarrea y alopecia. Para minimizar estos efectos, se han desarrollado estrategias de

soporte, como el uso de factores estimulantes de colonias, antieméticos y medicamentos que han demostrado mejorar el manejo de la neuropatía periférica inducida por quimioterapia [22–24]. Sin embargo, estas limitaciones de la quimioterapia han impulsado el desarrollo de agentes selectivos para combatir el cáncer.

1.2.4. Terapias dirigidas

Las terapias dirigidas representan una nueva estrategia de tratamientos oncológicos que actúan específicamente sobre las características moleculares y/o histológicas únicas de las células cancerosas, minimizando el daño a las células sanas circundantes [19]. En la actualidad existen un gran número de agentes que caen dentro de esta categoría, siendo los principales:

- Inhibidores de tirosina quinasas (TKIs): Estos fármacos bloquean la actividad de las enzimas tirosina quinasas, principales enzimas participantes en las vías de señalización celular y la regulación del crecimiento y la supervivencia celular [25]. Ejemplos de TKIs incluyen imatinib (Gleevec®) para la leucemia mieloide crónica y gefitinib (Iressa®) para el cáncer de pulmón de células no pequeñas [26, 27].
- Anticuerpos monoclonales: Estos son anticuerpos diseñados para reconocer y unirse a antígenos específicos en la superficie de células cancerosas. Al hacerlo, pueden bloquear la señalización celular, promover la destrucción del tumor por el sistema inmunológico o entregar fármacos citotóxicos o radiación directamente a las células cancerosas [28]. Ejemplos incluyen

trastuzumab (Herceptin®) para cáncer de mama HER2-positivo y rituximab (Rituxan)® para linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica [29, 30].

A pesar de los puntos positivos de las terapias dirigidas en la actualidad, existen limitaciones, como la generación de resistencia adquirida, efectos secundarios específicos a estas terapias y mutaciones en los biomarcadores para los que van dirigidos estos agentes [31].

Aquellos obstáculos más comunes con las terapias dirigidas en la actualidad son:

- Resistencia a fármacos: La resistencia a fármacos es un problema significativo en el tratamiento del cáncer, ya que las células tumorales pueden desarrollar mecanismos para evadir los efectos de los tratamientos quimioterapéuticos y las terapias dirigidas [32]. Algunas estrategias para abordar la resistencia a fármacos incluyen el desarrollo de fármacos que inhiben múltiples vías de señalización, la combinación de terapias dirigidas y la administración de tratamientos en secuencia [33].
- Heterogeneidad tumoral: La heterogeneidad tumoral se refiere a la diversidad de células cancerosas dentro de un mismo tumor, lo que dificulta el tratamiento efectivo y contribuye a la resistencia a fármacos [34]. Para abordar este desafío, se están investigando enfoques como la medicina personalizada, que tiene como objetivo identificar y tratar subtipos específicos de tumores basados en sus características genéticas y moleculares [35].

- Toxicidad y efectos secundarios: Los tratamientos contra el cáncer pueden causar toxicidad y efectos secundarios significativos en los pacientes, limitando su tolerabilidad y calidad de vida [21]. Para abordar este problema, se están investigando terapias selectivas que apunten específicamente a las células cancerosas y minimicen el daño a las células normales, así como enfoques de administración de fármacos que reduzcan la exposición sistémica a los agentes terapéuticos [36].
- Inmunosupresión tumoral: El microambiente tumoral a menudo presenta un entorno inmunosupresor que permite que las células cancerosas evadan la vigilancia inmunológica y crezcan sin control [37]. La inmunoterapia, que busca potenciar la respuesta del sistema inmunológico contra el cáncer, ha emergido como una estrategia prometedora para superar este desafío. Las terapias basadas en inhibidores de puntos de control inmunitario, como los anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4, han demostrado ser efectivas en el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo melanoma, cáncer de pulmón y cáncer renal [38].

1.3. Virus oncolíticos

Los virus oncolíticos son agentes virales que pueden infectar y destruir selectivamente las células cancerosas, sin causar daño a las células normales circundantes [39]. Estos virus representan una estrategia de tratamiento prometedora en la lucha contra el cáncer lo cual ha impulsado su estudio, experimentado un rápido crecimiento en las últimas décadas. Estos actúan

mediante, ya sea un tropismo específico hacia las células cancerígenas, la lisis selectiva de las células cancerosas infectadas o combinación de ambos, la estimulación de la respuesta inmunitaria antitumoral y la modificación del microambiente tumoral [40].

Entre los diversos virus oncolíticos en investigación, el adenovirus humano (HAdV) es uno de los más estudiados y prometedores. Los adenovirus son virus de doble cadena de ADN no encapsulados que infectan a mamíferos y aves, y se han identificado más de 50 serotipos en humanos. Los HAdV son especialmente atractivos como agentes oncolíticos debido a su capacidad de infectar una amplia variedad de células tumorales, su facilidad de manipulación genética y su potencial para ser administrados de forma local o sistémica [41].

El adenovirus humano tipo 2 (HAdV-2) es uno de los serotipos más utilizados en la terapia oncolítica y en la terapia génica. Este virus posee un genoma organizado en regiones tempranas (E1A, E1B, E2, E3 y E4) y tardías (L1 a L5), que se transcriben en diferentes etapas del ciclo de replicación viral. Las proteínas codificadas por las regiones tempranas están involucradas en la modulación de la maquinaria celular del huésped para favorecer la replicación viral y evadir la respuesta inmune del huésped. Por otro lado, las proteínas codificadas por las regiones tardías están asociadas con la formación de la cápside viral y la liberación de partículas virales maduras [42].

1.3.1. Funciones de E4orf4 en el contexto viral

La unidad de transcripción E4 de adenovirus (Ad) es una unidad de transcripción regulada por un solo promotor ubicado al extremo derecho del genoma

del Ad. El promotor E4 es activado tempranamente tras la infección por la proteína activadora transcripcional E1A y su transcripción continúa hacia la fase tardía de la infección [43]. La unidad E4 de los adenovirus del grupo C más estudiados contiene siete marcos de lectura (orfs) predichos codificando al menos 6 proteínas conocidos como E4orf1 hasta E4orf6/7. Estudios han revelado redundancia funcional entre E4orf3 y E4orf6 [44] y se ha observado que el resto de los productos génicos E4 son prescindibles para el crecimiento lítico del virus en cultivos celulares [44, 45].

E4orf4 es una proteína de 14 kDa compuesta por 114 aminoácidos que regula la progresión de la infección por Ad desde la fase inicial hasta la tardía. Sus funciones incluyen la regulación a la baja de expresión génica viral temprana y de genes celulares que afecten la replicación de Ad, control de splicing alternativo de mRNAs virales y regulación de traducción proteica [43]. La proteína fosfatasa 2A (PP2A) es una pareja importante de E4orf4 implicada en la regulación a la baja de reguladores celulares como c-Myc y c-Fos [43, 46].

1.4. Péptidos Penetrantes Celulares

Los CPP son péptidos cortos, generalmente de 5 a 30 aminoácidos de longitud, principalmente con propiedades anfipáticas y catiónicas. Estos péptidos poseen una amplia gama de secuencias y estructuras, pero la mayoría de ellos tienen en común la capacidad de interactuar con componentes de la membrana celular, como los lípidos y proteínas transmembranales, permitiendo de esta manera su internalización en células [47].

El mecanismo general de internalización de los CPP no está completamente definido, pero a través de múltiples estudios se ha visto que implica múltiples vías endocíticas, como la endocitosis mediada por clatrina, la endocitosis mediada por caveola y la macropinocitosis, así como la translocación directa a través de la membrana plasmática [48]. La elección de la vía de entrada puede depender de diversos factores, como la concentración de CPP, la naturaleza de la carga y las características de la célula diana.

El descubrimiento del primer CPP, la proteína transactivadora del dominio de transducción (TAT) del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), demostró que los péptidos derivados de proteínas virales podrían ser utilizados para facilitar la entrega de moléculas de carga en células eucariotas [49]. Desde entonces, se han identificado y desarrollado numerosos CPP de origen natural y sintético, incluyendo Penetratina, derivada del factor de penetración de la homeoproteína Antennapedia de *Drosophila melanogaster*, y Transportan, derivado de la fusión entre los péptidos Mastoparan, proveniente del veneno de avispa, y el neuropéptido Galanina, unidos a través de una lisina [50].

La aplicación de CPP en terapias contra el cáncer es especialmente prometedora, ya que estos péptidos pueden facilitar la entrega de agentes terapéuticos directamente en células tumorales, lo que permite superar limitaciones como la baja permeabilidad celular y la degradación enzimática. Además, la utilización de CPP permite el suministro de moléculas que tradicionalmente no pueden cruzar la membrana celular, como proteínas, ácidos nucleicos y moléculas pequeñas hidrofílicas, lo que amplía el rango de posibles agentes terapéuticos [51].

El péptido anfipático modelo (MAP) es un péptido sintético diseñado por Scheller et al. (1999) para mimetizar la capacidad de internalización de secuencias translocadoras no-endocíticas de ocurrencia natural. Se utilizaron aminoácidos tanto de naturaleza polar como apolar, con el objetivo de determinar qué combinaciones y secuencias producirían α-hélices que fueran capaces de internalizar cargos moleculares. En el estudio original se diseñaron varias secuencias, 15 en total, todas compartiendo una composición similar de aminoácidos A, L y K principalmente. Los resultados confirmaron que para las secuencias probadas la naturaleza anfipática era necesaria para la capacidad de penetración celular y de estabilización de la conformación α-hélice [52].

1.5. Antecedentes

1.5.1. Early Region 4 Open Reading Frame 4 (E4orf4) fuera del contexto viral

Dentro de los primeros esfuerzos por investigar el comportamiento de E4orf4 fuera de su contribución en la replicación de HAdV, experimentos en fibroblastos embrionarios primarios de rata revelaron que la expresión de E4orf4 promueve altos niveles de muerte celular al co-transfectar con varias combinaciones de oncogenes, pero no al co-transfectarse con un vector vacío. Esto demuestra que la expresión de oncogenes sensibilizó células primarias de cultivos tisulares hacia la muerte por E4orf4 [53].

La apoptosis inducida por E4orf4 ha demostrado ser independiente de p53, en distintos estudios, donde se evaluaron células humanas deficientes de p53, se observó que E4orf4 al ser transfectada de manera transitoria era capaz de inducir

la muerte de estas en ausencia de otras proteínas de Ad [54]. Posteriores estudios respecto a los mecanismos de muerte celular inducida por E4orf4 han sacado a la luz su capacidad de provocar arresto celular en la fase G2/M, al menos en parte, por el reclutamiento de PP2A hacia el complejo promotor de anafase/ciclosoma (APC/C). APC/C es una ubiquitin ligasa E3 la cual marca reguladores del ciclo celular para degradación. Asimismo, la adición de benomilo, un despolimerizante de microtúbulo que activa de manera transitoria el punto de control del ensamblado del huso mitótico al inhibir APC/C, sensibilizó a células de levadura a la muerte celular inducida por E4orf4. Estas evaluaciones se realizaron en distintas líneas de *S. cerevisiae* expresoras de E4orf4 [55].

Cuando se expresa por si sola, la transición en la acumulación de E4orf4 en el núcleo al espacio citoplasmático demostró ser dependiente de las interacciones entre E4orf4 con la familia de quinasas Src. Específicamente, la fosforilación de E4orf4 por estas quinasas detonan su localización al citosol [56]. La co-expresión de Src constitutivamente activa incrementó la acumulación de E4orf4 en el citoplasma, en ampollas membranales y proteínas del citoesqueleto [57]. La fosforilación de E4orf4 por Src resulta en cambios conformacionales que promueven su retención fuera del núcleo. Se ha observado además que el motor de miosina II es requerido para la exportación de E4orf4 desde el núcleo al citosol, mientras que el exportador nuclear CRM1-dependiente no parece estar implicado en este hecho [58]. Dependiendo de la localización de E4orf4 en la célula, la muerte celular puede desencadenarse por una de dos vías muy marcadas entre sí: la vía nuclear y la vía citoplasmática. A grandes rasgos, la vía nuclear está marcada por perturbaciones

en el ciclo celular que pueden llevar al arresto del ciclo celular, mientras que la vía citoplasmática se caracteriza por alteraciones en el citoesqueleto y en organelos como la mitocondria y el aparato de Golgi. Cabe mencionar que estas vías no son mutuamente excluyentes y la contribución de ambas en diferentes momentos temporales aportan a la inducción de la muerte de la célula [46].

En un estudio reciente por Brestovitsky et al. (2016) se evaluó la capacidad inhibitoria de E4orf4 sobre la respuesta al daño de DNA (DDR). El estudio se realizó en células HeLa infectadas con un mutante de Ad ausente de la región E4 en un grupo y con un mutante faltante de todos los *orfs* E4 excepto por E4orf4 en otro grupo. Se observó que E4orf4 en colaboración con su colaborador celular PP2A inhibía la DDR por medio de la reducción en fosforilación de distintas proteínas de la DDR pertenecientes a las vías reguladas ataxia-telangiectasia mutada (ATM) y Rad3-relacionada (ATR) [59]. Esta inhibición en la señalización por daño al DNA se observó tanto durante la infección viral por Ad, así como con la expresión de E4orf4 por sí misma y además se observó tanto en células malignas como no malignas.

Siguiendo con los estudios con la DDR, Nebenzahl-Sharon et al. (2019) transfectaron vectores con mutantes de E4orf4 en las líneas celulares HeLa, A549 y U2OS demostraron la asociación de E4orf4 con el sensor de daño al DNA Poli ADP ribosa polimerasa 1 (PARP-1) y que dicha asociación requiere de actividad PARP. Observaron que E4orf4 reducía la fosforilación de PARP-1 en residuos de serina, lo que contribuye a la inhibición de PARP-1 puesto que la fosforilación de dicha enzima aumenta su actividad. Dicha inhibición se traduce a una respuesta del

DDR reducida, lo cual aumenta el daño al material genómico de las células y su posterior muerte como causa [60].

1.5.2. Péptido Celular Penetrante MAP

Uno de los principales atractivos de este péptido por sobre el resto de CPPs estudiados son los resultados observados en un estudio comparativo donde se analizó la capacidad de penetración de 474 secuencias de CPPs, donde se cuantificó la internalización de un fluoróforo en células HeLa. En dicho estudio comparativo, en el top 5 de péptidos con mayor señal de fluorescencia se observa una de las secuencias MAP, la cual a comparación del top 3 que provocaron el desprendimiento de las células de su frasco, no provoco ningún cambio morfológico en las células. Ninguna de las secuencias del top 20 alteraron significativamente la viabilidad de las células, siendo la viabilidad más baja observada de un 80 %. La secuencia del péptido MAP discutida es KLALKLALKALKAALKLA.

Así mismo, en la posición 7, otra secuencia MAP se posicionó, de secuencia KLALKLALKALKAALKLA [61]. De entre estas dos secuencias, la que tiene más estudios realizados es la segunda, donde se ha evaluado con distintos cargos moleculares, como lo son ácidos nucleicos, péptidos, entre otros. En un trabajo realizado por Oehlke et al., (2004) se reportó un incremento de 8 veces en la internalización de un PNA acoplado a MAP en cardiomiocitos de rata al compararse con el PNA por sí mismo (45 *vs* 5 pmol/mg de proteína en extractos de cardiomiocitos, respectivamente) [62–64].

1.6. Justificación

E4orf4 tiene un gran potencial como agente anticancerígeno, donde la mayoría de los estudios se han enfocado en elucidar los mecanismos en juego que proporcionan la actividad citotóxica, muy pocos han tratado de generar proteínas recombinantes que exploten esta capacidad de la proteína. Además, la mayoría de los estudios realizan sus evaluaciones por medio de transfecciones en células, por lo que hay una deficiencia de trabajo en la producción y evaluación como proteína recombinante de E4orf4.

1.7. Hipótesis

La proteína MAP-E4orf4 diseñada y producida presenta actividad anticancerígena en al menos una línea celular tumoral, además de poseer la capacidad de penetración celular conferida por la secuencia MAP.

1.8. Objetivos

1.8.1. Objetivo General

Producción, purificación y evaluación de la actividad anticancerígena de la proteína E4orf4 unida al péptido penetrante MAP.

1.8.2. Objetivos Específicos

- Expresión y purificación de la proteína MAP-E4orf4 en *Escherichia coli BL21 (DE3)* como sistema de expresión.
- Evaluaciones *in silico* de la proteína MAP-E4orf4.
- Evaluación de la citotoxicidad de la proteína MAP-E4orf4 en un modelo de células no cancerígenas.
- Evaluación de la actividad anticancerígena de la proteína MAP-E4orf4 en células cancerígenas.
- Evaluación de la internalización de la proteína MAP-E4orf4 en la línea celular A549.

CAPITULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente trabajo se adquirió la construcción pET30a-MAP-E4orf4, así como los cebadores correspondientes, todos adquiridos de Genscript, US. Se generaron las estructuras terciarias de las proteínas MAP-E4orf4 y de E4orf4 por medio del modelo predictivo AlphaFold2 de DeepMind, Alphabet, para posteriormente realizar dockings computacionales entre MAP-E4orf4 con PP2A y la quinasa Src por medio del servidor ClusPro 2.0 (colaboración entre la Universidad de Boston y la Universidad de Stony Brook). La expresión de la construcción se realizó por medio de la inducción por IPTG en *Escherichia coli* BL21(DE3). La purificación de esta proteína recombinante se llevó a cabo por medio de cromatografía IMAC en un equipo de FPLC modelo AKTA Prime Plus (GE Healthcare, Chicago, US).

Tras obtener proteína purificada, se hizo la comprobación de identidad de esta por Western Blot con anticuerpos anti-polihistidinas. La valoración de la actividad anticancerígena y citotóxica se llevó a cabo en 2 líneas celulares cancerígenas A549 y MCF7 (ATCC CCL-185™ y ATCC HTB-22™) y 1 línea control de células no cancerígena Vero (ATCC CCL-81™) por el ensayo de MTT. El estudio de la internalización se llevó a cabo en la línea celular A549 por medio de inmunofluorescencia y captura de imágenes por microscopio de fluorescencia.

2.1. Diseño de la construcción pET30a-MAP-E4orf4 y su integración en el sistema de expresión *E.coli* BL21 (DE3)

2.1.1. Diseño de la construcción pET30a-MAP-E4orf4

Se diseñó la construcción conformada por la secuencia del péptido MAP seguida de un *linker* conformado por 6x histidinas y 4x glicinas, en dicho orden, seguido de la secuencia de la proteína E4orf4 en el extremo C-terminal. La secuencia de E4orf4 del Adenovirus Humano 2 fue obtenida de la entrada P03240 de la plataforma UniProt. La secuencia del péptido MAP se obtuvo directamente del trabajo original de su descubrimiento y desarrollo por Bienert M. y colaboradores [65, 66]. La secuencia del *linker* fue diseñada con base en los trabajos de distintos grupos de investigación donde la presencia de histidinas en macromoléculas promovía el escape endosomal de las mismas tras su ingreso en las células diana; la adición de secuencias de glicinas provee de flexibilidad entre diferentes dominios de proteínas en el desarrollo de proteínas quiméricas (en este trabajo los dominios siendo la secuencia MAP y E4orf4) [67].

Finalmente, se eligió el vector de expresión pET-30a(+) (Merck, USA) para expresar esta proteína recombinante debido principalmente al gran uso que tiene en trabajos de expresión en sistemas eucariotas, así como la presencia de distintas secuencias *tag* que proveen de flexibilidad a la hora de seleccionar el sistema de purificación. La secuencias nucleotídica y aminoacídica de la proteína recombinante propuesta se muestran en la Figura 1.

2.1.2. Preparación de células calcio-competentes de *E. coli* para las cepas DH5α y BL21 (DE3).

Un tubo Falcon con 5 mL de caldo LB fue inoculado con una asada de células de *E. coli* de la cepa deseada y se llevó a incubación en agitación a 37°C/220 rpm por 18 h. Al día siguiente, a un matraz de agitación con 100 mL de caldo LB se le inoculó con 1 mL del cultivo de la noche pasada, y se llevó a incubar en agitación con la misma temperatura y revoluciones usadas hasta obtener una OD de 0.4, la cual fue monitoreada en un lector de microplaca donde en una placa se colocó en un pocillo 250 µL del cultivo y se llevó a leer a una longitud de 630 nm. Una vez alcanzada la densidad, se dividió el cultivo en 2 tubos Falcon de 50 mL y se llevaron a un baño de hielo, donde se dejaron incubando por 20 minutos.

Pasado este tiempo se llevaron a centrifugar los tubos a una velocidad de 4000 rpm a 4°C por 10 min. Se decantaron los tubos y los pellets de cada tubo fueron resuspendidos con 20 mL de solución de $CaCl_2$ 0.1 M previamente enfriado. Tras esto, se llevaron los tubos a incubar de nuevo en hielo por 30 min y se centrifugaron a 4000 rpm/4°C/10 min. En el siguiente paso se decantaron los tubos y se resuspendieron con 5 mL de sol'n $CaCl_2$ 0.1 M con glicerol 15 % previamente enfriado. Finalmente, se dividieron las suspensiones celulares en tubos de 1.5 mL con 100 µL y se les dio congelación rápida sumergiendo los tubos en hielo seco seguido de la adición de metanol, contando 1 min de congelación para antes de sacar los tubos. Los tubos finales fueron almacenados en -80°C.

2.1.3. Transformación de las construcciones en cepas de *E. coli* DH5α y BL21(DE3)

En cada ensayo de transformación se emplearon 2 placas de agar LB adicionadas con kanamicina 30 µg/mL como control positivo y 1 placa como control negativo.

Primeramente, se descongelaron células calcio-competentes en hielo suficiente para preparar 3 tubos Eppendorf con 50 µL de células cada uno. Una vez teniendo los tubos con células, a los 2 tubos positivos se les agregó aproximadamente 30 µg de plásmido. Al control negativo se le añadió 2 µL de agua. Ya con los plásmidos adicionados, se dejaron incubando los tubos en hielo por 10 min. Posteriormente, se les dio un choque térmico incubando las células en un baño de agua a una temperatura de 42°C por 30 s y en seguida se llevaron a incubar en hielo por 2 min.

Finalizando esto, se le añadió a cada tubo 950 µL de caldo LB a cada tubo y se llevaron a incubar en agitación por 1 h a 37°C por 250 rpm. Acabado este tiempo, se centrifugaron los tubos en una microcentrífuga por 5 min a 9000 rpm. Continuando, se desechó 900 µL de medio de cada tubo y se resuspendieron las células. Finalmente se tomaron 50 µL de células de cada tubo y se sembró en placas de agar con kanamicina 30 µg/mL por medio del uso de asas en L. Finalmente se llevaron las placas a incubar a 37°C por 16 h.

2.2. Evaluaciones *in silico* de la proteína MAP-E4orf4

2.2.1. Modelado de las estructuras terciaras por AlphaFold2

Debido a que E4orf4 no posee su estructura cristalina reportada, se generó una predicción computacional tanto de E4orf4 como de MAP-E4orf4 por medio del sistema de predicción AlphaFold V2 [68] (DeepMind, UK). Específicamente, se empleó AlphaFold Colab, una interfaz interactiva de AlphaFold V2 desplegada en el servicio de computación en la nube Google Colab. Se ingresaron en el servidor las secuencias aminoacídicas de E4orf4

(MVLPALPAPPVCDSQNECVGWLGVAYSAVVDVIRAAAHEGVYIEPEARGRLDALREWIYYNYYTERAKRRDRRRRSVCHARTWFCFRKYDYVRRSIWHDTTTNTISVVSAHSVQ) y de MAP-E4orf4 (MAKLALKLALKALKAALKLAHHHHHHGGGGMVLPALPAPPVCDSQNECVGWLGVAYSAVVDVIRAAAHEGVYIEPEARGRLDALREWIYYNYYTERAKRRDRRRRSVCHARTWFCFRKYDYVRRSIWHDTTTNTISVVSAHSVQ). Se dejaron los valores por defecto del programa y se dejaron corriendo los cálculos. Al finalizar el programa arrojó la estructura predicha de ambas proteínas e incluyó una calificación de la confianza del posicionamiento en el espacio de cada residuo.

2.2.2. Dockings computacionales proteína-proteína de E4orf4 y MAP-E4orf4 con PP2A y Src

Los dockings computacionales se llevaron a cabo en el servidor ClusPro [69] (Universidad de Boston y Universidad de Stony Brook, US). Se proporcionó al servidor las estructuras de E4orf4 y MAP-E4orf4 previamente generadas. Se realizaron dockings hacia PP2A-B55 (PBD ID: 3F3V) y c-Src (2SRC) como los

receptores tanto con E4orf4 como con MAP-E4orf4. Se emplearon las opciones por defecto del servidor y se descargaron el top 10 de modelos de cada docking.

2.3. Producción de la proteína MAP-E4orf4

2.3.1. Inducción y expresión de la proteína MAP-E4orf4

Se inocularon 5 mL de caldo LB en un tubo Falcon de 50 mL con una colonia recién transformada con una de las construcciones. Se dejó a incubar a 37°C/220rpm/16 h. Al día siguiente, a un matraz de agitación con 125 mL de caldo LB adicionado con 126 µL de kanamicina 30 mg/mL se le agregó 1.25 mL del cultivo de la noche anterior, para después llevar a incubar el matraz a 37°C/220 rpm hasta alcanzar una OD de 0.6 aproximadamente. Alcanzada la OD, se retiró el matraz de la incubadora, se dejó atemperando por 15 min y se le añadió 126 µL de IPTG 200 mM para obtener una concentración de inducción de 0.2 mM. Finalmente se llevó a incubar el matraz a 25°C/220rpm/18 h.

Tras el tiempo de inducción, se prepararon alícuotas de los cultivos para usar como controles de proteína recombinante total en la fracción soluble de la siguiente manera: Se tomaron 2 mL de cada cultivo y se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL para proceder con su centrifugación, a 12,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se les retiró el sobrenadante y se les añadió 120 µL de agua grado MiliQ junto con 40 µL de *Sample Buffer* 4X. Se pasó a poner en ebullición las muestras durante 10 min. Tras esto, se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 min. Finalmente, se resguardo el sobrenadante de cada alícuota para incluirlos en el gel de SDS-PAGE y para realización de Western Blot.

2.3.2. Purificación de las proteínas por la metodología IMAC

Pasado el tiempo de inducción, se realizó primeramente la lisis de las células. Se comenzó con la centrifugación de todo el contenido del matraz en un tubo Falcon de 50 mL a 8000 x g/10 min/4°C hasta haber centrifugado el volumen completo. Acabada la centrifugación, se decantó el tubo y se realizó un pesaje de este al que se le restó el peso del tubo vacío para obtener la cantidad de masa del pellet de células. Se realizó la lisis de las células por medio del uso del buffer de lisis B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent (ThermoFisher Scientific) donde por cada gramo de masa fresca de células se emplearon 4 mL del buffer. Tan pronto se agregó el buffer, se añadió inhibidor de proteasas cOmplete™ EDTA-free 25 X (Merck) seguido de DNase I RNase-free 2000 U/mL (NEB) a una cantidad de 2.5 µL por cada mL de B-PER añadidos, después se le añadió una décima parte de $CaCl_2$ 1 mM y $MgCl_2$ 25 mM respectivamente, y finalmente se agregó al tubo 2 µL de lisozima 50 mg/mL por cada mL de B-PER. Ya con la reacción de lisis preparada, el tubo se llevó a agitación de 220 rpm por 15 min para posteriormente clarificar el lisado por una centrifugación a 10,170 x g por 15 min.

El clarificado fue purificado en el FPLC AKTA Prime Plus (GE Healthcare). Se utilizó una columna HisTrap™ FF 1 mL (GE Healthcare) la cual fue equilibrada con 5 volúmenes (5 mL) de buffer de equilibrio Tris pH 7.4. El clarificado fue inyectado en el equipo y circuló a una velocidad de 0.8 mL/min. Pasada la muestra, se lavó la columna con el buffer de equilibrio a la misma velocidad hasta que la lectura en el cromatograma marcó menos de la señal al tiempo 0. Después de esto,

se obtuvieron 12 eluciones de 0.5 mL cada una por medio de la elución con buffer Tris + Imidazol 200 mM pH 7.4.

Tomando las eluciones con la proteína de interés, se procedió a concentrarlas utilizando concentradores de proteína 10K MWCO de 20 mL (Merck). El procedimiento consistió en añadir las eluciones a un concentrador, llevar a centrifugar a 6500 x *g* por el tiempo que fuese necesario, balanceando con un concentrador idéntico lleno al mismo volumen con buffer Tris, para obtener el volumen final deseado. Los concentrados fueron recolectados y almacenados en tubos Eppendorf de 1.5 mL.

Finalmente, se realizaron electroforesis de SDS-PAGE para analizar distintos extractos de proteínas en diferentes puntos del proyecto. Los geles se prepararon al 15 % de solución bis/acrilamida 30 % (BIO-RAD, US) en la fase de resolución y al 4 % en la fase de carga. Las muestras se prepararon diluyendo en relación 1:4 una alícuota de cada muestra con *Sample Buffer*. Las electroforesis se llevaron a cabo primeramente a 80 V, 1250 mA por 10 min y posteriormente se finalizó a 120 V, mismo amperaje por 1h 45 min. Una vez finalizadas las corridas, se retiraron los geles de la cámara de corrida, se lavaron con agua desionizada y se dejaron tiñendo con la solución de tinción hasta el día siguiente. Para visualizar las bandas, los geles se decoloraron por medio de su incubación en agitación a 25 rpm por 2 h. Tras el desteñido, los geles fueron almacenados en agua desionizada hasta el momento de su análisis.

2.4 Identificación de la proteína MAP-E4orf4 por Western Blot

Se realizó la detección de MAP-E4orf4 por medio de Western Blot. Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo monoclonal murino anti-polihistidinas (Núm. cat. sc-8036, Santa Cruz Biotechnology, USA), haciendo uso de la presencia de polihistidinas en la proteína expresada.

Primeramente, se obtuvieron las proteínas como se describió anteriormente en la metodología de purificación de estas, por medio del uso de *Sample Buffer*. Como control negativo se utilizó el lisado obtenido de *E. coli* sin transformar. Tras preparar las muestras en un gel de SDS-PAGE, se procedió con su transferencia a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PDVF) (Danaher Corporation, USA). Tras la incubación de 12 h la membrana con anticuerpo primario diluido 1:3000, se añadió anticuerpo secundario de cabra anti-murino inmunoglobulina G conjugado a peroxidasa de rábano picante (ThermoFisher Scientific, USA) diluido 1:5000 y se incubó a 4 ºC por 2 h. Se utilizó el sustrato de máxima sensibilidad SuperSignal™ West Femto (ThermoFisher Scientific) para detectar la señal del anticuerpo secundario de acuerdo con las indicaciones por el fabricante. Finalmente se capturaron imágenes de la membrana.

2.5. Evaluación de la citotoxicidad de MAP-E4orf4 en distintas líneas de cáncer

Se evaluó la viabilidad de MAP-E4orf4-His en tres líneas celulares distintas provenientes de la ATCC (American Type Culture Collection, US). Para ello se emplearon las líneas cancerígenas de adenocarcinoma de mama triple negativo

MCF7 (ATCC ID HTB-22™) y la línea de adenocarcinoma de pulmón A549 (CCL-185™). La línea celular VERO (ATCC ID CCL-81™) de células epiteliales de riñón de mono verde fueron utilizadas como modelo de células no malignas para la evaluación de la citotoxicidad. Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Merck) suplementado con 10 % de suero fetal bovino a 37 ºC en una atmosfera con humedad al 5 % de CO_2 sembradas en frascos de cultivo de 25 cm^2 de área. Se tomaron los cultivos de células cuando presentaron una confluencia del 80 % y se disociaron con tripsina-EDTA (Thermo Fisher Scientific) diluida con PBS al 0.025 % para posteriormente resuspenderlas en su respectivo medio de cultivo suplementado con 10 % de suero fetal bovino con el fin de inactivar la tripsina.

Se colocaron aproximadamente 5,000 células por pozo en una placa de 96 pocillos con 4 réplicas por concentración de proteína, de control y de células sin tratamiento y se incubaron durante 24 h a 37°C al 5 % de CO_2. La proteína MAP-E4orf4 y el control se probaron a las concentraciones de 31.25 nM, 62.5 nM, 125 nM, 250 nM y 500 nM. Posteriormente se incubó a las condiciones antes mencionadas por 48 h. Después se reemplazó el sobrenadante con 100 µL de medio fresco con 10 % de una preparación en medio completo de MTT [Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol] (Merck) a una concentración de 3 mg/mL y se incubaron las placas por 1 h a 37°C y 5 % de CO_2.

Tras esta incubación, se retiró con cuidado el medio de todos los pocillos y se les añadió 100 µL de DMSO e incubó por 8 min a 37°C con el fin de disolver los cristales de formazán formados. Finalmente se procedió a leer las placas en un lector de microplacas a una longitud de onda de 550 nm (λmax 550-600 nm). El

ensayo se realizó en tres repeticiones independientes. En cada ensayo independiente se utilizó 200 µL de medio RPMI con SFB al 10 % en 3 pocillos como blanco.

2.6. Evaluación de la internalización de MAP-E4orf4 por medio de microscopía de fluorescencia

Con base en los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad y citotoxicidad, se eligió la línea celular A549 para la evaluación de la internalización, debido a que en esta línea se observó la mayor actividad antiproliferativa. Se procedió con el ensayo primeramente sembrando $7x10^4$ células sobre cubreobjetos circulares de 15 mm en una placa de 24 pocillos en un volumen de 1 mL de medio RPMI-1640 + 10 % SFB, con las mismas condiciones de cultivo utilizadas en la evaluación de citotoxicidad, incubándolas por un periodo de 24 h.

Después, se incubaron las células con la proteína MAP-E4orf4 a una concentración de 500 nM en 3 pocillos en un volumen de 1.4 mL por pocillo durante dos periodos de tratamiento: 24 h y 30 min. Como control negativo se adicionó medio sin MAP-E4orf4 y como control positivo de internalización se utilizó el péptido KLAK etiquetado con polihistidinas a una concentración de 50 µM, ambas con 30 min de incubación. Pasado el periodo de tratamiento, se retiró primeramente el medio de las células y se realizaron 2 lavados con PBS. Posteriormente, tras remover el PBS se adicionó a las células 1 mL de metanol helado y se dejaron incubando por 10 min a -20°C.

Pasada esta incubación, se procedió a remover el metanol y se adicionaron 500 µL de acetona helada a las células y tras no más de un par de segundos de haber sido adicionado, se removió de los pocillos y se realizaron 2 lavados con PBS. Acabado el último lavado, se adicionó 400 µL de suero de caballo al 3 % como solución de bloqueo y se incubaron las células por 30 min a 4°C. A continuación, se añadieron 300 µL de anticuerpo primario murino anti-*histag* 1:250 en PBS por pocillo y se dejaron incubando por 12 h a 4°C. Acabada esta incubación, se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados con PBS de 5 min c/u. Se adicionaron 300 µL *x* pocillo de anticuerpo secundario anti-murino marcado con Alexa Fluor™ Plus 555 (ThermoFisher Scientific) 1:500 en PBS y se incubó durante 2 h a 4°C protegiendo de la luz. Se retiró la solución de los pocillos y se lavaron 3 veces con PBS, 5 min c/u.

Para la contratinción de los núcleos, se adicionaron 300 µL de solución 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 1 µg/mL a las células y se dejaron incubando por 10 min a temperatura ambiente, protegiendo de la luz. Tras esta incubación, se retiró la solución DAPI y se realizaron 3 lavados con PBS. Finalmente, se montaron los cubreobjetos en laminillas utilizando medio de montaje al 50 % glicerol y se procedió a tomar las imágenes con un microscopio LEICA DM1000. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el programa Fiji (trabajo en conjunto de múltiples instituciones), un *bundle* de ImageJ2 con distintos aditamentos añadidos [70]. Se ajustaron las imágenes obtenidas con el canal de color rojo para mejorar su nivel de apreciación; estos ajustes fueron usados a través de todas las capturas hechas

tanto del tratamiento como de los controles, manteniendo así un procesamiento homogéneo de las imágenes y no alterar resultados.

2.7 Análisis estadístico y gráficas

El análisis estadístico ANOVA de dos factores, cálculo del EC50 y la elaboración de los gráficos en el presente trabajo fueron realizados utilizando el lenguaje de programación *python* versión *3.9.16.* Las gráficas se realizaron utilizando las librerías *matplotlib 3.7.0* y *seaborn 0.12.2.* Para el manejo de datos y cálculo del EC50 se emplearon las librerías *pandas 1.5.3* y *numpy 1.23.5* respectivamente. El análisis ANOVA se llevó a cabo con la librería *statsmodels 0.13.5*. La prueba de Tukey HSD se realizó en el entorno *R 4.3.* Para todos los análisis estadísticos, se tomó como alfa 0.05 ($p<0.05$).

2.8. Manejo de Residuos

Los distintos *buffers* empleados en el desarrollo de este trabajo fueron dispuestos principalmente en el contenedor A, los cultivos bacterianos fueron esterilizados por medio de autoclave y dispuestos en bolsa roja, y los residuos generados en la elaboración de los geles de SDS-PAGE fueron dispuestos en el contenedor C de acuerdo con el sistema de manejo y gestión de residuos de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS

3.1. Diseño de la construcción pET30a-MAP-E4orf4

La construcción con el inserto MAP-E4orf4 se presenta a continuación:

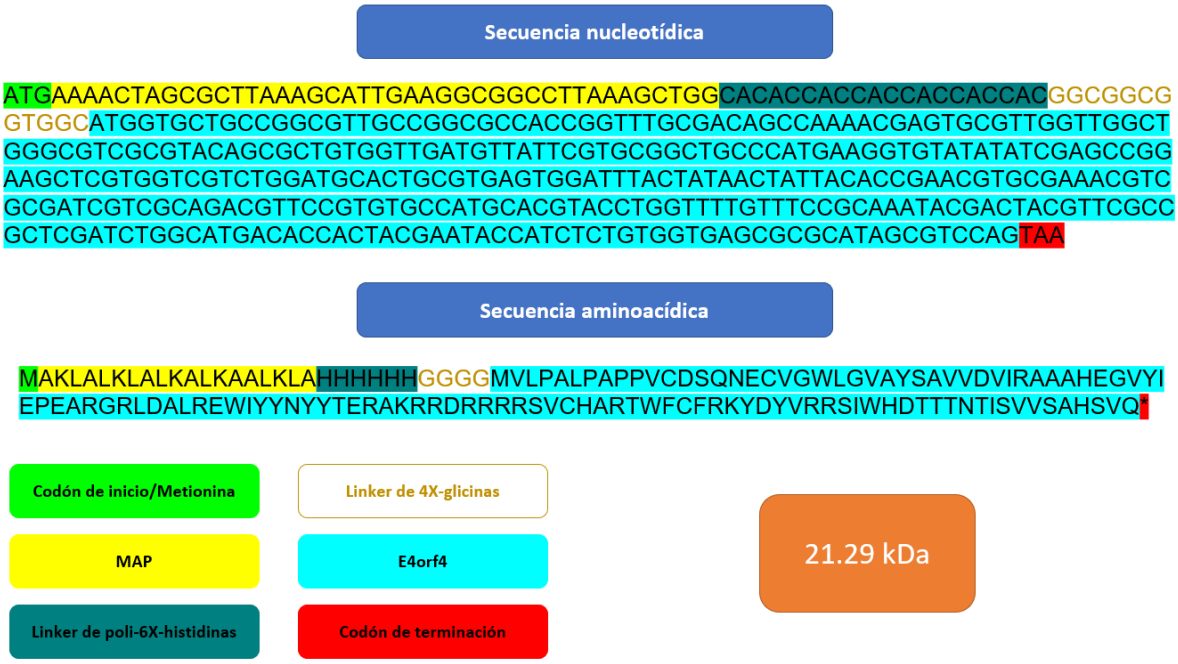


Figura 1. Secuencias nucleotídica y aminoacídica de la proteína recombinante MAP-E4orf4.

Como se aprecia en la Figura 1, la secuencia introducida al vector pET30a consta primeramente de un codón de inicio metionina, seguido de la secuencia MAP y 2 *linkers*, el primero de 6X polihistidinas y el segundo 4X glicinas. La última secuencia en el inserto es propiamente la de E4orf4, finalizando con un codón de terminación.

3.2. Análisis computacionales

3.2.1. Modelado de las estructuras tridimensionales de las proteínas MAP-E4orf4 y E4orf4

Se obtuvieron las estructuras tridimensionales de MAP-E4orf4 y E4orf4 por medio del modelo de inteligencia artificial AlphaFold V2 [68]. En la figura 2 se observan las estructuras tridimensionales coloreadas basándose en sus respectivos pLDDT (prueba en la Diferencia de la Distancia Local Predicha). Esta medición es un indicador del modelo sobre su seguridad con respecto a la estructura local al compararse con resultados experimentales y qué tan seguro está de que se asemejen. Los colores representan el valor pLDDT obtenido en cada aminoácido, entre mayor este valor más confiable es su acomodo en el espacio. Las estructuras fueron visualizadas en el servidor PAE Viewer (sitio: http://www.subtiwiki.uni-goettingen.de/v4/paeViewerDemo). Tanto la estructura nativa de E4orf4 como la de MAP-E4orf4 mostraron la conservación de un acomodo de 3 alfa hélices, previamente reportadas en otro trabajo el cual también utilizó métodos computacionales para el estudio de la estructura tridimensional de esta proteína [71].

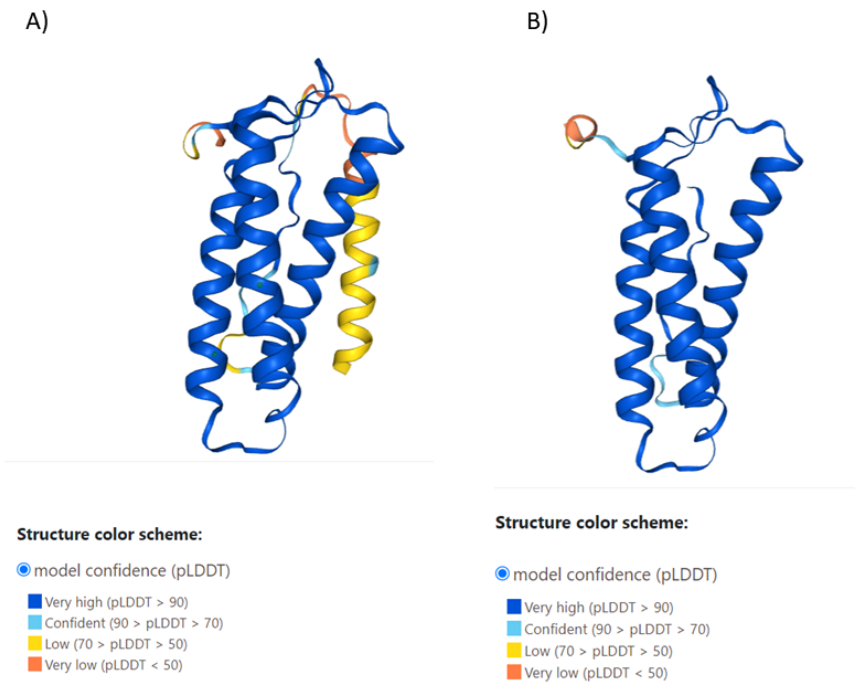


Figura 2. Visualización de las estructuras predichas por AlphaFold V2. A) MAP-E4orf4. B) E4orf4.

En la Figura 2 se puede observar cómo la región MAP en la fusión MAP-E4orf4 conservó su estructura secundaria de alfa hélice (inciso A, región amarilla), la cual ya ha sido previamente observada experimentalmente [66]. Teniendo entonces los resultados de las estructuras terciarias de estas proteínas, se realizó el alineamiento entre E4orf4 y MAP-E4orf4 con la herramienta bioinformática PyMol, con la cual además se calculó el valor de *Root Mean Square Deviation* (RMSD), obteniendo un resultado de 0.273 (Figura. 3).

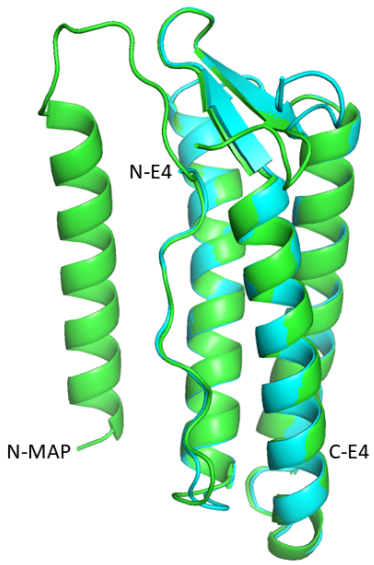


Figura 3. Alineación entre las estructuras predichas de E4orf4 y MAP-E4orf4.

3.2.2. Obtención de los dockings entre los principales colaboradores de E4orf4 (PP2A-B55 y c-Src) con MAP-E4orf4 y E4orf4.

Se generaron en total 4 complejos proteína-proteína por medio de la realización de dockings con el servidor de dockings computacional ClusPro 2.0. Cada uno de estos complejos representa el modelo central con más miembros en su *cluster* local de acuerdo con el programa de docking PIPER [72] empleado por la versión utilizada de ClusPro.

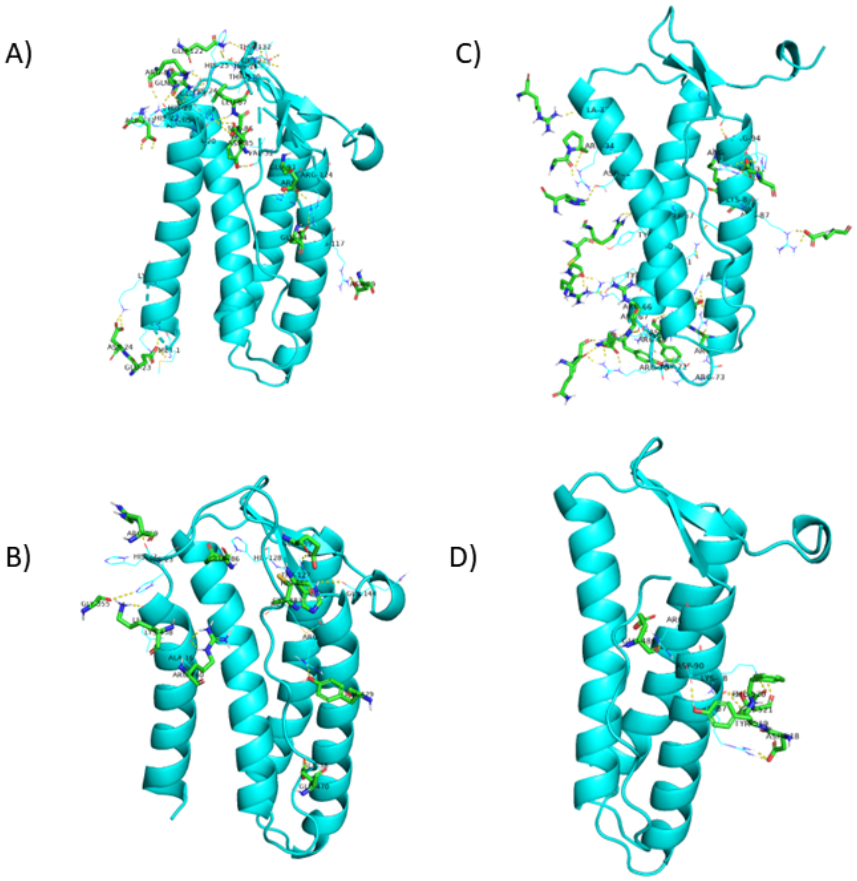


Figura 4. Visualización del mejor modelo de cada uno de los 4 dockings realizados. A) MAP-E4orf4 con PP2A-B55, B) MAP-E4orf4 con c-Src, C) E4orf4 con PP2A-B55, D) E4orf4 con c-Src

En la Figura 4, de color azul claro se encuentra la estructura de MAP-E4orf4; de verde se encuentran los átomos de carbono, de azul los de nitrógeno y de rojo los de oxígeno de los residuos tanto de PP2A o c-Src, respectivamente, en interacción con MAP-E4orf4. Las líneas punteadas denotan puentes de hidrógeno formados.

3.3. Expresión y purificación de las proteínas

Los primeros ensayos de expresión donde se lisaron las células con Sample Buffer mostraron niveles prometedores de proteína MAP-E4orf4 en la fracción soluble.

Figura 5. Niveles de expresión de MAP-E4orf4 a 2 tiempos de inducción. Arriba de los carriles se menciona si pertenecen a la fracción Soluble o Insoluble (representado como “Ins”), así como el periodo de inducción al que pertenecen (4 h o 18 h)

En la figura anterior se emplearon 2 condiciones de expresión: Una donde se indujo la expresión con 1 mM de IPTG y un periodo de inducción de 4 h a 37°C/220 rpm mientras que la segunda condición fue con 0.2 mM de IPTG a 25°C/220 rpm por 18 h. Esta inducción se colocó por duplicado en el gel para la fracción soluble.

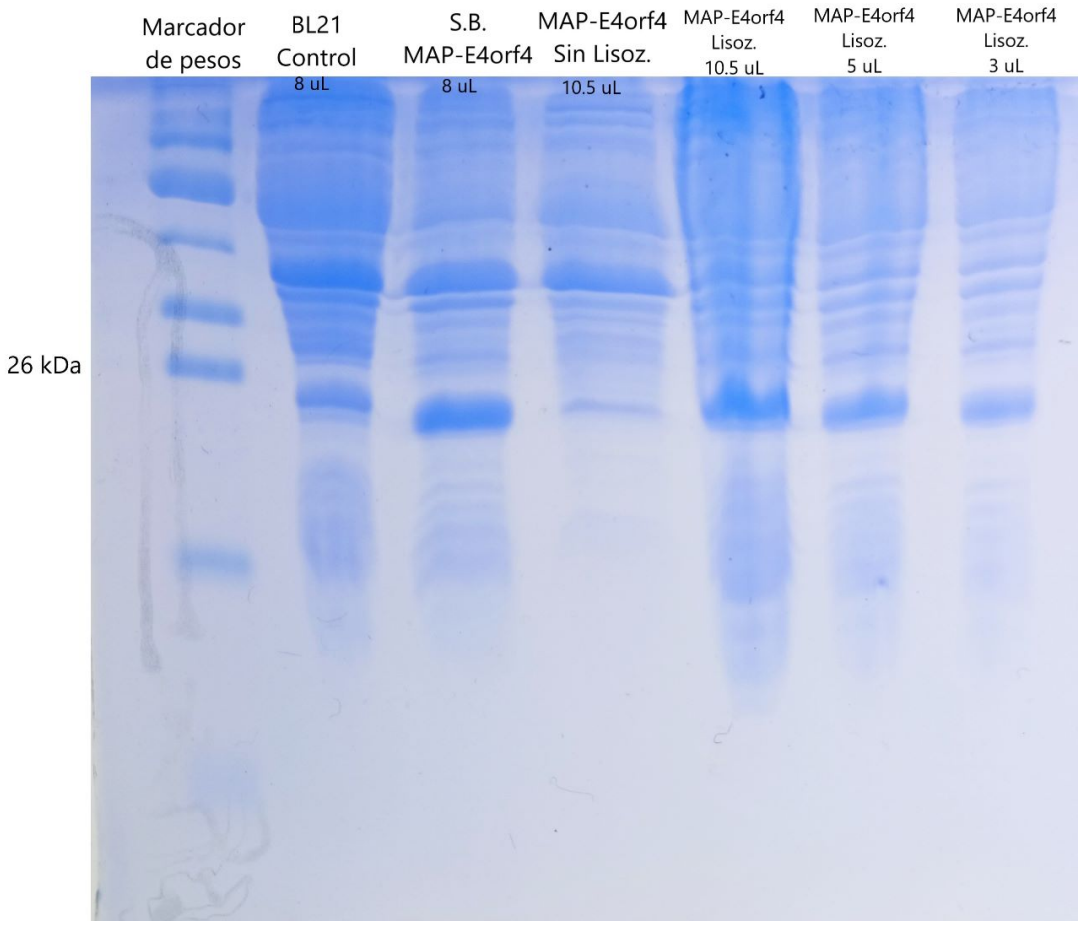


Figura 6. Ensayos de lisis con el buffer B-PER con o sin lisozima presente. Los carriles de izquierda a derecha son: Marcador de peso molecular, Lisado control de BL21 sin transformar, Fracción soluble obtenida con Sample Buffer de células transformadas, Lisado obtenido usando B-PER sin lisozima y los 3 carriles siguientes con diferentes cantidades de lisado utilizando B-PER con lisozima

En la Figura 6 pueden verse las diferencias de realizar la lisis utilizando el buffer B-PER con o sin lisozima presente (0.1 %). Se cargaron distintas cantidades de muestra de lisado con lisozima en caso de que la concentración de una de estas fuera tal que causara artefactos en el carril. Teniendo definidas las condiciones de

lisis, se procedió con los ensayos de purificación de proteína empleando el equipo de FPLC AKTA Prime Plus.

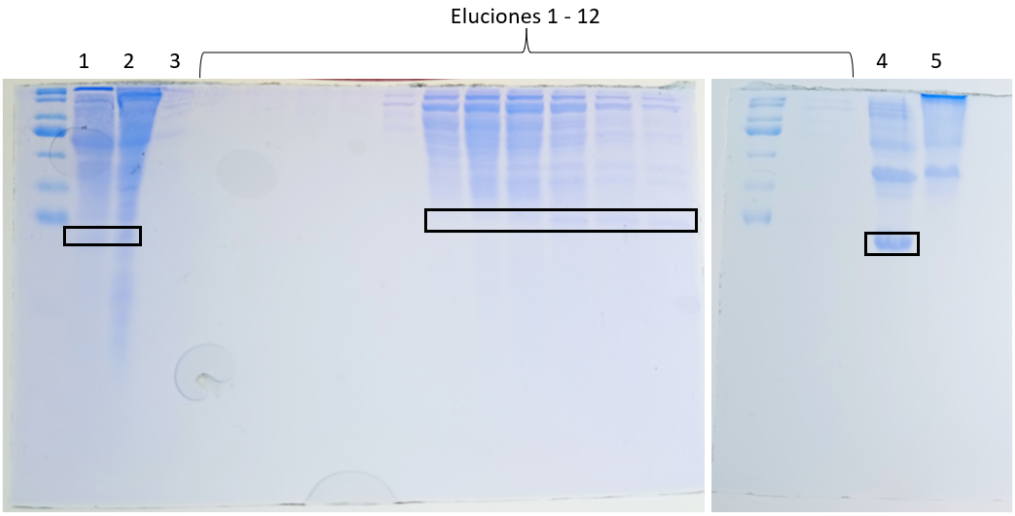


Figura 7. Purificación de MAP-E4orf4 por medio de un equipo de FPLC

En la Figura 7 se observan todas las eluciones obtenidas, las cuales fueron de 0.5 mL utilizando buffer Tris con Imidazol 200 mM. Los carriles enumerados en los geles son los siguientes:

1) Clarificado de MAP-E4orf4 sin uso de lisozima.
2) Clarificado de MAP-E4orf4 utilizando lisozima.
3) Flowthrough de la muestra a través del equipo.
4) Extracción con Sample Buffer de MAP-E4orf4.
5) Control BL21 negativo.

Finalmente, se procedió a concentrar las eluciones con presencia de MAP-E4orf4, obteniendo una alícuota de mayor concentración con la que se procedió con los siguientes experimentos. Utilizando la herramienta ImageJ2 para analizar las fotos de los geles de SDS-PAGE, se obtuvo un nivel de pureza relativo de aproximadamente un 20 %.

3.4 Análisis por Western Blot de MAP-E4orf4

Se realizó el análisis por Western Blot de la proteína MAP-E4orf4, usando como control negativo la fracción de proteínas solubles de la cepa *E. coli BL21(DE3)* sin transformar:

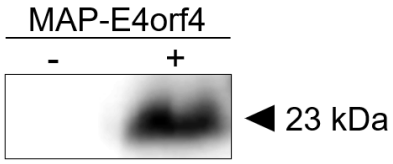


Figura 8. Western Blot de la proteína expresada MAP-E4orf4

En la Figura 8 se visualiza primeramente el control negativo de *E. coli* sin transformar con la construcción, identificado con el símbolo (-), y en seguida se observa la banda del clarificado obtenido de células transformadas, identificada con el símbolo (+). El ensayo se realizó una sola vez, utilizando la misma cantidad de proteína tanto en el control negativo como en la alícuota de proteína de interés.

3.5. Evaluación de la viabilidad de MAP-E4orf4 y E4orf4 en distintas líneas de cáncer y su citotoxicidad en la línea celular Vero

Los resultados de viabilidad y toxicidad obtenidos con MAP-E4orf4 y un control de purificado de proteínas de *E. coli (BL21 DE3)* de los ensayos con MTT en las líneas celulares A549, MCF7 y Vero son mostrados en gráficos lineales.

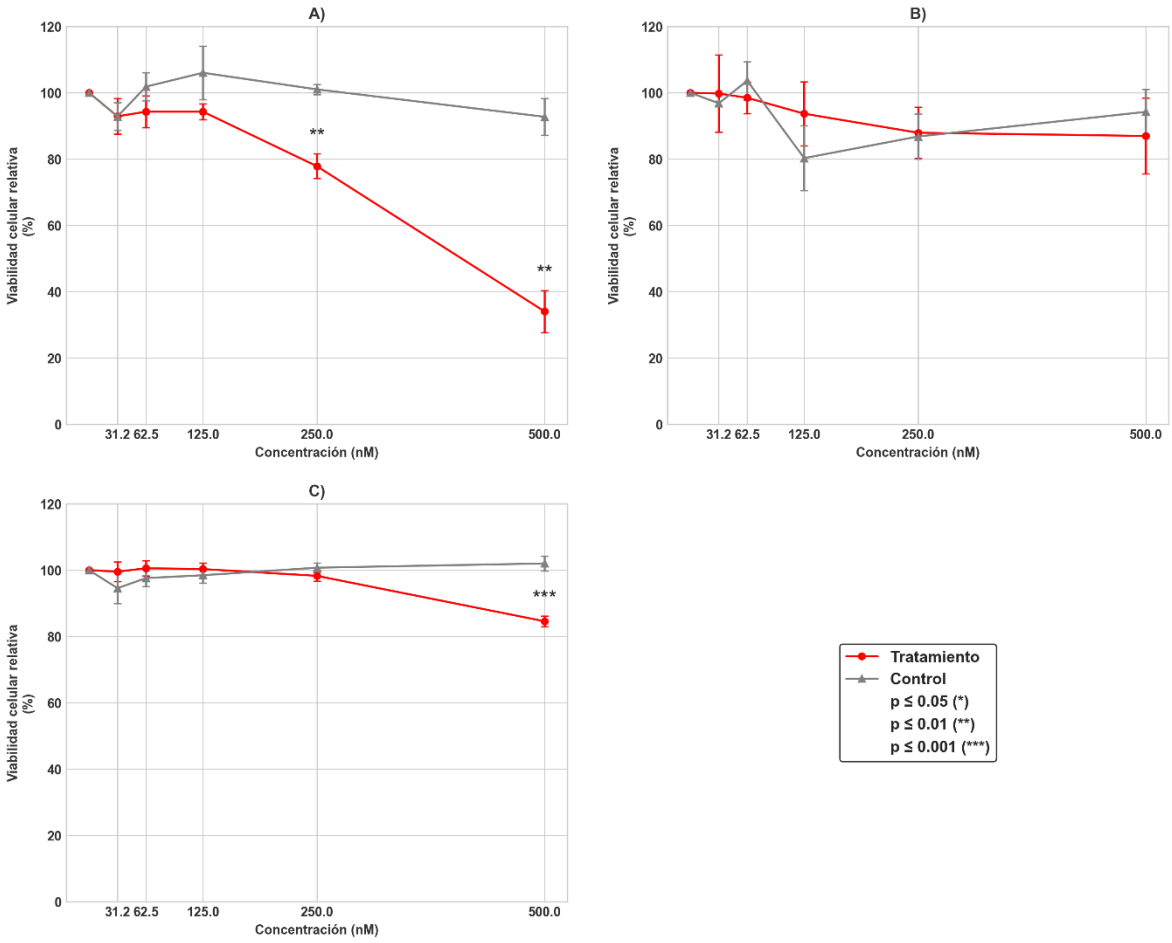


Figura 9. Viabilidad de MAP-E4orf4 en las líneas celulares A549, MCF7 y Vero por ensayo de MTT. A) Línea celular A549, B) Línea celular MCF7, C) Línea celular Vero. Se muestran barras de error estándar (SE) a 95 %

De las 3 líneas celulares evaluadas, MCF-7 mostró la mayor variación, la cual se observa en su respectiva gráfica en la Figura 9. En las células A549 se observó la mayor actividad antiproliferativa del tratamiento con MAP-E4orf4, además de observarse la naturaleza dosis-dependiente de este efecto [73, 74]. En la línea celular Vero se obtuvo la menor variación entre las distintas concentraciones y se pudo apreciar una reducción en la viabilidad celular a la máxima concentración de E4orf4.

Observando los resultados obtenidos, se denota que solo el grupo de Tratamiento en la línea A549 sigue la curvatura característica de una gráfica dosis-respuesta, por lo que se procedió a calcular el EC50 para esta línea, resultando en un valor de 386.14 nM. De igual forma se intentó realizar el cálculo de EC50 del tratamiento para el resto de las líneas celulares y se obtuvieron valores extremadamente elevados, con lo cual nos quedamos solamente con el resultado en A549.

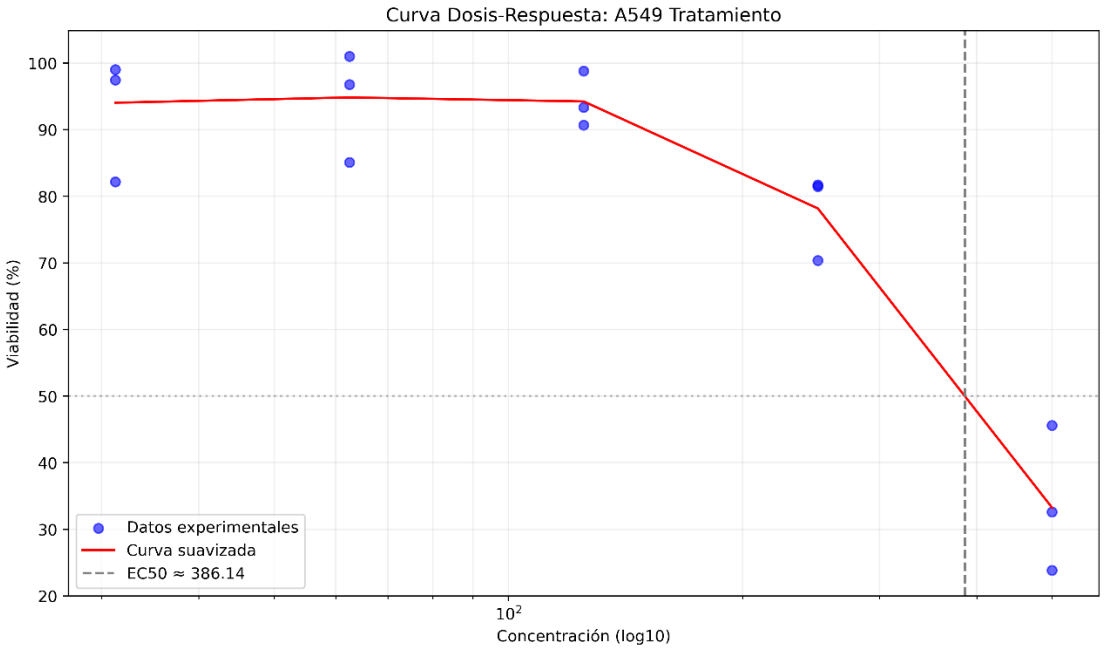


Figura 10. Curva Dosis-Respuesta obtenida de los ensayos de MTT en la línea A549. El eje X es el logaritmo en base 10 de las concentraciones de tratamiento con MAP-E4orf4.

Para determinar la presencia de significancia estadística en estos resultados se llevaron a cabo análisis ANOVA de 2 factores con respecto a cada línea celular, donde los dos factores fueron el grupo de tratamiento (Tratamiento o Control) y las concentraciones, además de realizar el mismo análisis para las viabilidades comparadas a la concentración máxima de tratamiento usada, quitando así la concentración como factor y utilizando la línea celular y el tratamiento usado como las variables independientes.

El análisis ANOVA arrojó que en las líneas A549 y la comparación de tratamientos a la máxima concentración había aporte significativo tanto por los factores individuales como por sus interacciones (entre el tratamiento y la

concentración para las células A549 y entre el tratamiento y la línea celular para la comparación de tratamientos a máxima concentración). En la línea Vero solo se observó aporte de la interacción entre el tratamiento y la concentración. En MCF7 no se observó significancia estadística por ningún factor ni interacción. Cabe aclarar que en el caso de la línea MCF7 al tenerse una muestra desbalanceada entre las réplicas de tratamiento y de control, se utilizó el valor *2* en el parámetro "*typ"* de la función de análisis ANOVA de la librería *Statsmodels*.

Una vez teniendo los resultados del análisis ANOVA, exceptuando para la línea Vero puesto que ésta no presentó significancia estadística, se realizó el análisis de Tukey como prueba *post-hoc* para identificar las combinaciones entre concentraciones, tratamientos y líneas celulares estadísticamente diferentes entre sí, como se puede apreciar en la Tabla 3, Anexo B. En la línea A549 se observó la mayor cantidad de combinaciones diferentes, resaltando entre distintas observaciones, como en todas las combinaciones entre tratamiento control a través de todas sus concentraciones con el tratamiento con MAP-E4orf4 a 500 nM hay diferencia significativa, también se aprecia como entre la concentración de 250 nM y de 500 nM de MAP-E4orf4 ya hay diferencia significativa.

En el caso de las células Vero hubo menos observaciones estadísticamente significativas, sin embargo, se denota diferencia en viabilidad entre la máxima concentración de tratamiento y control a sus diferentes concentraciones, así como entre la máxima concentración de tratamiento y algunas concentraciones menores. En la comparación de tratamientos a la máxima concentración se puede observar cómo la viabilidad del tratamiento con MAP-E4orf4 en A549 es significativamente

distinta al resto de líneas tanto con tratamiento control como con MAP-E4orf4, además, hay diferencia entre control y tratamiento en las células A549.

3.6 Evaluación de la internalización de MAP-E4orf4 en la línea celular de cáncer A549

Se obtuvieron fotografías de los ensayos de internalización con el tratamiento de proteína, sus respectivos controles y a los dos tiempos de incubación con tratamiento utilizados. De cada cuadrante capturado se tomaron imágenes con tres canales.

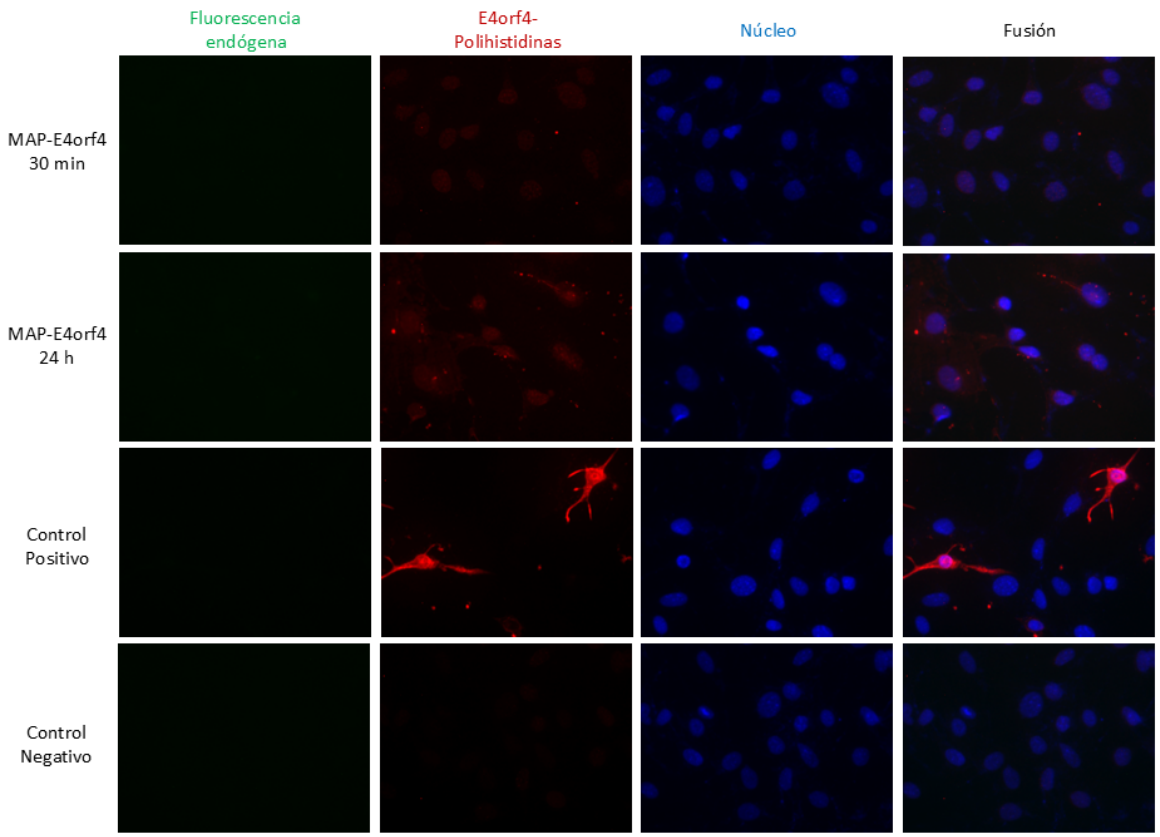


Figura 11. Imágenes capturadas por microscopía de fluorescencia de la internalización de MAP-E4orf4 en células A549, magnificación total 400X

En las imágenes obtenidas se resaltó la señal roja emitida por Alexa Fluor™ Plus 555 en ambos tratamientos con MAP-E4orf4 y controles. A comparación del control negativo donde la señal roja luce sumamente tenue, se aprecia como en ambos periodos de tratamiento con MAP-E4orf4 la señal del anticuerpo secundario es observable; en el tratamiento por 30 min con MAP-E4orf4 la señal se ve localizada prácticamente de manera exclusiva en el núcleo celular, mientras que a las 24 h se ve no solo una mayor intensidad en los núcleos sino además se observa señal a nivel del citoplasma de las células. En el control positivo se ve una fluorescencia marcada específicamente en dos células tanto a nivel de sus núcleos como del citosol.

CAPÍTULO 4

4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se diseñó una proteína quimérica utilizando la secuencia del CPP MAP y la proteína E4orf4 del adenovirus humano. Se realizaron pruebas *in silico* para comprobar que dicha construcción mantuviese sus características necesarias para su actividad anticancerígena, para después proceder a expresar y purificar esta proteína recombinante. Una vez teniendo una cantidad suficiente de la proteína, se procedió a evaluar *in vitro* la actividad anticancerígena en 2 líneas celulares neoplásicas y la citotoxicidad en la línea control Vero.[73]

4.1. Predicción y modelado de las estructuras tridimensionales

Las estructuras tridimensionales de MAP-E4orf4 y E4orf4 fueron generadas utilizando el programa computacional AlphaFold V2 en su presentación en la nube como una interfaz interactiva (*notebook*) en Google Colab [68, 75]. De manera breve, AlphaFold 2 es un programa basado en redes neuronale, utilizando la estructura de transformador que le permite aprender asociaciones entre secuencias de caracteres, en este caso permitiéndole al programa aprender asociaciones entre las secuencias de aminoácidos, sus interacciones respecto al posicionamiento global y una mejor predicción del acomodo espacial respecto a secuencias con homologías conocidas [76–78].

Esta innovadora estructura ha permitido a AlphaFold conseguir el primer lugar en las competiciones CASP13 y CASP14, una competencia anual donde se compara la precisión y certeza de modelos computacionales de la predicción de estructuras tridimensionales de proteínas, donde AlphaFold V1 (CASP13) y V2 (CASP14) obtuvo los mejores resultados entre todos los modelos participantes por

un gran margen, en especial en el modelado *ab initio*, el cual consiste en modelar la estructura tridimensional de proteínas sin homología conocida a otras proteínas de estructura resuelta [79].

Para E4orf4, la estructura tridimensional obtenida presentó un buen puntaje pLDDT, valor que representa el error predicho por el mismo programa de cada aminoácido respecto a su conformación en el espacio, además de confirmar la estructura de 3 alfa-hélices previamente reportada por Kleinberger y colaboradores en un estudio donde la predicción estructural se llevó a cabo con el programa QUARK [71, 80]. Hasta la fecha, este ha sido el único trabajo donde se ha utilizado AlphaFold V2 para la predicción tridimensional de E4orf4, pudiéndose tomar este como el mayor acercamiento a lo que sería su estructura nativa [79].

La estructura MAP-E4orf4 conservó cerca del 100 % de la conformación nativa de E4orf4, presentando la mayor región de incertidumbre en la alfa-hélice del péptido MAP (Figura 2). Además, la alineación entre MAP-E4orf4 y E4orf4 realizada y visualizada con el software PyMol mostró una similitud >95 % entre las secuencias de E4orf4 de ambas proteínas y con un valor RMSD de 0.273, se puede interpretar que la adición del CPP MAP no altera la estructura terciaria de E4orf4, siendo esta una evidencia considerable con respecto a la conservación de su actividad anticancerígena [71].

4.2. Análisis de los dockings moleculares

Los dockings obtenidos entre las proteínas MAP-E4orf4 y E4orf4 con los principales colaboradores de la actividad anticancerígena de E4orf4 tuvieron diferencias particulares entre sí. Para la proteína nativa E4orf4, se pudo observar el

mayor número de interacciones con PP2A-B55 a comparación de c-Src (Figura 4 C y D). Resulta interesante que la interacción entre E4orf4 y c-Src se limitó a 3 residuos de E4orf4 mientras que en la literatura se ha reportado la importancia de la unión entre el *motiff* ARM con esta quinasa [81]. Esto pudiese explicarse debido a que las interacciones entre E4orf4 y c-Src estén dadas por un cambio conformacional dado ya sea por la fosforilación de E4orf4 o de la misma quinasa, lo cual no sería apreciable a través de los dockings computacionales realizados.

En el caso de MAP-E4orf4 con relación a las interacciones con c-Src, estas aumentaron al añadir la secuencia MAP (Figura 4 B). Esto pudiera proveer de evidencia *in silico* del posible incremento en la contribución a la vía citosólica de muerte celular provocada por E4orf4 en colaboración con c-Src, para esto sin embargo se requeriría validar por medio de ensayos *in vitro* [56, 57].

Volviendo a los dockings con PP2A-B55, es por lo menos muy interesante ver como los aminoácidos en interacción cambiaron de región respecto a la estructura del ligando (MAP-E4orf4 o E4orf4), donde en presencia de MAP las interacciones se ven localizadas en a la zona superior de la proteína (Figura 4 A) mientras que en la región E4orf4 las interacciones están presentes principalmente en la α-hélice n-terminal y la hélice c-terminal (Figura 4 C). Estas interacciones pudieran tener impacto en la contribución de PP2A-B55 a la muerte celular ya sea de manera positiva o negativa, para lo que se requeriría de más estudios para corroborar dicha contribución.

4.3. Expresiones y purificaciones de las proteínas

Observando la Figura 5, se puede apreciar cómo aproximadamente la mitad de la proteína en la inducción de 18 h se quedó en la fracción soluble. En base a lo observado, a partir de este punto las condiciones de expresión en los posteriores ensayos fue igual al de 18 h en este ensayo, la única diferencia siendo que se redujo el tiempo de inducción a 16 h.

En los primeros ensayos de lisis con el buffer comercial B-PER se evaluó la diferencia en el nivel de proteína obtenida en el clarificado agregando o no lisozima. Como se aprecia en la Figura 6, la adición de lisozima aumentó drásticamente el nivel de proteína MAP-E4orf4 (23 kDa) y una aparente mejoría general en la lisis de las células. Otro efecto no ilustrado del uso de lisozima fue la gran viscosidad del clarificado debido a la liberación del DNA genómico de las bacterias, por lo que en posteriores ensayos se añadió DNasa I para mitigar este fenómeno. En los resultados finales de la purificación podemos observar que el nivel de pureza y rendimiento de la proteína fueron bajos.

El ensayo de Western Blot nos permitió confirmar la presencia de nuestra proteína de interés en las fracciones solubles de *E. coli* inducida a expresar las proteínas recombinantes, debido a la afinidad del anticuerpo primario empleado dirigido hacia la secuencia de histidinas presente.

Los trabajos sobre la expresión de E4orf4 como proteína recombinante son pocos y más escasos son todavía aquellos donde se evalúe la actividad citotóxica de esta. Huang et al. (2006) expresaron la proteína de fusión MBP-E4orf4 con el propósito de generar anticuerpos policlonales en conejos como parte de un estudio

del mismo grupo de trabajo donde se produjo la proteína de fusión EGF-E4orf4 en *Pichia pastoris* como potencial agente anticancerígeno, la cual demostró especificidad hacia células malignas [73, 82]. La selección de este sistema estuvo basada principalmente en las modificaciones postraduccionales de EGF, puesto que E4orf4 no presenta modificaciones en su estructura, más allá de la fosforilación en algunos residuos cuando la proteína se encuentra en la célula diana [46]. Hasta el momento, en el resto de los trabajos donde se ha expresado E4orf4 en *Escherichia coli, esto se ha realizado* únicamente con el fin de generar anticuerpos anti-E4orf4, sin evaluar la actividad celular de esta proteína. [46]

Con tan escasos avances en el campo de la expresión de E4orf4 en sistemas de expresión procariota, aunado con las dificultades que se han tenido en el presente trabajo se puede observar una tendencia respecto a las dificultades que se tiene con esta proteína para su producción en este tipo de sistemas.

4.4 Evaluación de la citotoxicidad de MAP-E4orf4 y E4orf4 en distintas líneas celulares

Son contados los trabajos que evalúen la actividad de E4orf4 en el contexto de su actividad anticancerígena por medio de su uso como proteína purificada o sintetizada [73, 74, 82, 83]. En el presente trabajo se observó una marcada actividad anticancerígena en la línea de carcinoma de pulmón A549, no observándose actividad significativa en la línea de adenocarcinoma de mama MCF7 y demostrando un grado marcadamente bajo de citotoxicidad en la línea de células de riñón de mono verde Vero.

Debido a los pocos trabajos que se tienen de E4orf4 como previamente describimos, son pocas las líneas celulares en que se ha evaluado esta proteína. Hasta el momento las únicas líneas que se tienen reportadas donde se ha evaluado en cultivo la actividad antiproliferativa de E4orf4 como proteína son la línea de osteosarcoma Saos-2 (-p53, +EGFR), la línea de células de endotelio umbilical humano HUVEC, adenocarcinoma de mama triple negativo MDA-MB-231, línea de cáncer gástrico BGC823 (de este última ha salido evidencia en los últimos años que demuestra se trata de una línea contaminada de HeLa [84, 85]) y la línea humana de glioblastoma U87G. De esta última línea, Colle et al. (2019) evaluó diferentes péptidos truncados provenientes de la secuencia de E4orf4 del HAdV-2, reportando una viabilidad de menos del 30 % del péptido denominado “LadD” a una concentración de 150 µM con un periodo de incubación de 24 h. En 50 µM y con la misma incubación, se observó una viabilidad de aproximadamente 50 %.

En el ensayo de viabilidad en la línea A549 se puede ver una aparente disminución en la proliferación desde la concentración más baja probada con MAP-E4orf4 de 31.25 nM, sin embargo, la primera concentración en la que se obtuvo una diferencia significativa en viabilidad fue de 250 nM. Comparando estos resultados con lo reportado por el equipo de investigadores de Bing-Ren Huang en dos distintas publicaciones [73, 74], ambos trabajos utilizando EGF-E4orf4 y MTT, donde obtuvieron una proliferación aproximadamente del 70 % a una concentración de 2.5 nM y del 59 % a 250 nM, tras 48h de incubación en células BGC823; del segundo trabajo, en la línea Saos-2 el equipo de trabajo obtuvo una reducción en la viabilidad de aproximadamente el 50 % con 250 nM de EGF-E4orf4 a un tiempo de incubación

de 72h, mientras que del presente trabajo en A549 se obtuvo una menor reducción en la viabilidad a 250 nM de MAP-E4orf4, observándose una viabilidad del 80 % aproximadamente.

Sin embargo, considerando la reducción en viabilidad observada a 500 nM en el presente trabajo (menos del 40 % de viabilidad), recordando además que en este trabajo la pureza de la proteína recombinante fue baja, y asumiendo que en los antecedentes de EGF-E4orf4 se trabajó con una proteína de alta pureza aunque no se indicase explícitamente, los resultados obtenidos aquí son alentadores para continuar mejorando la purificación de la proteína y ver como esto puede a su vez mejorar su actividad anticancerígena.

En cuanto a nuestro control de células sanas Vero, a 250 nM se obtuvo una viabilidad arriba del 95 %, resultados comparables sino es que mejores que lo observado en HUVEC a la misma concentración de proteína, donde la viabilidad fue del 95 %. Hasta el momento, en el resto de trabajos donde se ha expresado E4orf4 en *Escherichia Coli* únicamente se ha hecho con el fin de generar anticuerpos anti-E4orf4, sin evaluar la actividad de la proteína en células.

Si bien no una comparación completamente directa, Kleinberger et al. (2019) probó los efectos de E4orf4 en un vector inducible con doxorrubicina en las líneas A549 y HeLa sobre la actividad de PARP-1 [60]. En este trabajo se observó que la inducción de E4orf4 en dichas células disminuía de manera detectable la cantidad de proteínas pariladas (proteínas a las que se les adicionó cadenas de PAR), lo cual se traduce en primera instancia a una disminución en la actividad de la red DDR, y por consiguiente, a la acumulación de daño al ADN. Esta acumulación termina

finalmente en la muerte de las células cancerígenas [59]. Con estos trabajos previos, podemos deducir que la proteína recombinante MAP-E4orf4 indujo la muerte en las células A549 por los mecanismos previamente descritos.

En el caso de la línea celular Vero, su propósito en este trabajo fue el de representar un modelo de células no malignas, como ya se ha hecho en múltiples labores de investigación sobre el cáncer, incluyendo trabajos con otra proteína viral anticancerígena, Apoptina [86, 87]. En los ensayos realizados de citotoxicidad sobre esta línea con MAP-E4orf4 se obtuvo una diferencia en la viabilidad entre el control y el tratamiento a su concentración máxima, así mismo, se observó en el ANOVA interacción estadísticamente significativa entre el tipo de tratamiento y las concentraciones usadas (Fig. 10 y Tabla 2, Anexo B). En la prueba HSD de Tukey (Tabla 3) se obtuvo que la viabilidad en las células variaba conforme aumentaba la concentración del tratamiento con MAP-E4orf4 y que había diferencia entre las mayores concentraciones de tratamiento y control.

Con todo esto dicho, es necesario resaltar que la máxima disminución en la viabilidad observada fue en torno al 80 % con la máxima concentración de proteína, mientras en comparación, con las células A549 se obtuvo una viabilidad media de 34.02 %. En trabajos similares con la anterior mencionada proteína “hermana” Apoptina, con diferencias semejantes entre las líneas cancerígenas probadas y aquellas líneas control de células no malignas, se reportan estas diferencias en viabilidad como evidencia de la selectividad de la proteína recombinante en cuestión sobre células cancerígenas [88, 89].

Para el caso de la actividad (o la falta de ésta) observada en la línea MCF7, hay varios puntos a discutir. Primeramente, en lo que concierne a la literatura, trabajos como los de Lavoie et al. 2006 y 2008 demuestran diferentes mecanismos por los que E4orf4 induce la muerte en esta línea celular. En el primer trabajo se estudió como E4orf4 producía alteraciones en la dinámica de actina en MCF7 que culminaban con la muerte apoptótica caspasa-independiente de estas células [90]. Y en el segundo trabajo por el mismo laboratorio se observó que E4orf4 por medio de interacciones con la quinasa JNK terminaba promoviendo tensión celular en MCF7 la cual conllevaba a su muerte [91].

La segunda explicación postula que las diferencias entre líneas de MCF7 cultivadas por distintos laboratorios alteran sus respuestas a diferentes tratamientos. Para explicar este fenómeno se toma como evidencia trabajos que han mostrado heterogeneidad entres distintas sublíneas generadas de MCF7 [92], así como diferencias en los perfiles genómicos, transcriptómicos y metabolómicos de células provenientes de un mismo lote de MCF7 obtenido directamente de la ATCC y cultivadas por dos laboratorios distintos, a diferentes pases. De este último trabajo específicamente por Kleensang et al. (2016), además de las diferencias ya mencionadas, se observó que ambas vertientes de MCF7 respondían de distinta manera a la presencia de estradiol [93]. Es así como podemos formular la hipótesis de que el cultivo realizado de MCF7 en el presente trabajo pudo diferir fenotípicamente de aquellos cultivos usados en los antecedentes de E4orf4 con dicha línea celular, por lo que se obtuvo una respuesta diferente a la proteína a comparación de lo ya reportado.

4.5 Evaluación de la internalización de MAP-E4orf4 en células cancerígenas por microscopía de fluorescencia

Distintos trabajos han reportado la localización de E4orf4 en células fuera del contexto viral. Se ha observado que la localización celular de E4orf4 en la célula se ve primeramente en el núcleo, pero tiempo después, ocurre una migración de la proteína hacia el citosol mediada por fosforilación de E4orf4 mediada por quinasas Src. La acumulación inicial de E4orf4 depende de su asociación por PP2A, por lo que podemos deducir que los primeros eventos celulares por los que E4orf4 conlleva a la muerte celular están relacionados con aquellos donde la asociación E4orf4-PP2A se ve involucrada (arresto del ciclo celular, inhibición de la DDR, entre otros) [60, 94].

Siguiendo esta tendencia, en la Figura 11 con el tratamiento de MAP-E4orf4 por 30 min se puede apreciar como la proteína se encuentra casi exclusivamente en el núcleo celular. Es en el tratamiento por 24 h en la misma figura que se aprecia como MAP-E4orf4 migró hacia el citosol de las células, encontrándose para ese punto distribuido entre el núcleo y el espacio citoplasmático. Esto concuerda con lo reportado en la literatura, por lo que el comportamiento de nuestra proteína recombinante sigue la naturaleza observada de E4orf4 en el contexto antineoplásico.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES

- La estructura tridimensional de E4orf4 consta de 3 alfa-hélices y su conformación no se ve alterada por la presencia de MAP.
- Comparando las interacciones realizadas computacionalmente entre PP2A-B55 con E4orf4 y MAP-E4of4, se obtuvieron cambios en las posiciones de estas interacciones, más no en el número de interacciones.
- Las interacciones obtenidas computacionalmente entre c-Src con E4orf4 y MAP-E4orf4 presentaron cambios en el número de interacciones con la quinasa, observándose más interacciones con MAP-E4orf4.
- MAP-E4orf4 indujo la muerte celular en la línea de cáncer de pulmón A549 mientras que tuvo un impacto mínimo en el modelo de células no malignas Vero.
- MAP-E4orf4 logró internalizarse en la línea celular A549 y demostró conservar la localización intracelular observada de E4orf4 fuera del contexto de replicación viral, dando evidencia de la conservación de la actividad nativa de esta proteína.

CAPÍTULO 6

6. PERSPECTIVAS

- Optimizar las condiciones de expresión de proteínas recombinantes con E4orf4 para mejorar tanto el rendimiento como la pureza obtenidos.
- La exploración de otros sistemas de purificación diferentes a IMAC con ion níquel para mejorar el nivel de pureza de proteína recombinante.
- Evaluar en distintas líneas de cáncer la actividad anticancerígena de MAP-E4orf4.
- Evaluar la respuesta apoptótica por parte de esta proteína en células de cáncer, explorando sobre todo los mecanismos apoptóticos no clásicos que pudiesen estarse llevando a cabo.
- Evaluar la localización celular de MAP-E4orf4 en distintas líneas celulares cancerígenas y no cancerígenas, además de estudiar la conservación del *blebbing* característico de E4orf4 asociado a quinasas Src.
- Estudiar la actividad de la MAP-E4orf4 en un modelo *in vivo*, preferentemente un modelo de roedor, primeramente.
- Estudiar en modelos de neoplasias hematológicas la actividad de MAP-E4orf4.
- Evaluar la actividad anticancerígena de MAP-E4orf4 en conjunto con otros tratamientos quimioterapéuticos.

7. REFERENCIAS

1. Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, *01*(02), i–iv. https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2

2. Mendelsohn, J., Gray, J. W., Howley, P. M., Israel, M. A., & Thompson, C. (Craig B.). (n.d.). *The molecular basis of cancer*.

3. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. https://doi.org/10.3322/caac.21660

4. Baylin, S. B., & Jones, P. A. (2016). Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(9), a019505. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019505

5. Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, *10*(8), 789–799. https://doi.org/10.1038/nm1087

6. Garber, J. E., & Offit, K. (2005). Hereditary Cancer Predisposition Syndromes. *Journal of Clinical Oncology*, *23*(2), 276–292. https://doi.org/10.1200/JCO.2005.10.042

7. Foulkes, W. D. (2008). Inherited Susceptibility to Common Cancers. *New England Journal of Medicine*, *359*(20), 2143–2153. https://doi.org/10.1056/NEJMra0802968

8. Guyton, K. Z., Rusyn, I., Chiu, W. A., Corpet, D. E., van den Berg, M., Ross, M. K., … Smith, M. T. (2018). Application of the key characteristics of carcinogens in cancer hazard identification. *Carcinogenesis*, *39*(4), 614–622. https://doi.org/10.1093/carcin/bgy031

9. Peto, R. (2000). Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ*, *321*(7257), 323–329. https://doi.org/10.1136/bmj.321.7257.323

10. Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., … Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*, *25*(9), 2097–2116. https://doi.org/10.1007/s11095-008-9661-9

11. *Diet, Nutrition, Physical Activity and Cancer: a Global Perspective*. (2018).

12. Chen, Y., Williams, V., Filippova, M., Filippov, V., & Duerksen-Hughes, P. (2014). Viral Carcinogenesis: Factors Inducing DNA Damage and Virus Integration. *Cancers*, *6*(4), 2155–2186. https://doi.org/10.3390/cancers6042155

13. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(1), 7–33. https://doi.org/10.3322/caac.21654

14. Cunningham, D., Allum, W. H., Stenning, S. P., Thompson, J. N., Van de Velde, C. J. H., Nicolson, M., … Chua, Y. J. (2006). Perioperative Chemotherapy versus Surgery Alone for Resectable Gastroesophageal Cancer. *New England Journal of Medicine*, *355*(1), 11–20. https://doi.org/10.1056/NEJMoa055531

15. Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K.-W. (2012). Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Sciences*, *9*(3), 193–199. https://doi.org/10.7150/ijms.3635

16. Budach, W., Bölke, E., Kammers, K., Gerber, P. A., Nestle-Krämling, C., & Matuschek, C. (2015). Adjuvant radiation therapy of regional lymph nodes in breast cancer - a meta-analysis of randomized trials- an update. *Radiation Oncology*, *10*(1), 258. https://doi.org/10.1186/s13014-015-0568-4

17. Wong, P.-P., Demircioglu, F., Ghazaly, E., Alrawashdeh, W., Stratford, M. R. L., Scudamore, C. L., … Hodivala-Dilke, K. M. (2015). Dual-Action Combination Therapy Enhances Angiogenesis while Reducing Tumor Growth and Spread. *Cancer Cell*, *27*(1), 123–137. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.10.015

18. Cheung-Ong, K., Giaever, G., & Nislow, C. (2013). DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. *Chemistry & Biology*, *20*(5), 648–659. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.04.007

19. Schirrmacher, V. (2018). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International Journal of Oncology*, *54*(2), 407–419. https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4661

20. West, H. (Jack), & Jin, J. (2015). Neoadjuvant Therapy. *JAMA Oncology*, *1*(4), 550. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.1241

21. DeVita, V. T., & Chu, E. (2008). A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Research*, *68*(21), 8643–8653. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6611

22. Cleeland, C. S., Bennett, G. J., Dantzer, R., Dougherty, P. M., Dunn, A. J., Meyers, C. A., … Lee, B.-N. (2003). Are the symptoms of cancer and cancer treatment due to a shared biologic mechanism? *Cancer*, *97*(11), 2919–2925. https://doi.org/10.1002/cncr.11382

23. Hesketh, P. J. (2008). Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting. *New England Journal of Medicine*, *358*(23), 2482–2494. https://doi.org/10.1056/NEJMra0706547

24. Mezzanotte, J. N., Grimm, M., Shinde, N. V., Nolan, T., Worthen-Chaudhari, L., Williams, N. O., & Lustberg, M. B. (2022). Updates in the

Treatment of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Current Treatment Options in Oncology*, *23*(1), 29–42. https://doi.org/10.1007/s11864-021-00926-0

25. Arora, A., & Scholar, E. M. (2005). Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *315*(3), 971–979. https://doi.org/10.1124/jpet.105.084145

26. Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., … Sawyers, C. L. (2001). Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *344*(14), 1031–1037. https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441401

27. Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., … Haber, D. A. (2004). Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *New England Journal of Medicine*, *350*(21), 2129–2139. https://doi.org/10.1056/NEJMoa040938

28. Scott, A. M., Wolchok, J. D., & Old, L. J. (2012). Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*, *12*(4), 278–287. https://doi.org/10.1038/nrc3236

29. Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., … Norton, L. (2001). Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That

Overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine*, *344*(11), 783–792. https://doi.org/10.1056/NEJM200103153441101

30. Maloney, D. G., Grillo-López, A. J., White, C. A., Bodkin, D., Schilder, R. J., Neidhart, J. A., … Levy, R. (1997). IDEC-C2B8 (Rituximab) Anti-CD20 Monoclonal Antibody Therapy in Patients With Relapsed Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood*, *90*(6), 2188–2195. https://doi.org/10.1182/blood.V90.6.2188

31. Sequist, L. V., Waltman, B. A., Dias-Santagata, D., Digumarthy, S., Turke, A. B., Fidias, P., … Engelman, J. A. (2011). Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Science Translational Medicine*, *3*(75). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002003

32. Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP–dependent transporters. *Nature Reviews Cancer*, *2*(1), 48–58. https://doi.org/10.1038/nrc706

33. Yap, T. A., Sandhu, S. K., Workman, P., & de Bono, J. S. (2010). Envisioning the future of early anticancer drug development. *Nature Reviews Cancer*, *10*(7), 514–523. https://doi.org/10.1038/nrc2870

34. Marusyk, A., Almendro, V., & Polyak, K. (2012). Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nature Reviews Cancer*, *12*(5), 323–334. https://doi.org/10.1038/nrc3261

35. Collins, I., & Workman, P. (2006). New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nature Chemical Biology*, *2*(12), 689–700. https://doi.org/10.1038/nchembio840

36. Duncan, R. (2006). Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nature Reviews Cancer*, *6*(9), 688–701. https://doi.org/10.1038/nrc1958

37. Joyce, J. A., & Fearon, D. T. (2015). T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science*, *348*(6230), 74–80. https://doi.org/10.1126/science.aaa6204

38. Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, *12*(4), 252–264. https://doi.org/10.1038/nrc3239

39. Russell, S. J., Peng, K.-W., & Bell, J. C. (2012). Oncolytic virotherapy. *Nature Biotechnology*, *30*(7), 658–670. https://doi.org/10.1038/nbt.2287

40. Kaufman, H. L., Kohlhapp, F. J., & Zloza, A. (2015). Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, *14*(9), 642–662. https://doi.org/10.1038/nrd4663

41. Lynch, J., & Kajon, A. (2016). Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, *37*(04), 586–602. https://doi.org/10.1055/s-0036-1584923

42. Howley, P. M., Knipe, D. M., & Whelan, S. (2020). *Fields Virology: Emerging Viruses* (7th ed.). LWW.

43. Nevins, J. R., Ginsberg, H. S., Blanchard, J.-M., Wilson, M. C., & Darnell, J. E. (1979). Regulation of the Primary Expression of the Early Adenovirus Transcription Units. *Journal of Virology*, *32*(3), 727–733. https://doi.org/10.1128/jvi.32.3.727-733.1979

44. Huang, M. M., & Hearing, P. (1989). Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection. *Journal of Virology*, *63*(6), 2605–2615. https://doi.org/10.1128/jvi.63.6.2605-2615.1989

45. Halbert, D. N., Cutt, J. R., & Shenk, T. (1985). Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *Journal of Virology*, *56*(1), 250–257. https://doi.org/10.1128/jvi.56.1.250-257.1985

46. Kleinberger, T. (2020). Biology of the adenovirus E4orf4 protein: from virus infection to cancer cell death. *FEBS Letters*, *594*(12), 1891–1917. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13704

47. González-Cruz, A. O., Hernández-Juárez, J., Ramírez-Cabrera, M. A., Balderas-Rentería, I., & Arredondo-Espinoza, E. (2022). Peptide-based drug-delivery systems: A new hope for improving cancer therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *72*, 103362. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103362

48. Madani, F., Lindberg, S., Langel, Ü., Futaki, S., & Gräslund, A. (2011). Mechanisms of Cellular Uptake of Cell-Penetrating Peptides. *Journal of Biophysics*, *2011*, 1–10. https://doi.org/10.1155/2011/414729

49. Frankel, A. D., & Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, *55*(6), 1189–1193. https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90263-2

50. Langel, Ü. (2021). Cell-Penetrating Peptides and Transportan. *Pharmaceutics*, *13*(7), 987. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070987

51. Guidotti, G., Brambilla, L., & Rossi, D. (2017). Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends in Pharmacological Sciences*, *38*(4), 406–424. https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.01.003

52. Scheller, A., Oehlke, J., Wiesner, B., Dathe, M., Krause, E., Beyermann, M., … Bienert, M. (1999). Structural requirements for cellular uptake of α-helical amphipathic peptides. *Journal of Peptide Science*, *5*(4), 185–194. https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1387(199904)5:4<185::AID-PSC184>3.0.CO;2-9

53. Kleinberger, T. (2000). Induction of apoptosis by adenovirus E4orf4 protein. *Apoptosis*, *5*(3), 211–215. https://doi.org/10.1023/A:1009644210581

54. Marcellus, R. C., Lavoie, J. N., Boivin, D., Shore, G. C., Ketner, G., & Branton, P. E. (1998). The Early Region 4 orf4 Protein of Human

Adenovirus Type 5 Induces p53-Independent Cell Death by Apoptosis. *Journal of Virology*, *72*(9), 7144–7153. https://doi.org/10.1128/JVI.72.9.7144-7153.1998

55. Kornitzer, D., Sharf, R., & Kleinberger, T. (2001). Adenovirus E4orf4 protein induces PP2A-dependent growth arrest in Saccharomyces cerevisiae and interacts with the anaphase-promoting complex/cyclosome. *Journal of Cell Biology*, *154*(2), 331–344. https://doi.org/10.1083/jcb.200104104

56. Gingras, M.-C., Champagne, C., Roy, M., & Lavoie, J. N. (2002). Cytoplasmic Death Signal Triggered by Src-Mediated Phosphorylation of the Adenovirus E4orf4 Protein. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(1), 41–56. https://doi.org/10.1128/MCB.22.1.41-56.2002

57. Lavoie, J. N., Champagne, C., Gingras, M.-C., & Robert, A. (2000). Adenovirus E4 Open Reading Frame 4–Induced Apoptosis Involves Dysregulation of Src Family Kinases. *Journal of Cell Biology*, *150*(5), 1037–1056. https://doi.org/10.1083/jcb.150.5.1037

58. Robert, A., Miron, M.-J., Champagne, C., Gingras, M.-C., Branton, P. E., & Lavoie, J. N. (2002). Distinct cell death pathways triggered by the adenovirus early region 4 ORF 4 protein. *Journal of Cell Biology*, *158*(3), 519–528. https://doi.org/10.1083/jcb.200201106

59. Brestovitsky, A., Nebenzahl-Sharon, K., Kechker, P., Sharf, R., & Kleinberger, T. (2016). The Adenovirus E4orf4 Protein Provides a Novel

Mechanism for Inhibition of the DNA Damage Response. *PLOS Pathogens*, *12*(2), e1005420. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005420

60. Nebenzahl-Sharon, K., Sharf, R., Amer, J., Shalata, H., Khoury-Haddad, H., Sohn, S.-Y., … Kleinberger, T. (2019). An Interaction with PARP-1 and Inhibition of Parylation Contribute to Attenuation of DNA Damage Signaling by the Adenovirus E4orf4 Protein. *Journal of Virology*, *93*(19). https://doi.org/10.1128/JVI.02253-18

61. Ramaker, K., Henkel, M., Krause, T., Röckendorf, N., & Frey, A. (2018). Cell penetrating peptides: a comparative transport analysis for 474 sequence motifs. *Drug Delivery*, *25*(1), 928–937. https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1458921

62. Oehlke, J., Wallukat, G., Wolf, Y., Ehrlich, A., Wiesner, B., Berger, H., & Bienert, M. (2004). Enhancement of intracellular concentration and biological activity of PNA after conjugation with a cell-penetrating synthetic model peptide. *European Journal of Biochemistry*, *271*(14), 3043–3049. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04236.x

63. Kardinal, C., Konkol, B., Schulz, A., Posern, G., Lin, H., Adermann, K., … Feller, S. M. (2000). Cell-penetrating SH3 domain blocker peptides inhibit proliferation of primary blast cells from CML patients. *The FASEB Journal*, *14*(11), 1529–1538. https://doi.org/10.1096/fj.99-0850com

64. Oehlke, J., Lorenz, D., Wiesner, B., & Bienert, M. (2005). Studies on the cellular uptake of substance P and lysine-rich, KLA-derived model peptides. *Journal of Molecular Recognition*, *18*(1), 50–59. https://doi.org/10.1002/jmr.691

65. Rothemund, S., Krause, E., Beyermann, M., Dathe, M., Engelhardt, H., & Bienert, M. (1995). Recognition of α-helical peptide structures using high-performance liquid chromatographic retention data for d-amino acid analogues: influence of peptide amphipathicity and of stationary phase hydrophobicity. *Journal of Chromatography A*, *689*(2), 219–226. https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)00909-S

66. Krause, Eberhard., Beyermann, Michael., Dathe, Margitta., Rothemund, Sven., & Bienert, Michael. (1995). Location of an Amphipathic α-Helix in Peptides Using Reversed-Phase HPLC Retention Behavior of D-Amino Acid Analogs. *Analytical Chemistry*, *67*(2), 252–258. https://doi.org/10.1021/ac00098a003

67. Chen, X., Zaro, J. L., & Shen, W.-C. (2013). Fusion protein linkers: Property, design and functionality. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *65*(10), 1357–1369. https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039

68. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., … Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583–589. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2

69. Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., … Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nature Protocols*, *12*(2), 255–278. https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169

70. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., … Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019

71. Horowitz, B., Sharf, R., Avital-Shacham, M., Pechkovsky, A., & Kleinberger, T. (2013). Structure- and Modeling-based Identification of the Adenovirus E4orf4 Binding Site in the Protein Phosphatase 2A B55α Subunit. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(19), 13718–13727. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.343756

72. Kozakov, D., Brenke, R., Comeau, S. R., & Vajda, S. (2006). PIPER: An FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *65*(2), 392–406. https://doi.org/10.1002/prot.21117

73. Wang, D.-M., Zhou, Y., Xie, H.-J., Ma, X.-L., Wang, X., Chen, H., & Huang, B.-R. (2006). Cytotoxicity of a recombinant fusion protein of adenovirus early region 4 open reading frame 4 (E4orf4) and human epidermal growth factor on p53-deficient tumor cells. *Anti-Cancer Drugs*, *17*(5), 527–537. https://doi.org/10.1097/00001813-200606000-00006

74. Zhou, Y., Chen, H., Ma, X.-L., Xie, H.-J., Wang, C.-L., Zhang, S.-H., … Huang, B.-R. (2009). Fusion protein of adenovirus E4orf4 and human epidermal growth factor inhibits tumor cell growth. *International Journal of Cancer*, *125*(5), 1186–1192. https://doi.org/10.1002/ijc.24415

75. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., … Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583–589. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2

76. Jumper, J. , E. R. , P. A. , G. T. , F. M. , T. K. (2020). Alphafold2. *https://predictioncenter.org/casp14/zscores_final.cgi*.

77. Vaswani, A., Shazeer, N., Parmar, N., Uszkoreit, J., Jones, L., Gomez, A. N., … Polosukhin, I. (2017). Attention Is All You Need.

78. Fuchs, F. B., Wagstaff, E., Dauparas, J., & Posner, I. (2021). Iterative SE(3)-Transformers (pp. 585–595). https://doi.org/10.1007/978-3-030-80209-7_63

79. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., … Hassabis, D. (2021). Applying and improving AlphaFold at CASP14. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *89*(12), 1711–1721. https://doi.org/10.1002/prot.26257

80. Xu, D., & Zhang, Y. (2012). Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force

field. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *80*(7), 1715–1735. https://doi.org/10.1002/prot.24065

81. Champagne, C., Landry, M.-C., Gingras, M.-C., & Lavoie, J. N. (2004). Activation of Adenovirus Type 2 Early Region 4 ORF4 Cytoplasmic Death Function by Direct Binding to Src Kinase Domain. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(24), 25905–25915. https://doi.org/10.1074/jbc.M400933200

82. Bu, P.-L., Wang, D.-M., Chen, H., & Huang, B.-R. (2005). [Expression of epidermal growth factor-adenovirus E4orf4 fusion protein in tumor cells and its cytotoxicity]. *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer*, *24*(1), 33–9.

83. Colle, J. H., Périchon, B., & Garcia, A. (2019). Antitumor and antibacterial properties of virally encoded cationic sequences. *Biologics: Targets and Therapy*, *13*, 117–126. https://doi.org/10.2147/BTT.S201287

84. Ye, F., Chen, C., Qin, J., Liu, J., & Zheng, C. (2015). Genetic profiling reveals an alarming rate of cross-contamination among human cell lines used in China. *The FASEB Journal*, *29*(10), 4268–4272. https://doi.org/10.1096/fj.14-266718

85. Bian, X., Yang, Z., Feng, H., Sun, H., & Liu, Y. (2017). A Combination of Species Identification and STR Profiling Identifies Cross-contaminated

Cells from 482 Human Tumor Cell Lines. *Scientific Reports*, *7*(1), 9774. https://doi.org/10.1038/s41598-017-09660-w

86. Karadağ, A., Korkmaz, N., Aydın, A., Akbaş, H., Tekin, Ş., Yerli, Y., & Şen, F. (2020). Metalo components exhibiting significant anticancer and antibacterial properties: a novel sandwich-type like polymeric structure. *Scientific Reports*, *10*(1), 12472. https://doi.org/10.1038/s41598-020-69416-x

87. Ezami Razliqi, M., Olad, G., Dorostkar, R., Heydari, S., & Esmaeili Gouvarchin Ghaleh, H. (2020). Antiproliferative Effects of Recombinant Apoptin on Lung and Breast Cancer Cell Lines. *Archives of Iranian Medicine*, *23*(9), 593–599. https://doi.org/10.34172/aim.2020.69

88. Niesler, N., Arndt, J., Silberreis, K., & Fuchs, H. (2020). Generation of a soluble and stable apoptin-EGF fusion protein, a targeted viral protein applicable for tumor therapy. *Protein Expression and Purification*, *175*, 105687. https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105687

89. Noei, A., Nili-Ahmadabadi, A., & Soleimani, M. (2019). The Enhanced Cytotoxic Effects of the p28-Apoptin Chimeric Protein As A Novel Anti-Cancer Agent on Breast Cancer Cell Lines. *Drug Research*, *69*(03), 144–150. https://doi.org/10.1055/a-0654-4952

90. Robert, A., Smadja-Lamère, N., Landry, M.-C., Champagne, C., Petrie, R., Lamarche-Vane, N., … Lavoie, J. N. (2006). Adenovirus E4orf4 Hijacks Rho GTPase-dependent Actin Dynamics to Kill Cells: A Role for

Endosome-associated Actin Assembly. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(7), 3329–3344. https://doi.org/10.1091/mbc.e05-12-1146

91. Smadja-Lamére, N., Boulanger, M.-C., Champagne, C., Branton, P. E., & Lavoie, J. N. (2008). JNK-mediated Phosphorylation of Paxillin in Adhesion Assembly and Tension-induced Cell Death by the Adenovirus Death Factor E4orf4. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(49), 34352–34364. https://doi.org/10.1074/jbc.M803364200

92. Nugoli, M., Chuchana, P., Vendrell, J., Orsetti, B., Ursule, L., Nguyen, C., … Theillet, C. (2003). Genetic variability in MCF-7 sublines: evidence of rapid genomic and RNA expression profile modifications. *BMC Cancer*, *3*(1), 13. https://doi.org/10.1186/1471-2407-3-13

93. Kleensang, A., Vantangoli, M. M., Odwin-DaCosta, S., Andersen, M. E., Boekelheide, K., Bouhifd, M., … Hartung, T. (2016). Genetic variability in a frozen batch of MCF-7 cells invisible in routine authentication affecting cell function. *Scientific Reports*, *6*(1), 28994. https://doi.org/10.1038/srep28994

94. Li, S., Brignole, C., Marcellus, R., Thirlwell, S., Binda, O., McQuoid, M. J., … Branton, P. E. (2009). The Adenovirus E4orf4 Protein Induces G2/M Arrest and Cell Death by Blocking Protein Phosphatase 2A Activity Regulated by the B55 Subunit. *Journal of Virology*, *83*(17), 8340–8352. https://doi.org/10.1128/JVI.00711-09

ANEXO A

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Buffer salino de fosfatos PBS 1X pH 8

Disolver 1.6 g de NaCl, 288 mg de Na_2HPO_4, 40 mg de KCl y 48 mg de KH_2PO_4 en 150 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.4, aforar a 200 mL y esterilizar en autoclave.

Buffer TAE 1X

Diluir 20 mL de buffer TAE 50X con agua desionizada, aforar a 1000 mL.

Buffer TAE 50X

Disolver 48.46 g de Tris y 3.72 g de EDTA en 100 mL de agua desionizada. Agregar 11.46 mL de ácido acético glacial y aforar con agua desionizada hasta los 200 mL, seguir agitando hasta disolver los solutos por completo.

Buffer tris con imidazol 200 mM pH 7.4

Pesar 29.22 g de NaCl, 13.61 g de imidazol y 6.06 g de tris. Agregar los reactivos a un volumen de 900 mL y disolver por agitación, ajustar el pH a 7.4, filtrar la solución con un papel Whatman® de 0.4 µm y esterilizar en autoclave.

Buffer tris pH 7.4

Pesar 29.22 g de NaCl y 6.06 g de tris. Agregar los reactivos a un volumen de 900 mL y disolver por agitación, ajustar el pH a 7.4, filtrar la solución con un papel Whatman® de 0.4 µm y esterilizar en autoclave.

Buffer Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

Pesar 3.94 g de tris clorhidratado, disolverlos en 45 mL de agua desionizada y ajustar el pH a 6.8.

Buffer Tris-HCl 1.5 M pH 8.8

Disolver 11.82 g de tris-HCl en 45 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 8.8.

Medio LB Miller

Disolver 25 g de medio LB Miller en 1000 mL de agua desionizada, esterilizar por autoclave.

Placas de agar y LB Miller con kanamicina 30 ug/mL

Disolver 5.75 g de medio LB Miller y 3.22 g de agar bacteriológico en un matraz con 230 mL de agua desionizada. Esterilizar en el autoclave, una ves finalizado esto, esperar a que se enfrié hasta una temperatura tolerable para posteriormente añadir 230 uL de kanamicina a 30 mg/mL, agitar bien y verter para 20 placas Petri pequeñas.

Sample Buffer 4X

Pesar 4 g de SDS, 3.08 g de DTT y 200 mg de azul de bromofenol, añadirlos a un tubo Falcon de 50 mL donde se proseguirá a agregar 16 mL de glicerol y 10 mL de tris-HCl 1M pH 6.5. Ajustar el volumen final a 50 mL, conservar el buffer en oscuridad.

SDS al 1 %

Disolver 2 g de SDS en 200 mL de agua desionizada.

SDS al 10 %

Disolver 20 g de SDS en 200 mL de agua desionizada.

Solución de APS 10 %

Disolver 100 mg de APS en 1 mL de agua desionizada en un tubo Eppendorf.

Solución de $CaCl_2$ 1 mM

Disolver 55 mg de $CaCl_2$ en 250 mL de agua desionizada.

Solución de $MgCl_2$ 25 mM

Disolver 1.27 g de $MgCl_2$ en 250 mL de agua desionizada.

Solución de $ZnCl_2$ 0.1 M

Disolver 3.4 g de $ZnCl_2$ en 250 mL de agua desionizada.

Stock de IPTG 200 mM

Pesar 71.4 mg de IPTG y disolver en 1.5 mL de agua desionizada.

Stocks de Kanamicina 30 mg/mL

Disolver 45 mg de kanamicina en 1.5 mL de agua desionizada.

ANEXO B

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla 2. ANOVA de dos factores de los ensayos de viabilidad celular

Línea Celular	**Efectos**	**df**	**SS**	**MSS**	**F**	**PR(>F)**
A549	*C(Concentración)*	4.0	5266.404087	1316.601022	17.996558	0.000002
	C(Tratamiento)	1.0	3068.170926	3068.170926	41.938686	0.000003
	C(Concentración): C(Tratamiento)	4.0	3200.232804	800.058201	10.935959	0.000073
	Residual	20.0	1463.169776	73.158489	N/A	N/A
MCF7	*C(Concentración)*	4.0	750.916714	N/A	0.911487	0.482376
	C(Tratamiento)	1.0	6.173830		0.029976	0.864859
	C(Concentración): C(Tratamiento)	4.0	316.434616		0.384098	0.816611
	Residual	15.0	3089.389637		N/A	N/A
Vero	*C(Concentración)*	4.0	223.043654	55.760913	2.206418	0.092140
	C(Tratamiento)	1.0	40.733781	40.733781	1.611806	0.213999
	C(Concentración): C(Tratamiento)	4.0	653.921221	163.480305	6.468795	0.000706
	Residual	30.0	758.164225	25.272141	N/A	N/A
Concen-tración Máxima	*C(Tratamiento)*	1.0	3471.519283	3471.519283	32.610304	0.000072
	C(Línea)	2.0	3611.327332	1805.663666	16.961807	0.000238
	C(Tratamiento): C(Línea)	2.0	2153.727656	1076.863828	10.115703	0.002242
	Residual	13.0	1383.910766	106.454674	N/A	N/A

Tabla 3. Prueba *post-hoc* Tukey HSD sobre las líneas celulares y condiciones.

Resultados mostrados estadísticamente significativos (p<0.05)

Línea celular	***Comparaciones (Concentración:Tratamiento)***	***p ajustado***
A549	125:Control-500:Tratamiento	1.04E-07
	62.5:Control-500:Tratamiento	2.83E-07
	250:Control-500:Tratamiento	3.45E-07
	62.5:Tratamiento-500:Tratamiento	1.89E-06
	125:Tratamiento-500:Tratamiento	1.90E-06
	31.25:Tratamiento-500:Tratamiento	2.75E-06
	31.25:Control-500:Tratamiento	2.77E-06
	500:Control-500:Tratamiento	2.85E-06
	0:Tratamiento-500:Tratamiento	8.38E-05
	250:Tratamiento-500:Tratamiento	1.95E-04
	125:Control-250:Tratamiento	2.39E-02
Vero	62.5:Control-500:Tratamiento	3.69E-02
	250:Tratamiento-500:Tratamiento	2.33E-02
	125:Control-500:Tratamiento	2.06E-02
	31.25:Tratamiento-500:Tratamiento	9.61E-03
	125:Tratamiento-500:Tratamiento	5.43E-03
	62.5:Tratamiento-500:Tratamiento	4.52E-03
	250:Control-500:Tratamiento	4.00E-03
	500:Control-500:Tratamiento	1.53E-03
Concentración máxima	Tratamiento:Vero-Tratamiento:A549	2.63E-04
	Tratamiento:MCF7-Tratamiento:A549	3.22E-04
	Control:A549-Tratamiento:A549	1.14E-04
	Control:MCF7-Tratamiento:A549	2.72E-04
	Control:Vero-Tratamiento:A549	1.16E-05

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Javier Hernández Juárez

Candidato para el grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

TESIS: PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA E4ORF4 UNIDA AL PÉPTIDO PENETRANTE CELULAR MAP COMO UN NUEVO AGENTE CONTRA EL CÁNCER.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos personales: Nacido en Guadalajara, Jalisco, un 05 de diciembre de 1997.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, grado Licenciatura como Químico Farmacéutico Biólogo.