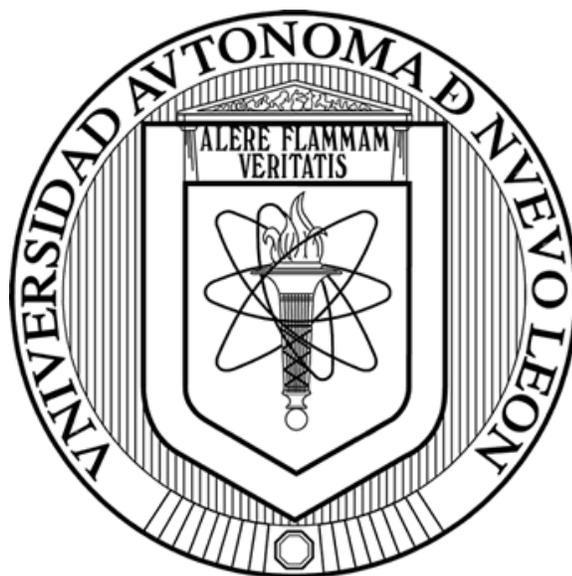


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



DISEÑO DE LOS PÉPTIDOS PENETRANTES-PROAPOPTÓTICOS NRPD-CTMP4-H Y NRPD-KLAK-H: EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE SU ACTIVIDAD CITOTÓXICA DIRIGIDA A CÁNCER EGFR-POSITIVO

Por

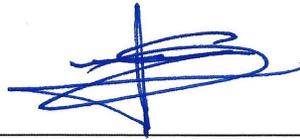
M.C. ALDO OMAR GONZÁLEZ CRUZ

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

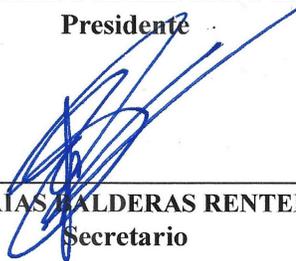
Noviembre, 2025

**“DISEÑO DE LOS PÉPTIDOS PENETRANTES-PROAPOPTÓTICOS NRPD-CTMP4-H
Y NRPD-KLAK-H: EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE SU ACTIVIDAD
CITOTÓXICA DIRIGIDA A CÁNCER EGFR-POSITIVO”**

Aprobación de la tesis:



DR. EDER UBALDO ARREDONDO ESPINOZA
Presidente



DR. ISAIAS CALDERAS RENTERÍA
Secretario



DRA. MÓNICA AZUCENA RAMÍREZ CABRERA
Vocal



DRA. SHEILA ADELA VILLA CEDILLO
Vocal



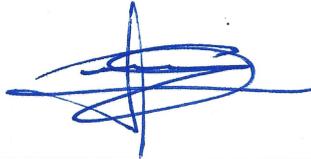
DRA. MARÍA DE JESÚS LOERA ARIAS
Vocal



DR. JAVIER RIVERA DE LA ROSA
Sub-Director de Posgrado

**“DISEÑO DE LOS PÉPTIDOS PENETRANTES-PROAPOPTÓTICOS NRPD-CTMP4-H
Y NRPD-KLAK-H: EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE SU ACTIVIDAD
CITOTÓXICA DIRIGIDA A CÁNCER EGFR-POSITIVO”**

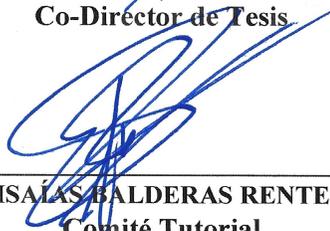
Revisión de la tesis:



DR. EDER UBALDO ARREDONDO ESPINOZA
Director de Tesis



DR. JOSÉ JUAN PÉREZ TRUJILLO
Co-Director de Tesis



DR. ISAÍAS BALDERAS RENTERÍA
Comité Tutorial



DRA. MÓNICA AZUCENA RAMÍREZ CABRERA
Comité Tutorial



DR. OMAR GONZÁLEZ SANTIAGO
Comité Tutorial



DR. JAVIER RIVERA DE LA ROSA
Sub-Director de Posgrado

RESUMEN

M.C. Aldo Omar González Cruz

Fecha de Graduación: Noviembre, 2025.

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

**Título del Estudio: DISEÑO DE LOS PÉPTIDOS PENETRANTES-
PROAPOPTÓTICOS NRPD-CTMP4-H Y NRPD-KLAK-H:
EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE SU ACTIVIDAD
CITOTÓXICA DIRIGIDA A CÁNCER EGFR-POSITIVO**

Número de páginas: 105

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

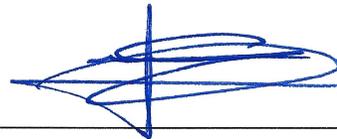
Área de Estudio: Biotecnología Farmacéutica

Propósito y Método de Estudio: El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, y aquellos tumores que sobreexpresan el receptor EGFR presentan una mayor resistencia a las terapias convencionales. Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto citotóxico y apoptótico de los péptidos penetrantes-proapoptóticos NRPD-CTMP4-H y NRPD-KLAK-H en modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer EGFR-positivo, con la finalidad de mejorar la eficacia y selectividad de las terapias dirigidas. Para ello, se diseñaron los péptidos a evaluar utilizando herramientas bioinformáticas y análisis de acoplamiento molecular. La evaluación *in vitro* incluyó la determinación de viabilidad celular mediante el ensayo de MTT, la detección de apoptosis por TUNEL y el análisis de internalización celular mediante inmunomarcaje. En el estudio *in vivo*, se utilizó un modelo murino de tumor subcutáneo para evaluar el efecto

antitumoral de los péptidos, seguido del análisis histológico de los tumores y órganos después del tratamiento.

Contribuciones y Conclusiones: El presente estudio evaluó la actividad biológica de péptidos proapoptóticos dirigidos a cáncer EGFR-positivo, destacando el impacto de la adición de una etiqueta de histidinas en su capacidad de internalización y citotoxicidad *in vitro*. Se demostró que los péptidos NRPD-KLAK-H y KLAK-H exhibieron los mayores efectos citotóxicos en las líneas celulares evaluadas, sin evidencia de selectividad por células EGFR-positivas. Estos hallazgos sugieren por primera vez que la etiqueta de histidinas puede mejorar la captación celular de péptidos proapoptóticos, posiblemente debido a su interacción con la membrana celular en condiciones de cultivo ligeramente ácidas. En contraste, NRPD-CTMP4-H no indujo efectos citotóxicos, lo que se atribuye a su deficiente internalización, resultado respaldado por estudios de inmunomarcaje. Adicionalmente, los ensayos *in vivo* con KLAK-H y NRPD-KLAK-H no mostraron una reducción significativa del volumen tumoral, aunque se evidencia su actividad proapoptótica en el análisis histopatológico, lo que sugiere la necesidad de estrategias combinadas para potenciar su efecto terapéutico. Este trabajo aporta evidencia de que la adición de histidinas no solo facilita la detección de péptidos por inmunofluorescencia, sino que también puede influir en su bioactividad. Además, cuestiona la selectividad previamente reportada del péptido NRPDSAQFWLHH hacia EGFR, abriendo nuevas líneas de investigación sobre los mecanismos de internalización de estos péptidos en células tumorales.

Firma del asesor: _____



Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza

DEDICATORIA

A mi amada esposa

A mi amada hija

AGRADECIMIENTOS

A la **Facultad de Ciencias Químicas (UANL)** y al **Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos** por permitirme realizar mis estudios de posgrado y brindarme el espacio y los recursos para trabajar en mi proyecto de tesis.

A la **Facultad de Medicina (UANL)** y al **Departamento de Histología** por acordar el trabajo en colaboración con nosotros, por facilitarme el trabajo en sus instalaciones y complementar mi formación profesional a través del aprendizaje en sus áreas de estudio. Así mismo, gracias a todos los alumnos y profesores que integran este departamento.

A la **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación** por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de posgrado.

Al **Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza** por aceptarme como su alumno y compartir conmigo sus consejos, conocimientos y experiencias, así como todo el apoyo que me ha brindado no solo como estudiante de doctorado sino también como docente. Su guía me ha permitido crecer personal y profesionalmente, muchas gracias Doc.

Al **Dr. José Juan Pérez Trujillo** por la capacitación brindada en diversas técnicas, por instruirme en la manipulación de modelos murinos y el análisis histológico, así como por todos los consejos que me ha dado para la realización de mi proyecto de tesis. Muchas gracias por todo su apoyo y por compartir su experiencia conmigo.

A mi comité tutorial: Dr. Isaías Balderas Rentería, Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera y Dr. Omar González Santiago por todas las correcciones, comentarios y consejos que me han otorgado, pues todo ello me ha permitido mejorar en la realización de mi proyecto de tesis y en mi formación en el área de la investigación.

A mi comité externo: Dra. Sheila Adela Villa Cedillo y Dra. María de Jesús Loera Arias por enriquecer mis conocimientos y el rigor de mi proyecto de tesis con sus comentarios y consejos de mejora.

A mis compañeros del Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos: **Javier Hernández, Bryan Espinosa, José Luis González, Daniela Treviño, Angela Romero, Aissa Nieto, Leonardo Núñez, Elena Castellón, Moisés Ibarra, Nelly Cardona, Elizabeth Ochoa, Andre Garza, Marbella Galán, Jesús Hernández, Emiliano Vázquez, Andrea Chávez, Oscar Quiroz, Paola Pérez, Teresa Silva, Fernanda Cantú, Carlos Mireles, Albino Rodríguez y Sofia Cruz.** Gracias por todo el apoyo, el compañerismo y la convivencia que compartimos. Además, quiero dar gracias y compartir este logro con todos aquellos que me apoyaron de algún modo con el trabajo experimental de este proyecto, desde el mantenimiento de células hasta la realización de ensayos y réplicas necesarias para complementar mis datos. Gracias.

A mis alumnos de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo por inspirarme a seguir mejorando como profesor y recordarme el por qué amo la docencia.

A mis amigos por apoyarme en este largo camino, por compartir sus conocimientos, experiencias y momentos que llevo siempre conmigo. Estoy infinitamente agradecido por contar con ustedes.

A **toda mi familia**: Especialmente a **mi mamá** y **mi papá** por darme la vida, por educarme, por creer en mí y por alentarme siempre a seguir mis sueños. Gran parte de lo que soy se lo debo a ustedes. Gracias por su amor incondicional y por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de este camino.

Finalmente, gracias a **mi esposa Valeria** y a **mi hija Ellie** por apoyarme día con día, por caminar a mi lado en cada etapa de este viaje y ser mi mayor motivación. Son la razón de mi felicidad, el pilar que sostiene mis días y lo que más amo en esta vida. Ustedes son la estrella que guía mi camino y la luz que ilumina y da calidez a mi existencia. Dicho en términos científicos, son el codón de inicio de cada uno de mis días, el codón de terminación que me recuerda cada noche lo bella que es la vida y la poliadenilación que protege y da estabilidad a todo lo que soy. Y aunque en biología molecular todo se transcribe en sentido 5' a 3', he descubierto que el verdadero sentido de mi vida es ustedes.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
TABLA DE CONTENIDO	x
LISTA DE TABLAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
NOMENCLATURA	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El cáncer	1
1.1.1.Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)	6
1.1.2.Cáncer EGFR-positivo	8
1.1.3.Tratamientos actuales contra el cáncer EGFR-positivo	10
1.2. La vía PI3K como blanco terapéutico contra el cáncer	12
1.3. La mitocondria como blanco terapéutico contra el cáncer	15
1.4. Péptidos proapoptóticos como nuevas alternativas terapéuticas contra el cáncer	16
1.5. Sistemas de liberación de fármacos basados en péptidos (PBDs)	18
1.5.1.Péptidos de penetración celular (CPPs)	19
1.5.2.Péptidos de localización tumoral (THPs)	22
1.5.3.Péptidos de localización y penetración tumoral (TH-CPPs)	23
1.6. Antecedentes	24
1.6.1.Estudios del potencial anticancerígeno de péptidos proapoptóticos	24

1.6.2. Estudios de TH-CPPs y su aplicación contra el cáncer.....	27
1.7. Justificación	29
1.8. Hipótesis	29
1.9. Objetivos	30
1.9.1. Objetivo General	30
1.9.2. Objetivos Específicos	30
2. MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1. Obtención de péptidos	32
2.1.1. Diseño y análisis de secuencias peptídicas.....	32
2.2. Evaluación biológica <i>in vitro</i>	32
2.2.1. Determinación de viabilidad celular relativa por la técnica de MTT	32
2.2.2. Evaluación de la actividad proapoptótica por el método de TUNEL.....	33
2.2.3. Identificación de la internalización celular por el método de inmunomarcaje.....	35
2.3. Evaluación biológica <i>in vivo</i>	36
2.3.1. Evaluación del efecto antitumoral de los péptidos KLAK-H y NRPD- KLAK-H en el modelo <i>in vivo</i>	36
2.3.2. Evaluación histológica del efecto de los péptidos KLAK-H y NRPD- KLAK-H en el modelo <i>in vivo</i>	38
2.4. Evaluación biológica <i>ex vivo</i>	39
2.4.1. Evaluación del efecto de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H en el modelo <i>ex vivo</i>	39
2.5. Análisis estadístico	39
2.6. Disposición de residuos generados.....	40
3. RESULTADOS.....	41
3.1. Obtención de péptidos	41
3.1.1. Diseño y análisis de secuencias peptídicas.....	41
3.2. Evaluación biológica <i>in vitro</i>	44
3.2.1. Determinación de viabilidad celular relativa por la técnica de MTT	44
3.2.2. Evaluación de la actividad proapoptótica por el método de TUNEL.....	54
3.2.3. Identificación de la internalización celular por el método de inmunomarcaje.....	59

3.3. Evaluación biológica <i>in vivo</i>	65
3.3.1. Evaluación del efecto antitumoral de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H en el modelo <i>in vivo</i>	65
3.3.2. Evaluación histológica del efecto de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H en el modelo <i>in vivo</i>	66
3.4. Evaluación biológica <i>ex vivo</i>	73
3.4.1. Evaluación del efecto de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H en el modelo <i>ex vivo</i>	73
4. DISCUSIÓN	75
5. CONCLUSIONES	80
6. PERSPECTIVAS	81
REFERENCIAS	82
APÉNDICE A	101
APÉNDICE B	104

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Ejemplos de cáncer EGFR-positivo.....	8
2. Tratamientos contra el cáncer actuales dirigidos a EGFR.....	12
3. Ejemplos de péptidos proapoptóticos.....	17
4. Ejemplos de CPPs y su clasificación fisicoquímica.....	20
5. Ejemplos de THPs y sus respectivas dianas.....	23
6. Ejemplos de TH-CPPs y sus respectivas dianas.....	24
7. Grupos de estudio y tratamientos.....	37
8. Péptidos obtenidos y sus secuencias aminoacídicas.....	42
9. IC ₅₀ de los tratamientos con KLAK-H, NRPD-KLAK-H y erlotinib.....	53
10. Resumen de los resultados de internalización celular.....	64
11. Volumen tumoral del inicio al fin del ensayo (mm ³).....	66
12. Relación de ADN-TurboFect empleada.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Factores implicados en la carcinogénesis.....	2
2. Principales vías de señalización activadas por EGFR.....	7
3. Sobreexpresión de EGFR en células de cáncer.....	9
4. Potenciales mecanismos de sobreactivación de EGFR en cáncer.....	10
5. Esquema general de la vía de señalización PI3K.....	14
6. Principales mecanismos de internalización celular de los CPPs.....	21
7. Fórmula para calcular volumen tumoral.....	37
8. Modelo de acoplamiento molecular NRPD – EGFR.....	43
9. Modelos predictivos de acoplamiento molecular péptido – EGFR.....	44
10. Gráfico del efecto citotóxico del péptido NRPD-H.....	45
11. Gráfico del efecto citotóxico del péptido KLAK-H.....	46
12. Gráfico del efecto citotóxico del péptido KLAK.....	47
13. Gráfico del efecto citotóxico del péptido CTMP4-H.....	48
14. Gráfico del efecto citotóxico del péptido NRPD-KLAK-H.....	49
15. Gráfico del efecto citotóxico del péptido NRPD-KLAK.....	50
16. Gráfico del efecto citotóxico del péptido NRPD-CTMP4-H.....	51
17. Gráfico del efecto citotóxico del fármaco erlotinib.....	52
18. IC ₅₀ de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H.....	53
19. Efecto proapoptótico de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H en la	

línea celular Vero.....	55
20. Efecto proapoptótico de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H en la	
línea celular MCF-7.....	56
21. Efecto proapoptótico de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H en la	
línea celular A-549.....	57
22. Efecto proapoptótico de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H en la	
línea celular CT26.....	58
23. Internalización celular del péptido NRPD-H.....	60
24. Internalización celular del péptido KLAK-H.....	61
25. Internalización celular del péptido CTMP4-H.....	62
26. Internalización celular del péptido NRPD-KLAK-H.....	63
27. Internalización celular del péptido NRPD-CTMP4-H.....	64
28. Gráfico del volumen tumoral resultado de los tratamientos <i>in vivo</i>.....	65
29. Micrografías representativas del análisis histopatológico de los tumores	
CT26 del modelo <i>in vivo</i>	67
30. Micrografías representativas de tejido cardíaco del modelo <i>in vivo</i>.....	68
31. Micrografías representativas de tejido hepático del modelo <i>in vivo</i>.....	69
32. Micrografías representativas del tejido pulmonar del modelo <i>in vivo</i>.....	71
33. Micrografías representativas de la corteza renal del modelo <i>in vivo</i>.....	72
34. Micrografías representativas del análisis histopatológico de los tumores	
CT26 del modelo <i>ex vivo</i>	74
35. Gráfico del efecto citotóxico de la expresión de KLAK y CTMP4.....	104

NOMENCLATURA

°C	Grados celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrómetro
ACP	Péptido anticancerígeno
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CO₂	Dióxido de carbono
CPP	Péptido de penetración celular
CTMP	Proteína moduladora de C-terminal
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EdUTP	Etinil desoxiuridina trifosfato
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ErbB	Oncogén eritroblástico B
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
h	Horas
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HSP	Proteína de choque térmico
IAP	Inhibidor de proteínas de la apoptosis
IC₅₀	Concentración inhibitoria media máxima
IL13Rα2	Receptor alfa-2 de interleucina 13
kg	Kilogramo
M	Molaridad
mAb	Anticuerpo monoclonal
MAPK	Proteína quinasa activada a mitógeno
MDR	Multi-fármaco resistencia
mg	Miligramo

min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MTT	Bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
nm	Nanómetros
PBDs	Sistemas de liberación de fármacos basados en péptidos
PBS	Buffer de fosfato salino
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato
PKC	Proteína quinasa C
PTEN	Proteína homólogo de fosfatasa y tensina
rpm	Revoluciones por minuto
RTK	Receptor tirosina quinasa
s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino

SHP1	Proteína tirosina fosfatasa 1
TdT	Desoxinucleotidil transferasa terminal
TGFα	Factor de crecimiento transformante α
THP	Péptido de localización tumoral
TH-CPP	Péptido de localización y penetración tumoral
TKI	Inhibidor tirosina quinasa
V	Voltios
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR-3	Receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular
VLNP	Nanopartícula similar al virus de hepatitis B

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. El cáncer

En términos generales, el cáncer se define como un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento celular descontrolado, lo que da lugar a la formación de masas celulares conocidas como neoplasias o tumores. Estos crecimientos pueden invadir y dañar los tejidos sanos cercanos. Además, las células cancerosas tienen la capacidad de desplazarse a otras partes del cuerpo y establecerse en tejidos distantes, un fenómeno conocido como metástasis, que es la principal causa de mortalidad asociada a esta enfermedad.¹ Actualmente, el cáncer es uno de los problemas de salud más relevantes a nivel global, con un estimado de 9.7 millones de muertes en 2022. Entre los tipos de cáncer con mayor tasa de mortalidad se encuentran el de pulmón, hígado, estómago, mama y colorrectal.²

El proceso por el cual se origina una célula cancerosa se conoce como carcinogénesis y puede ser desencadenado por diversos factores. Entre ellos, se incluyen causas internas

como errores genéticos durante la replicación del ADN, procesos de reparación del material genético o mitosis. También existen factores externos que pueden inducir este proceso, tales como la exposición a agentes mutagénicos de origen físico, químico o biológico.³ Para que la carcinogénesis se inicie, las alteraciones genéticas deben afectar genes clave en la regulación del crecimiento celular, lo que puede conducir tanto a la pérdida como a la ganancia de función. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se presentan mutaciones en protooncogenes, genes involucrados en la reparación del ADN o en genes supresores de tumores.⁴ La representación de este proceso se muestra en la figura 1.

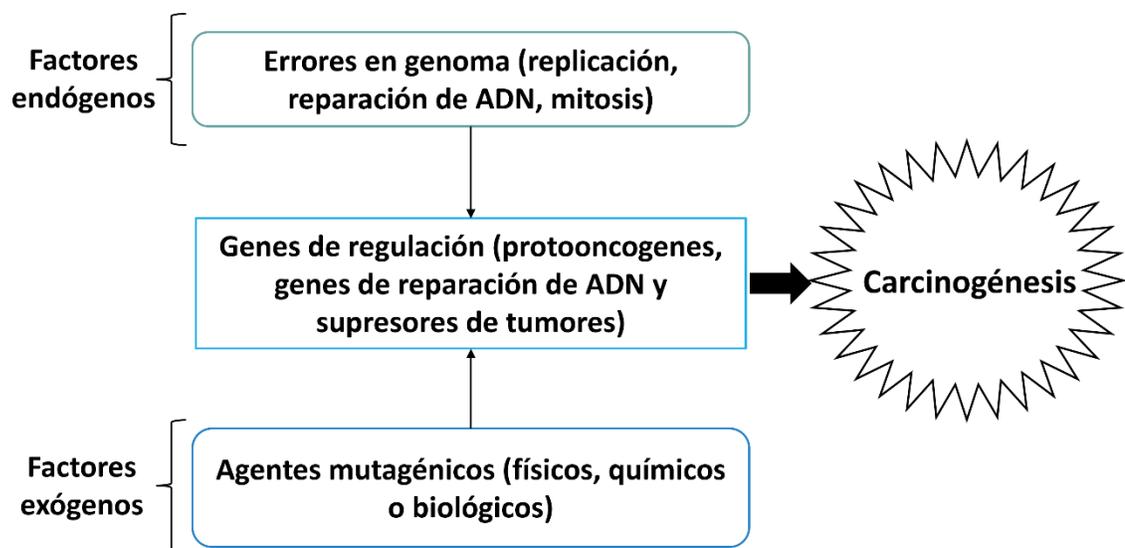


Figura 1. Factores implicados en la carcinogénesis.

Las células tumorales poseen una serie de características distintivas que han sido ampliamente estudiadas para mejorar la comprensión de la enfermedad y facilitar la

identificación de posibles blancos terapéuticos.^{1,3} A continuación, se describen algunas de estas particularidades.

- **Proliferación celular acelerada e independiente de señales externas.** En condiciones normales, las células requieren estímulos específicos, como los factores de crecimiento, para iniciar su división. Estos factores interactúan con receptores en la membrana celular, activando rutas de señalización que regulan el ciclo celular.⁵ Sin embargo, en las células tumorales, pueden ocurrir mutaciones en los protooncogenes, que son genes clave en la regulación de la proliferación celular. Estas mutaciones generan oncogenes, los cuales permiten a la célula mantenerse en un estado de crecimiento y división incontrolado. Esto puede lograrse mediante la producción de moléculas similares a los factores de crecimiento, la sobreexpresión de receptores de membrana, entre otros mecanismos.³
- **Resistencia a mecanismos inhibidores del crecimiento.** La división celular es un proceso altamente regulado, esta presenta vías de regulación negativa donde intervienen los genes supresores de tumores, restringiendo la proliferación y desarrollo del cáncer. Cuando se producen mutaciones que resultan en la inactivación de estos genes reguladores, la división celular ocurre sin restricciones ni control.⁶
- **Metástasis.** Esta característica es la principal causa de mortalidad relacionada con los tumores sólidos, ya que implica la propagación y colonización de estas células malignas en diferentes tejidos del cuerpo.⁷ La metástasis es un proceso que implica una secuencia de etapas, que comienza con la invasión local, seguida de la intravasación (en vasos sanguíneos o linfáticos), la colonización en otros tejidos y culmina en la formación de nuevos grupos de células cancerosas.¹

- **Inhibición de apoptosis.** Un proceso habitual para preservar la homeostasis tisular, llamado apoptosis o muerte celular programada, se pone en marcha en respuesta a varios estímulos y resulta en la descomposición de las células. Sin embargo, debido a la acumulación de numerosas mutaciones en una célula cancerosa, esta capacidad se ve comprometida o se pierde por completo.³
- **Potencial de replicación ilimitado.** En los extremos de los cromosomas se hallan secuencias repetidas en tándem denominadas telómeros. Estas secuencias experimentan una constante reducción en longitud con cada ciclo de división celular. Cuando estas secuencias alcanzan un punto crítico, la célula cesa de proliferar y entra en un estado de senescencia y finalmente apoptosis.¹ Sin embargo, la mayoría de las células tumorales expresan la enzima telomerasa, lo que les permite prolongar indefinidamente la longitud de sus telómeros y superar el límite de división celular.³
- **Inducción de angiogénesis.** Para que un tumor pueda seguir creciendo sin interrupciones, necesita suministro de nutrientes y oxígeno, al igual que los demás tejidos. Una característica distintiva del cáncer es su capacidad para estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes en otros tejidos, promoviendo así su propio crecimiento y la eventual propagación a otros tejidos.⁸
- **Reprogramación metabólica.** En condiciones normales y en presencia de oxígeno, las células procesan la glucosa mediante un mecanismo en dos etapas: primero, la glucólisis en el citosol convierte la glucosa en piruvato, y luego, en las mitocondrias, se descompone en dióxido de carbono a través del metabolismo oxidativo. En ausencia de oxígeno, se favorece la glucólisis, y solo una pequeña fracción del piruvato llega a las mitocondrias, donde se consume el oxígeno disponible. No

obstante, las células cancerosas pueden modificar este proceso metabólico incluso cuando hay oxígeno presente, dependiendo principalmente de la glucólisis para la producción de energía en lugar de utilizar la respiración mitocondrial convencional. Este fenómeno es conocido como "glucólisis aeróbica" o "efecto Warburg".³

- **Resistencia a respuesta inmune.** Por lo general, el sistema inmunológico, tanto el innato como el adaptativo, tiene la capacidad de eliminar de forma natural el desarrollo de células cancerosas. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se observa cierto nivel de tolerancia inmunológica hacia estas células. Además, debido a su inestabilidad genómica, las células cancerosas experimentan cambios constantes en sus características antigénicas y pueden liberar inmunomoduladores que afectan la respuesta inmune, lo que les permite resistir la acción del sistema inmunológico.¹
- **Promoción de la inflamación.** En ciertos tipos de tumores, se observa una alta presencia de infiltrados celulares pertenecientes tanto al sistema inmune innato como al adaptativo, lo que indica la presencia de procesos inflamatorios similares a los que se encuentran en tejidos normales no afectados por el cáncer. Hoy se sabe que todas las lesiones tumorales contienen células del sistema inmune participan generando un microambiente proinflamatorio en los focos tumorales.³
- **Inestabilidad genómica y mutación.** Todas las circunstancias mencionadas dependen en gran medida de los cambios genéticos que experimentan las células cancerosas. Algunos genotipos mutados específicos proporcionan una ventaja que permite a estas células crecer y finalmente dominar el tejido. Por lo tanto, el avance del tumor se puede entender como una serie de expansiones clonales, cada una de las cuales comienza cuando la célula adquiere fortuitamente un genotipo mutante que le

otorga una ventaja en su crecimiento.³ Además, otras alteraciones, como la desactivación de genes supresores de tumores, también pueden ocurrir debido a cambios epigenéticos, como la metilación del ADN y la modificación de histonas.⁹

1.1.1. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

Los receptores tirosina quinasa son proteínas transmembranales que desempeñan un rol clave en procesos celulares de crecimiento, diferenciación y supervivencia celular.¹⁰ El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR por sus siglas en inglés) es un receptor monomérico de la superficie celular que forman parte de la familia ErbB de receptores tirosina quinasa, los cuales tienen una estructura común que comprende un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa para la transducción de señales. La unión de un ligando como el factor de crecimiento epidérmico (EGF por sus siglas en inglés) o el factor de crecimiento transformante α (TGF α por sus siglas en inglés) hace que EGFR se dimerice o se heterodimerice con otro miembro de la familia ErbB. Esto conduce a la activación de la tirosina quinasa ligada al receptor y da como resultado una cascada de señalización que produce diversos efectos que incluyen migración celular, maduración, diferenciación, angiogénesis e inhibición de la apoptosis.^{10,11} En condiciones normales, EGFR regula el desarrollo y la homeostasis del tejido epitelial.^{12,13}

La familia del EGFR juega un papel crucial en el crecimiento de tumores malignos. En estos casos, EGFR es considerado un inductor de la tumorigénesis. Su señalización se encuentra alterada con frecuencia en varios cánceres humanos debido a la amplificación

genética y/o sobreexpresión proteica de EGFR, mutaciones o deleciones en el marco de lectura, lo que contribuye a una mayor señalización y desarrollo tumoral. Además, EGFR es reconocido como un biomarcador de resistencia en tumores, ya que se ha descubierto que su amplificación o mutaciones secundarias surgen bajo la presión de los fármacos. Este receptor transduce múltiples vías de señalización, incluidas la vía de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK por sus siglas en inglés) y la vía de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K por sus siglas en inglés), induciendo procesos de proliferación celular, supervivencia e inhibición de apoptosis (figura 2).¹³⁻¹⁵ La desregulación de estas vías contribuye al desarrollo de tumores y resistencia a las terapias contra el cáncer.¹⁶ Por lo tanto, la sobreexpresión de la proteína EGFR se asocia con un pronóstico desfavorable y actualmente es una importante diana terapéutica.^{17,18}

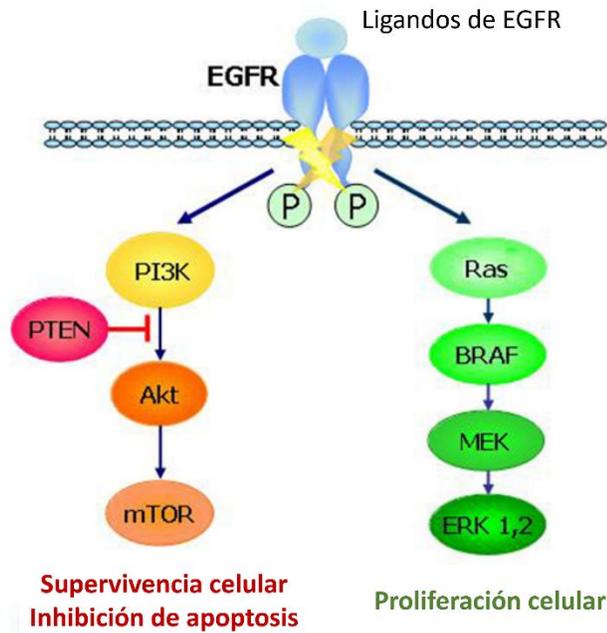


Figura 2. Principales vías de señalización activadas por EGFR. Traducida de Saletti et al., 2015.¹⁵

1.1.2. Cáncer EGFR-positivo

EGFR se llega a encontrar sobreexpresado en una variedad de tumores sólidos que incluyen cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico, pancreático, de mama, de cabeza y cuello, de próstata, entre otros; la tabla 1 muestra algunos datos de la proporción de sobreexpresión para estos tipos de cáncer.¹⁷ En algunos tumores, la sobreexpresión de EGFR se ha asociado con un estadio tumoral avanzado (figura 3), mal pronóstico y resistencia a la quimioterapia, la terapia hormonal y la radioterapia.^{18,19}

TABLA 1

Ejemplos de cáncer EGFR-positivo

Tipo de cáncer	Incidencia de la sobreexpresión de EGFR	Referencia
NSCLC	40% – 89%	20,21
Pancreático	30% – 95%	22–24
Gástrico	27% – 64%	25,26
TNBC	Al menos 50%	27
Próstata	14% – 18.7%	28,29
Glioblastoma	46.7% – 57.4%	30–32

NSCLC: Cáncer de pulmón de células no pequeñas. TNBC: Cáncer de mama triple negativo.

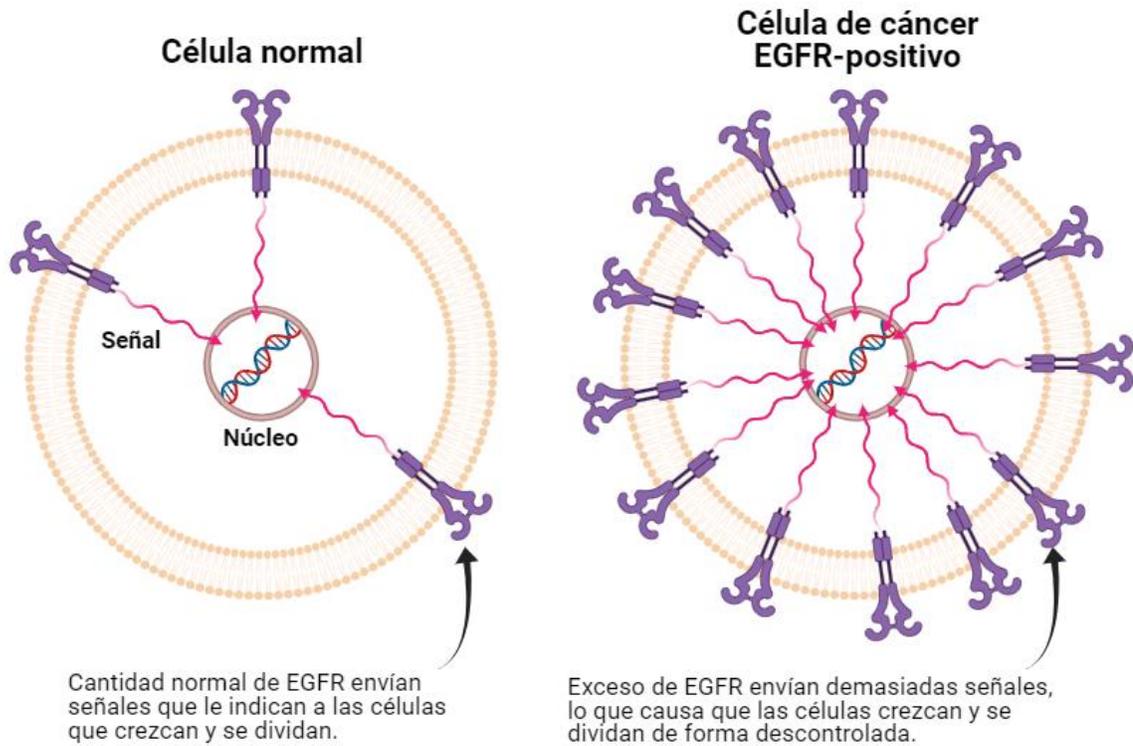


Figura 3. Sobreexpresión de EGFR en células de cáncer.

Comúnmente se piensa que la alta expresión de EGFR es el principal mecanismo por el cual la señalización de EGFR aumenta en las células cancerosas. Sin embargo, es probable que sean importantes varios mecanismos alternativos, representados en la figura 4, incluido el aumento de la coexpresión de ligandos del receptor, como TGF α y la anfirregulina, la heterodimerización con HER2 y/o los otros miembros de la familia de receptores ErbB, así como la interacción con sistemas receptores heterólogos, la disminución de los niveles de fosfatasa, y la activación de mutaciones de EGFR.¹⁹

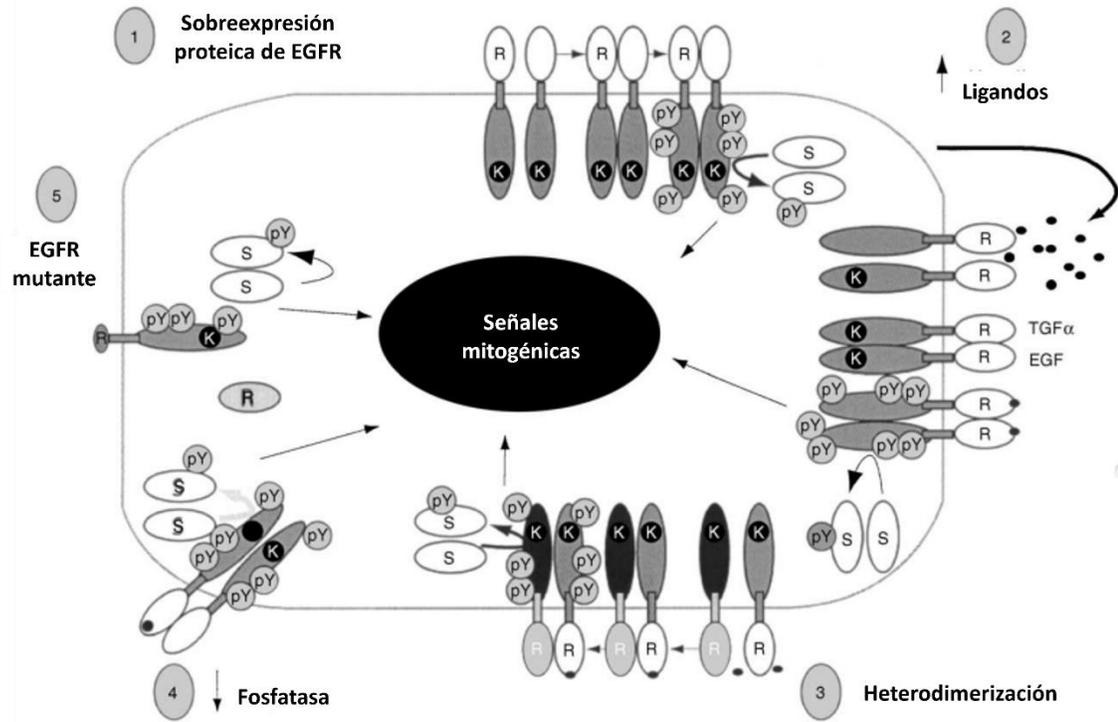


Figura 4. Potenciales mecanismos de la sobreactivación de EGFR en cáncer. TGF α , factor de crecimiento transformante α ; K, quinasa; R, receptor; S, sustrato. Traducida de Ciardiello & Tortora, 2006.¹⁹

1.1.3. Tratamientos actuales contra el cáncer EGFR-positivo

Actualmente, existen dos estrategias terapéuticas dirigidas a la inhibición de EGFR, incluidos los anticuerpos monoclonales (mAbs por sus siglas en inglés) y los inhibidores de la tirosina quinasa (TKI por sus siglas en inglés) de bajo peso molecular.¹⁷ Los mAbs se dirigen al dominio extracelular de EGFR e impiden la interacción del ligando endógeno con EGFR. En consecuencia, se inhibe la activación de la tirosina quinasa y se interrumpe la cascada de señalización de EGFR. Además, una reacción antígeno-anticuerpo puede potenciar la citotoxicidad y la actividad antitumoral de los mAb. Los mAbs anti-EGFR

disponibles comercialmente, como cetuximab y panitumumab, se utilizan ampliamente como agentes anticancerígenos dirigidos a los cánceres de colon y de cabeza/cuello. Por el contrario, los TKI desplazan el ATP en el dominio quinasa e inhiben la fosforilación de EGFR y la cascada posterior. Además, los TKI reaccionan con las quinasas EGFR (HER-2 y HER-4) y ejercen efectos benéficos sobre los mAbs en el tratamiento de cánceres humanos asociados con EGFR mutante.^{13,19} Algunos ejemplos de mAbs y TKIs se muestran en la tabla 2.

A pesar de la amplia variedad de fármacos dirigidos a EGFR, se ha reportado resistencia a estos en muchos pacientes, principalmente en los casos de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC por sus siglas en inglés), lo cual lleva a una falta de respuesta terapéutica y un pronóstico desfavorable.³³ La base más común de esta fármaco-resistencia es la acumulación de mutaciones encontradas dentro del dominio de tirosina quinasa de EGFR. Comúnmente afecta a pacientes jóvenes, mujeres y no fumadores. Los pacientes pueden desarrollar una resistencia primaria, lo que incluye mutaciones como la inserción 20 de EGFR. Así mismo, pueden presentar una resistencia adquirida que comprende el desarrollo de mutaciones de resistencia, la activación de la señalización de derivación o la transformación histológica en NSCLC.³⁴

TABLA 2**Tratamientos contra el cáncer actuales dirigidos a EGFR¹³**

mAb	Tipo de cáncer
Cetuximab	Colon, cabeza/cuello, NSCLC, pancreático
Panitumumab	Colon, renal
Matuzumab	Cabeza/cuello, ovario, cérvix, colon
Nimotuzumab	Cabeza/cuello
TKI	Tipo de cáncer
Gefitinib	NSCLC
Erlotinib	NSCLC, páncreas
Lapatinib	Mama
Dacomitinib	NSCLC, cabeza/cuello, gástrico
Afatinib	NSCLC
Neratinib	Mama
Canertinib	NSCLC, mama
Pelitinib	Colon, NSCLC

1.2. La vía PI3K como blanco terapéutico contra el cáncer

La vía de señalización PI3K-AKT-mTOR es esencial en la regulación de procesos como el crecimiento, motilidad y supervivencia celular, así como el metabolismo y la angiogénesis.¹² Su activación desregulada está relacionada con la aparición de tumores y la resistencia a los tratamientos contra el cáncer.³⁵

PI3K es una familia de lípido-quinisas asociadas a la membrana celular, compuesta por dos subunidades reguladoras (p85 y p55) y una subunidad catalítica (p110).³⁶ Dependiendo de sus diferencias estructurales y sus sustratos específicos, PI3K se clasifica en tres grupos: clases I, II y III.³⁷ Dentro de la clase I, se distinguen dos subtipos: IA e IB. En particular, la clase IA, que tiene una mayor implicación en el desarrollo del cáncer

humano,³⁸ incluye las subunidades catalíticas p110 α , p110 β y p110 δ , las cuales son codificadas por los genes *PIK3CA*, *PIK3CB* y *PIK3CD*, respectivamente.³⁹ La subunidad reguladora p85 cumple un papel fundamental en la activación de p110, ya que funciona como un punto de integración de señales provenientes de diversas proteínas transmembrana e intracelulares, como los receptores de tirosina quinasa, la proteína quinasa C (PKC por sus siglas en inglés), la proteína tirosina fosfatasa 1 (SHP1), así como moléculas de señalización como Rac, Rho, receptores hormonales, Src y Ras mutado.³⁶

En condiciones fisiológicas, la estabilidad de la subunidad catalítica p110 depende de su asociación con la subunidad reguladora p85. La activación de PI3K ocurre en respuesta a distintos estímulos extracelulares, como factores de crecimiento, citocinas y hormonas.⁴⁰ Una vez activada, esta enzima cataliza la conversión de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) en fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) mediante fosforilación. PIP3 actúa como un segundo mensajero, facilitando la unión y el reclutamiento de proteínas con dominios de interacción con lípidos, como C1 y C2, hacia la membrana celular. Entre las proteínas de señalización que se asocian a los productos lipídicos de PI3K se encuentran las quinasas AKT y PDK1, que al posicionarse en la membrana activan vías relacionadas con el crecimiento y la supervivencia celular, además de contribuir a la inhibición de la apoptosis.³⁹ Sin embargo, existen diferentes proteínas con la capacidad de regular negativamente a la vía de PI3K, esto a través de la inhibición de AKT. Algunos ejemplos de estos son las proteínas PHLPP, PTEN y CTMP, las cuales a menudo se encuentran ausentes o defectuosas en el cáncer.⁴¹⁻⁴³ En la figura 3 se muestra el esquema general de la vía de señalización PI3K-AKT-mTOR.

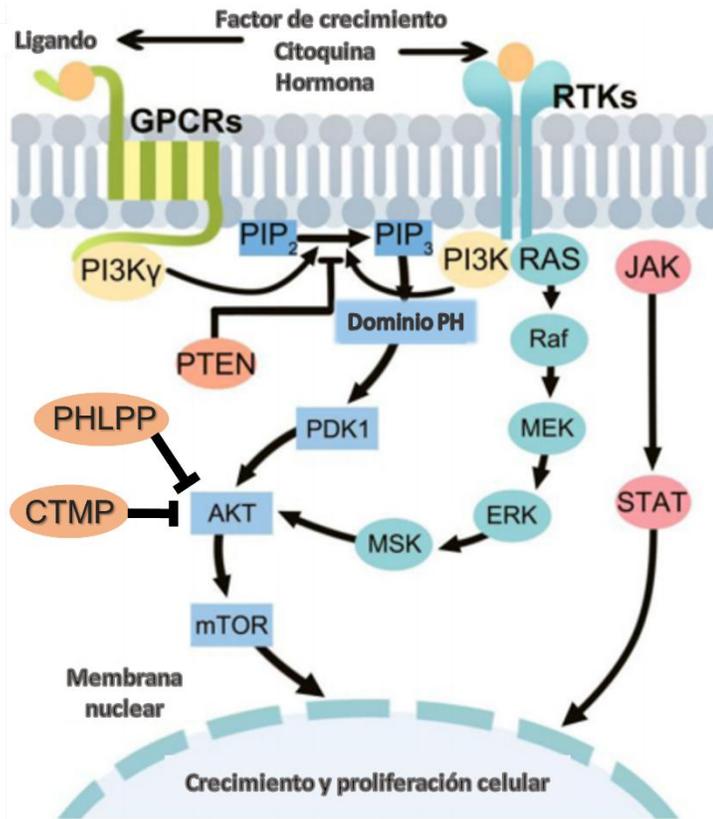


Figura 5. Esquema general de la vía de señalización PI3K. Modificada de Yang et al., 2019.³⁹

En el cáncer, la vía de señalización de PI3K sufre una desregulación debido a distintos mecanismos, entre los que se incluyen la inactivación o pérdida de genes supresores de tumores, mutaciones o amplificación en los genes que codifican PI3K, así como la activación de receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa, como ocurre en la sobreexpresión de EGFR, o la activación de oncogenes que actúan río arriba de PI3K.⁴⁴

Se ha identificado que esta vía está alterada en la mayoría de los tipos de cáncer humano, incluidos el cáncer de pulmón, mama, colorrectal y diversas neoplasias

hematológicas, lo que resalta su importancia como un posible blanco terapéutico en el tratamiento oncológico.⁴⁵ La inhibición de la señalización de PI3K puede contribuir tanto a la reducción de la proliferación celular como al incremento de la muerte celular.⁴⁰

1.3. La mitocondria como blanco terapéutico contra el cáncer

La mitocondria de la célula cancerosa se ha convertido en un blanco farmacológico importante debido a su papel clave en la proliferación y muerte celular. En los tejidos tumorales, las mitocondrias pueden cambiar los fenotipos metabólicos para enfrentar los desafíos de la alta demanda de energía y la síntesis macromolecular. Además, las mitocondrias pueden interactuar con el microambiente del tumor, y las señales de los fibroblastos asociados al cáncer pueden incidir en las mitocondrias. Las células cancerosas también pueden adquirir un fenotipo híbrido en el que pueden utilizar tanto la glucólisis como la fosforilación oxidativa. Este fenotipo híbrido puede facilitar la plasticidad metabólica de las células cancerosas, más específicamente en metástasis y resistencia a la terapia. A la luz de la heterogeneidad metabólica y la plasticidad de las células cancerosas que hasta hace poco no se habían apreciado, las estrategias dirigidas a la dependencia metabólica del cáncer parecen prometedoras para desarrollar terapias novedosas y eficaces contra el cáncer.^{46,47}

Actualmente, hay un surgimiento de nuevos agentes anticancerígenos dirigidos a las mitocondrias y actualmente están bajo investigación para diferentes tipos de cánceres.⁴⁸ Estos se dirigen a las funciones metabólicas de las mitocondrias, modulan su dinámica y morfogénesis (por ejemplo, dinámica de fisión/fusión), la mitogénesis y la evasión de la

apoptosis. Se sabe que las mitocondrias tienen un papel importante en la preparación del tumor y la eficacia de la quimioterapia y existen varias vías apoptóticas: la vía del receptor de muerte extrínseca, la vía de la perforina/granzima y la vía intrínseca dependiente de la caspasa mitocondrial.^{46,49}

1.4. Péptidos proapoptóticos como nuevas alternativas terapéuticas contra el cáncer

Las quimioterapias convencionales basadas en moléculas pequeñas han resultado ser útiles para prolongar la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, en general, estos fármacos se caracterizan por la alta toxicidad y falta de especificidad. Además, el desarrollo de resistencia a los medicamentos por parte de las células cancerosas impide incluso la continuación del tratamiento. En este sentido, se ha prestado gran atención a fármacos macromoleculares, como los péptidos anticancerígenos (ACPs por sus siglas en inglés). Los ACPs pueden inducir la muerte celular por diversos mecanismos, tales como: disrupción de membranas, formación transitoria de poros, necrosis, apoptosis, efectos angiogénicos, disrupción de vías de señalización, regulación del ciclo celular o vías de reparación de ADN.⁵⁰ Dentro de los ACPs destacan los péptidos proapoptóticos, los cuales inducen o restauran la maquinaria apoptótica por interacción con los reguladores claves de la apoptosis, lo que los hace capaces de destruir eficazmente a las células tumorales.⁵¹

Los defectos en el proceso de apoptosis se han implicado en diversas enfermedades. Especialmente en el caso del cáncer, cuya resistencia a la apoptosis es una parte esencial de la transformación maligna. Por lo tanto, inducir o restaurar la maquinaria apoptótica en las células cancerosas se ha considerado una estrategia atractiva para la terapia contra el

cáncer. Hasta la fecha se han identificado muchos de los reguladores clave de la apoptosis. Estos incluyen: receptores de muerte, inhibidores de Bcl-2 pro y antiapoptóticos, proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP por sus siglas en inglés), caspasas y p53. La identificación de los principales reguladores apoptóticos ha fomentado la exploración de candidatos a fármacos que podrían trabajar directamente con esos reguladores.⁵² En concreto, muchos péptidos proapoptóticos han resultado de gran interés como se muestra en la tabla 3.

TABLA 3

Ejemplos de péptidos proapoptóticos

Nombre	Secuencia aminoacídica	Mecanismo de acción	Referencia
KLAK	(KLAKLAK) ₂	Permeabilización de membrana mitocondrial	53
CTMP4	LDPKLMKEEQMSQAQLFTRSFD DGL	Inhibición directa de AKT	54
GO-203	RRRRRRRRRCQCRRKN	Interrupción de la supresión de especies reactivas de oxígeno de MUC1-C	55
FRAP-4	WEWT	Activación de Fas al mimetizar a FasL	56
LP-4	SWTWEKKLETAVNLAWTAGNS NKWTWK	Interacción con VDAC-1 e inhibición de HK-I, Bcl-2 o Bcl-xL	57
P53-C terminal	GSLAHSSHLKSKKGQSTSRHKK	Aumento de los niveles extracelulares de Fas/FasL	58
P7	LPLTPLP	Inhibición de las proteínas Hsp 90, Akt y la señalización IKK/NF-kB	59
NuBCP-9	FSRSLHSLL	La unión a Bcl-2 induciendo un cambio conformacional	60

En general, como fármaco peptídico, los péptidos proapoptóticos poseen muchas propiedades favorables, que incluyen buena solubilidad acuosa, baja inmunogenicidad, disponibilidad de síntesis económica y modificación química eficiente. Sin embargo, persisten algunos desafíos con respecto al uso de péptidos proapoptóticos para la terapia del cáncer, incluida una menor absorción de células tumorales, una baja selectividad en su modo de acción, una escasa penetración en el tumor y una baja estabilidad plasmática.⁶¹ Para superar estos obstáculos, se ha propuesto el empleo de estrategias de vanguardia, como lo son el uso de nanoestructuras basadas en lípidos, poliméricas y no poliméricas, y nanopartículas orgánicas e inorgánicas, así como la realización de bioconjugados de anticuerpos y sistemas de liberación de fármacos basados en péptidos (PBDs por sus siglas en inglés).^{62,63}

1.5. Sistemas de liberación de fármacos basados en péptidos (PBDs)

Actualmente, algunas moléculas con actividad antitumoral presentan ciertos inconvenientes asociados con la pobre selectividad y penetración en la célula tumoral, como se menciona en el caso de los péptidos proapoptóticos, por lo que requieren de vehículos o sistemas de liberación intracelular para llevar a cabo su función terapéutica de manera efectiva.^{64 65}

El desarrollo de sistemas de administración de fármacos para la terapia contra cáncer es un tema crucial. En ese sentido, los PBDs son alternativas prometedoras para el tratamiento del cáncer ya que permiten mejorar la penetración en las células y el reconocimiento específico como resultado de sus posibles combinaciones con moléculas

citotóxicas, ácidos nucleicos, proteínas y péptidos. Dentro de estos sistemas destacan los péptidos de penetración celular (CPPs por sus siglas en inglés) y los péptidos de localización tumoral (THPs por sus siglas en inglés), los cuales confieren el paso a través de membranas y la interacción específica con biomarcadores respectivamente.^{66,67}

1.5.1. Péptidos de penetración celular (CPPs)

El término péptido de penetración celular (CPP) se emplea para referirse a una secuencia de aminoácidos corta, típicamente tiene una longitud de entre 5 y 30 residuos, que tiene la capacidad de atravesar la membrana lipídica de las células.⁶⁸ Se ha sugerido la utilización de CPPs en un enfoque terapéutico contra el cáncer con el propósito de aumentar la efectividad de fármacos, dado que posibilitan el transporte de diversas moléculas hasta sus objetivos intracelulares.^{69,70} Los CPPs podrían tener una utilidad destacada en la entrega de moléculas terapéuticamente activas dentro de células en diversos tipos de cáncer que plantean desafíos en el ámbito farmacéutico. Se ha observado que el uso de estos péptidos representa una alternativa para tratar células cancerosas multi-fármaco resistentes (MDR por sus siglas en inglés), lo que podría superar los obstáculos en el transporte de moléculas con potenciales aplicaciones clínicas en el futuro.^{71,72}

Existe una gran variedad de CPPs derivados de proteínas, secuencias antimicrobianas y los obtenidos por métodos sintéticos.⁷³ Los CPPs son clasificados de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas, las cuales se correlacionan con sus patrones de interacción con las membranas celulares. Las tres categorías principales de los CPPs son: catiónicos, anfipáticos e hidrofóbicos,^{73,74} algunos ejemplos son mostrados en la tabla 4.

TABLA 4**Ejemplos de CPPs y su clasificación fisicoquímica**

CPP	Secuencia	Clase	Mecanismos	Referencia
TAT	YGRKKRRQRRR	Catiónico	Macropinocitosis Formación de poro	69,70,75
Poliarginina	(R4, R8, R9, R12, R16)	Catiónico	Macropinocitosis Formación de poro	76,77
LMWP	VSRRRRRRGRRRR	Catiónico	Endocitosis independiente de clatrina y caveolina Traslocación directa	78
sC18	GLRKRLRKFRNKIKEK	Catiónico	Endocitosis Traslocación directa	79
Pep-1	KETWWETWWTEWSQP KKKRKV	Anfipático	Formación de poro	80
BR2	RAGLQFPVGRLLRLL R	Anfipático	Macropinocitosis	81
Ku-70	PMLKE	Hidrofóbico	Formación de poro	82

Los CPPs de tipo catiónico se distinguen por contener una región con carga positiva, compuesta principalmente por residuos de arginina y/o lisina, lo que resulta esencial para su capacidad de internalización en las células. A diferencia de otros tipos de CPPs, esta configuración estructural no adopta una disposición helicoidal anfipática.⁸³ La captación celular de estos péptidos depende en gran medida de la interacción entre sus grupos catiónicos y los componentes lipídicos con carga negativa en la membrana celular.⁷⁷ Además de la carga positiva, la propiedad de anfipaticidad también influye en la penetración celular. Los CPPs anfipáticos pueden tener carga positiva o negativa y presentan tanto regiones hidrófobas como hidrófilas, lo que les permite atravesar las membranas lipídicas sin depender de cargas positivas.⁸⁴ En contraste con los CPPs catiónicos y anfipáticos, los CPPs hidrofóbicos son menos comunes. Para que un péptido

sea considerado hidrofóbico, debe contener una secuencia motivo de aminoácidos hidrofóbicos necesaria para su internalización o, en algunos casos, ser completamente hidrofóbico.⁷⁴ Así mismo, los mecanismos de internalización celular de los CPPs son variados, incluyendo traslocación directa (por formación de poro, micela invertida y el modelo tipo alfombra), macropinocitosis y endocitosis (dependiente e independiente de clatrina/caveolina).⁸⁵ Estos mecanismos se representan en la figura 6.

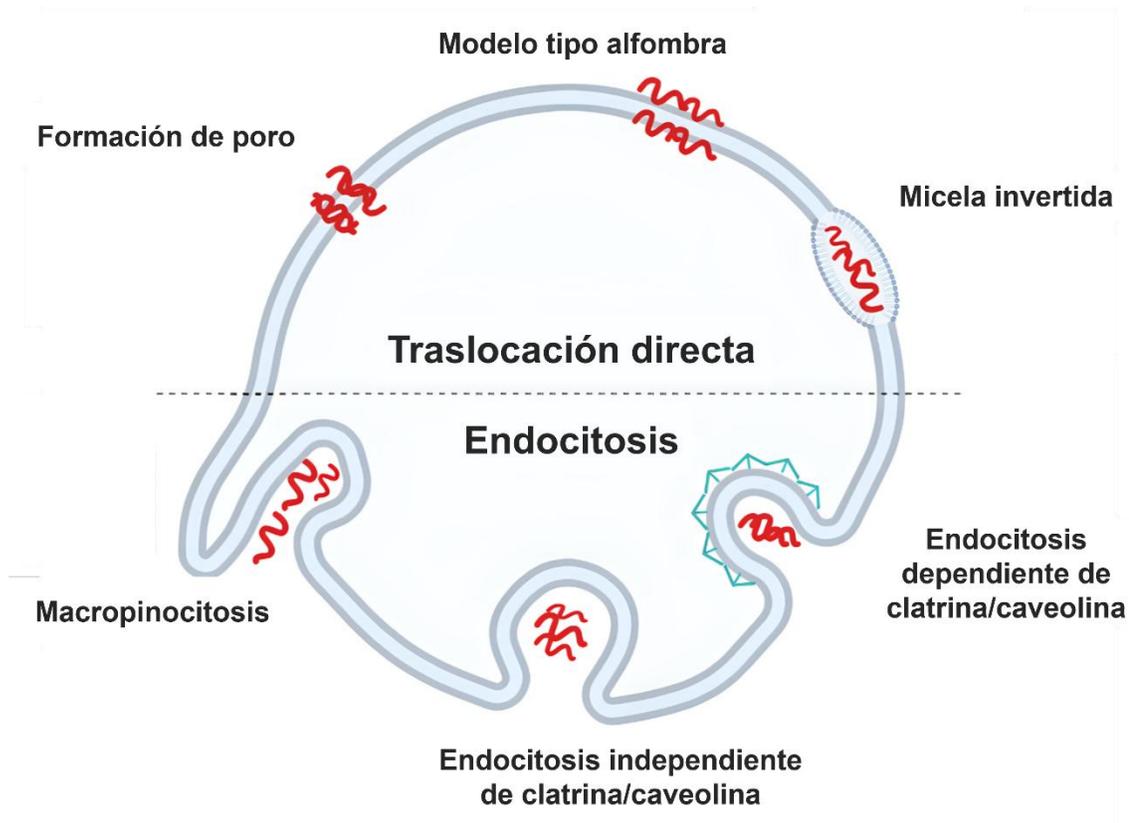


Figura 6. Principales mecanismos de internalización celular de los CPPs. Modificada de González-Cruz et al., 2022.⁶⁶

1.5.2. Péptidos de localización tumoral (THPs)

Los péptidos de localización tumoral (THPs) son secuencias cortas, regularmente con una longitud de 3 a 20 residuos de aminoácidos, y que contienen secuencias motivo que reconocen y se unen específicamente a una molécula de superficie en células tumorales o la vasculatura tumoral.⁸⁶

Inicialmente, se intentó identificar péptidos que pudieran dirigirse a proteínas específicas en la superficie celular mediante la generación de anticuerpos monoclonales contra un epítipo particular. Posteriormente, a partir del estudio de la interacción entre el anticuerpo y el epítipo, se obtenía una secuencia lineal que podría ser utilizada como péptido de direccionamiento biológico.⁶⁵ Una razón importante para el desarrollo de THPs es que, los péptidos tienen una menor capacidad de desencadenar una respuesta inmune en comparación con el uso de anticuerpos.⁸⁷ En los THPs desarrollados, se ha identificado afinidad por un biomarcador específico, lo que les permite reconocer selectivamente las células tumorales que lo sobreexpresan. Al mismo tiempo, su interacción con células no malignas es limitada, una propiedad clave en la terapia dirigida para minimizar los efectos adversos.⁸⁸

Un caso destacado de THP es el péptido S3 (CSHGYTGIRCQHVVLVDYQR), el cual presenta una alta especificidad para EGFR, un biomarcador ampliamente sobreexpresado en diversos tipos de cáncer.⁸⁹ La utilización del péptido S3 facilita el transporte selectivo de moléculas con actividad terapéutica, lo que lo convierte en una estrategia prometedora para tratar cánceres EGFR-positivos, reduciendo al mismo tiempo los efectos adversos.⁹⁰ Este y otros ejemplos de THPs se muestran en la tabla 5.

TABLA 5

Ejemplos de THPs y sus respectivas dianas

Péptido	Secuencia	Diana	Referencia
S3	CSHGYTGIRCQHVVLVDYQR	EGFR	89,90
LTV	LTVSPWY	HER2	91,92
RGD	RGD	Integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$	93
CP-7	CIQPFYP	VEGFR-3	94
CREKA	CREKA	Fibrina	95
LyP-1	CGNKRTRGC	Vasos linfáticos tumorales (p32)	96

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico. HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. VEGFR-3: Receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular.

1.5.3. Péptidos de localización y penetración tumoral (TH-CPPs)

En términos generales, un péptido de localización y penetración tumoral (TH-CPP por sus siglas en inglés) se define como un péptido que muestra una alta internalización y selectividad contra las células cancerosas. Dicho en otras palabras, son CPPs con actividad dirigida al cáncer o THPs con capacidad de internalización celular.⁹⁷ Por lo tanto, los TH-CPPs comprenden las mismas características anteriormente mencionadas tanto para los CPPs como los THPs. Durante los últimos años, la investigación sobre nuevos TH-CPPs ha aumentado considerablemente ya que estas secuencias cortas, aproximadamente de 5 a 30 residuos de aminoácidos, permiten direccionar efectivamente a otras posibles moléculas anticancerígenas, mejorando así la eficacia terapéutica y la reducción de efectos adversos.⁹⁸ Por mencionar un ejemplo, el péptido NRPD es capaz de interactuar de manera específica con el receptor EGFR, internalizándose en las células que lo sobreexpresan, lo cual permite proponer potenciales aplicaciones dirigidas a las neoplasias EGFR-

positivas.⁹⁹ La tabla 6 muestra algunos ejemplos de TH-CPPs con sus respectivas secuencias y diana celular.

TABLA 6

Ejemplos de TH-CPPs y sus respectivas dianas

Nombre	Secuencia	Diana	Referencia
NRPD	NRPDSAQFWLHH	EGFR	99
pHK-PAS	MIASHLLAYFFTELNGKPILFF	Mitocondria de célula cancerosa	100
IL-13p	TAMRAVDKLLLHLKFLFREGQFNRN FESIICRDRT	IL13R α 2	101
CPP33	RLWMRWYSPRTRAYGC	Línea celular A-549	97,102

IL13R α 2: Receptor alfa-2 de interleucina 13.

1.6. Antecedentes

1.6.1. Estudios del potencial anticancerígeno de péptidos proapoptóticos

El péptido KLAK ((KLAKLAK)₂) es uno de los péptidos proapoptóticos más investigados y fue desarrollado en 1996 por Javadpour et al.⁵³ Hoy se conoce que el péptido KLAK induce la apoptosis al permeabilizar la membrana mitocondrial. Uno de los reportes representativos de esta actividad fue realizado en el 2020 por Wang et al. quienes desarrollaron un complejo de KLAK unido a la proteína de choque térmico (HSP por sus siglas en inglés) y evaluaron su actividad antitumoral en la línea celular de

melanoma B16F10. Se demostró que, al emplearse una concentración de 10 μM , el complejo HSP-KLAK mostró una actividad antitumoral significativa, produciendo una inhibición celular del 90% y un 25.4% de células apoptóticas comparado con el péptido KLAK libre que produjo sólo un 10% de inhibición y un 7.3% de células apoptóticas en la línea celular B16F10.¹⁰³ Un ejemplo adicional que demuestra la capacidad de KLAK para inducir apoptosis fue el publicado por Qiao et al. en 2015, ellos conjugaron el péptido KLAK con el polímero poli- (β -amino éster). Estos copolímeros son autoensamblados en nanopartículas similares a micelas denominadas P2-KLAK, así mismo, se confirmó la vía de endocitosis, la apoptosis regulada por mitocondrias y la citotoxicidad de las micelas P2-KLAK en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama humano. Como resultado, el efecto de destrucción de células cancerosas de las micelas P2-KLAK fue mayor que el de KLAK libre, lo que se atribuye a la internalización eficiente en las células a través de la ruta de endocitosis y la posterior interrupción de las mitocondrias en las células. En comparación con el péptido KLAK (IC_{50} \sim 890 $\mu\text{g}/\text{mL}$), la IC_{50} de P2-KLAK se redujo a \sim 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, exhibiendo una capacidad anticancerígena mejorada en \sim 18 veces.¹⁰⁴

En el año 2020, el grupo de Sun et al., evaluaron las partículas similares a bacteriófago PP7 recombinante (VLP) unidas con el péptido penetrante Pep2 y el péptido KLAK (2PP7-Pep2-KLAK). Se determinó que este complejo es capaz de penetrar rápidamente en las células de leucemia mieloide aguda THP1 después de 30 min de incubación, además, las VLP de 2PP7-Pep2-KLAK no mostraron efectos citotóxicos en células normales, pero sí inhibieron la proliferación de las células THP1 por medio de la inducción de apoptosis después de 24 h de exposición y hasta 120 h después.¹⁰⁵ Otro estudio asociado al péptido KLAK fue el realizado por Sarangthem et al. en el 2021,

quienes evaluaron el polipéptido quimérico AP1-ELP-KLAK que contiene un péptido dirigido al receptor de la interleucina-4 (IL-4R), el polipéptido similar a la elastina autoensamblado con respuesta térmica (ELP) y el péptido proapoptótico KLAK en glioblastoma (GBM) *in vitro* e *in vivo*. En este trabajo, el efecto terapéutico de AP1-ELP-KLAK se probó en células de glioblastoma avanzadas y menos curables con mayor expresión de IL-4R. Se obtuvieron imágenes de bioluminiscencia de D54/effluc y U97MG/effluc tratadas con AP1-ELP-KLAK las cuales exhibieron una mayor muerte celular hasta 2 – 3 veces más que el control. El tratamiento con AP1-ELP-KLAK dio como resultado un aumento dependiente del tiempo de la actividad de caspasa-3 en células D54/C y ratones portadores de tumores D54/C. En los ensayos *in vivo* se mostró que la inyección intravenosa de AP1-ELP-KLAK redujo drásticamente el crecimiento tumoral al inducir la apoptosis celular en ratones portadores de tumores D54/effluc. Además, el examen inmunohistológico del tejido tumoral extirpado confirmó la presencia de células apoptóticas, así como la activación de caspasa-3.¹⁰⁶

A diferencia del péptido KLAK, el péptido proapoptótico CTMP4 (LDPKLMKEEQMSQAQLFTRSFDDGL) presenta pocos estudios reportados, sin embargo, se ha demostrado que es capaz de inhibir a la vía de señalización PI3K e inducir un efecto antiproliferativo y apoptótico en células de cáncer. Este péptido fue desarrollado en 2009 por Simon et al. y está derivado de la proteína moduladora del carboxilo terminal (CTMP por sus siglas en inglés) la cual inhibe la fosforilación de AKT previniendo su activación e induciendo apoptosis. En su trabajo, evaluaron la actividad proapoptótica *in vitro* de CTMP4 unido al CPP TAT y obtuvieron valores que van de 31.2% hasta 61.9% de células apoptóticas positivas empleando un tratamiento al 10 μ M de TAT-CTMP4

sobre celulares de cáncer pancreático (líneas celulares Panc-1, AsPC-1, CFPAC-1, BxPC-3 y Panc-02) y sin inducir apoptosis en células mononucleares de sangre periférica humana.⁵⁴ En otro estudio, Spitzer et. al. generaron una fusión del péptido proapoptótico CTMP4 y el ligando del receptor sigma-2 SV199 (S2-CTMP4) con el fin de caracterizar la capacidad de SV119 para administrar selectivamente otros cargos que inducen muerte celular y así aumentar las propiedades citotóxicas de SV119. Como resultado, la fusión S2-CTMP4 mostró la capacidad de inducir apoptosis en las células de cáncer pancreático murino Panc02, así mismo, se demostró una reducción en los niveles de AKT fosforilado derivado del tratamiento con este complejo, lo que confirma la actividad proapoptótica de CTMP4 dirigida a la inhibición de la vía PI3K.¹⁰⁷

1.6.2. Estudios de TH-CPPs y su aplicación contra el cáncer

Entre los PBDs más prometedores se encuentran los TH-CPPs, que como se ha mencionado anteriormente, combinan la actividad de penetración celular y localización tumoral en la misma secuencia. Anteriormente en este trabajo, se han mencionado algunos ejemplos de este tipo de péptidos, sin embargo, dado el objetivo de esta investigación, el TH-CPP más relevante es el péptido NRPDSAQFWLHH. Este fue reportado por primera vez por Jin et al. en el 2016 y desarrollado por medio de una librería de péptidos de fagos.¹⁰⁸ Más adelante, Gan et al. demostraron que NRPD reconoce al receptor EGFR, internalizándose en las células de cáncer que sobreexpresan este receptor, esto fue comprobado tratando a las líneas celulares A-431 (carcinoma escamoso humano) y HT-29 (adenocarcinoma colorrectal humano) con el péptido marcado con fluoresceína (FITC),

se demostró una internalización superior en la línea celular A-431 a través de microscopía de fluorescencia. Además, con ayuda de distintos inhibidores de endocitosis, se confirmó que el mecanismo de internalización de este péptido es a través de endocitosis mediada por clatrina. Por lo tanto, el péptido NRPDSAQFWLHH tiene aplicaciones potenciales en tratamientos dirigidos a pacientes con tumores malignos positivos para EGFR, que incluyen cáncer de piel, NSCLC, cáncer de esófago, gástrico, próstata, colorrectal, vejiga, páncreas, ovario y riñón.⁹⁹

En el 2020, Gan et al. ampliaron la información relacionada al uso del péptido NRPDSAQFWLHH. En este trabajo se desarrolló un sistema de administración de fármacos basado en la nanopartícula similar al virus de la hepatitis B (VLNP) y el péptido NRPDSAQFWLHH para la administración específica de ácido 5-fluorouracilo-1-acético (5-FA) a células de cáncer EGFR-positivo. En primer lugar, se determinaron los niveles de expresión del receptor EGFR en las líneas celulares A-431, HT29 y HeLa por medio de un inmunomarcaje, encontrando que A-431 presenta mayor expresión de EGFR. Posteriormente, se observó que 5-FA aumentó significativamente su citotoxicidad después de conjugarse en VLNP evaluando esta actividad sobre a las células A-431, HT29 y HeLa. Los resultados mostraron que VLNP conjugado con el péptido NRPDSAQFWLHH conteniendo 5-FA se internaliza en las células cancerosas y las elimina de una manera dependiente de EGFR, mostrando un resultado selectivo sobre la línea celular A-431, con una IC_{50} de $21.98 \pm 3.8 \mu M$, comparado con HT29 y HeLa que obtuvieron valores de IC_{50} de $215.16 \pm 1.89 \mu M$ y $>1 \text{ mM}$ respectivamente.¹⁰⁹

Por lo anterior mencionado, en el presente proyecto se plantea el uso de los péptidos proapoptóticos KLAK y CTMP4 como terapia contra cáncer EGFR-positivo, sin

embargo, ya que su sitio de acción se encuentra en el citoplasma de la célula, y a su vez, presentan una pobre capacidad de internalización celular, se propone la obtención de estos péptidos fusionados con el péptido NRPDSAQFWLHH, con el objetivo de mejorar la efectividad y selectividad de ambos péptidos e inducir un efecto antitumoral.

1.7. Justificación

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo de gran interés aquellos que sobreexpresan el receptor EGFR por su asociación con la resistencia a las terapias. Hoy en día existe un creciente interés en el desarrollo de nuevos fármacos que presenten mejor efectividad y selectividad contra el cáncer. Por lo tanto, este trabajo propone el diseño de péptidos proapoptóticos y el estudio de su seguridad y actividad citotóxica dirigida a cáncer EGFR-positivo.

1.8. Hipótesis

Los péptidos NRPD-CTMP4-H y NRPD-KLAK-H exhiben un efecto citotóxico dirigido, induciendo apoptosis en células de cáncer EGFR-positivo *in vitro* e *in vivo* en comparación con los péptidos libres CTMP4-H y KLAK-H.

1.9. Objetivos

1.9.1. Objetivo General

Diseñar los péptidos NRPD-CTMP4-H y NRPD-KLAK-H y evaluar su efecto citotóxico y apoptótico en modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer EGFR-positivo.

1.9.2. Objetivos Específicos

1. Diseñar las fusiones peptídicas NRPD-CTMP4-H y NRPD-KLAK-H para una actividad biológica mejorada, empleando herramientas bioinformáticas.
2. Determinar el efecto anticancerígeno de los péptidos sobre distintas líneas celulares, incluyendo células de cáncer EGFR-positivo, mediante la evaluación de la viabilidad celular relativa por MTT.
3. Analizar la capacidad de inducción de apoptosis de los péptidos sobre líneas celulares de cáncer EGFR-positivo por el método de TUNEL.
4. Identificar la actividad de internalización celular de los péptidos a través de la técnica de inmunomarcaje.
5. Evaluar el efecto terapéutico de los péptidos proapoptóticos en un modelo murino de tumor subcutáneo empleando la línea celular CT26.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo, la síntesis de los péptidos NRPD-H, KLAK-H, KLAK, CTMP4-H, NRPD-KLAK-H, NRPD-KLAK y NRPD-CTMP4-H fue solicitada a la compañía GenScript (Piscataway, NJ, E.U.A.).

Los reactivos utilizados fueron adquiridos de las compañías: Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, E.U.A), Corning (Glendale, AZ, E.U.A.), CTR Scientific (Monterrey, NL, México), Merck KGaA (Darmstadt, HE, Alemania) y Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, E.U.A). Los equipos empleados se encuentran en el Laboratorio de Farmacología Molecular y Modelos Biológicos de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL y el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina, UANL.

Se emplearon las siguientes líneas celulares obtenidas de The American Type Culture Collection (ATCC): cáncer de mama humano MCF-7 (ATCC®: HTB-22™), cáncer de pulmón EGFR-positivo humano A-549 (ATCC®: CCL-185™), cáncer de colon EGFR-

positivo murino CT26 (ATCC®: CRL-2638TM) y células epiteliales de riñón de mono verde africano Vero (ATCC®: CCL-81TM).

Los ratones hembra de la cepa Balb/c con 6 semanas de edad, empleados en la evaluación *in vivo*, fueron adquiridos de la empresa Círculo ADN (Ciudad de México, México).

2.1. Obtención de péptidos

2.1.1. Diseño y análisis de secuencias peptídicas

El diseño de las fusiones peptídicas (NRPD-CTMP4-H y NRPD-KLAK-H) así como de los péptidos independientes se realizó con base en reportes de modificaciones capaces de mejorar la estabilidad, capacidad de internalización celular e identificación de los péptidos. Además, se realizó una predicción de acoplamiento molecular péptido – EGFR como análisis complementario, empleando el servidor HPEPDOCK 2.0 y el programa PyMOL.

2.2. Evaluación biológica *in vitro*

2.2.1. Determinación de viabilidad celular relativa por la técnica de MTT

La actividad anticancerígena *in vitro* se evaluó en la línea celular MCF-7 (cáncer de mama humano) y las líneas celulares EGFR-positivas A-549 (cáncer pulmonar humano) y CT26 (cáncer de colon murino). La línea celular Vero se utilizó para evaluar citotoxicidad inespecífica. Todas las líneas celulares empleadas fueron cultivadas y

mantenidas en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% e incubadas a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂.

Se evaluó la viabilidad celular relativa por la técnica de MTT fundamentada en la reducción de la sal de tetrazolio MTT en formazán por acción de deshidrogenasas mitocondriales en células viables, la posterior solubilización y cuantificación de este por espectrofotometría para calcular el porcentaje de viabilidad celular con respecto al control. Empleando los cultivos con 80% de confluencia, se realizaron 2 lavados con PBS seguido de una tripsinización (tripsina-EDTA 0.25%) y conteo en cámara de Neubauer. Se colocaron 5,000 células por pozo en una placa de 96 pocillos, empleando medio RPMI-1640 con SFB al 10%, incubando por 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂. Posteriormente, se cambió el medio por RPMI-1640 con SFB al 5% y se adicionó el tratamiento con péptidos (por triplicado) a distintas concentraciones (5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM y 80 µM) en cada pocillo y se incubó por 48 h. Después, se sustituyó el medio con medio de cultivo nuevo al 10% de MTT, se incubó por 1 h y se realizó la lectura en el lector de microplacas ELISA ELX800 (marca Biotek) a 595 nm. Se calculó la viabilidad celular relativa acorde a los controles negativos.^{110,111}

2.2.2. Evaluación de la actividad proapoptótica por el método de TUNEL

La actividad proapoptótica de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H fue probada sobre las líneas celulares A-549, CT26, MCF7 y Vero mediante el ensayo de TUNEL con el kit Click-iT™ Plus - Alexa Fluor 594 (Thermo Fisher Scientific), fundamentado en la

detección de la fragmentación del ADN por acción de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT por sus siglas en inglés).

Empleando cultivos con un 80% de confluencia, se realizaron 2 lavados con PBS seguido de una tripsinización (tripsina-EDTA 0.25%) y conteo en cámara de Neubauer. En una placa de 24 pozos se colocaron cubreobjetos circulares estériles (12 mm de diámetro) y se sembraron 70,000 células/pozo, incubando por 24 h a 37 °C en atmosfera de 5% CO₂. Luego, se sustituyó el medio por RPMI-1640 con SFB al 5% y se adicionó el tratamiento de los péptidos KLAH-H y NRPD-KLAH-H a una concentración de 50 µM y se incubó nuevamente por 24 h. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con PBS y se fijaron las células con 1 mL de metanol frío por 10 min a -20 °C, luego se permeabilizaron con una inmersión rápida de 500 µL de acetona fría y se realizó 1 lavado con PBS. Como control positivo de reacción, se destinó un pocillo para su incubación con DNasa I (1 U) por 30 min a temperatura ambiente.

Se preincubaron las células con buffer de reacción TdT (100 µL/pozo) durante 10 minutos a 37 °C. Se preparó la mezcla de reacción TdT para cada pozo (47 µL de buffer de reacción TdT, 1 µL de EdUTP y 2 µL de enzima TdT). Se agregaron 50 µL de la mezcla de reacción TdT a las células y se incubaron por 1 h a 37 °C protegidas de la luz. Se realizaron 2 lavados de 5 min c/u con PBS y BSA al 3% y se adicionaron 50 µL/pozo del cóctel de reacción Click-iT™ Plus TUNEL, incubando en oscuridad por 30 min a 37 °C. Luego, se lavaron las células con PBS y BSA al 3% por 5 min y se procedió a realizar la tinción de los núcleos agregando 100 µL de Hoechst™ 33342 1X por pozo e incubando por 15 min a temperatura ambiente, protegido de la luz. Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS y se colectaron los cubreobjetos para su montaje con glicerol al 50% en

portaobjetos. El resultado fue observado en un microscopio de epifluorescencia Leica (modelo DM1000) y fotodocumentado con QImaging MicroPublisher 5.0 RTV.¹¹² La estimación del porcentaje de células TUNEL-positivas se realizó con ayuda del programa ImageJ por medio del análisis de 5 campos aleatorios.

2.2.3. Identificación de la internalización celular por el método de inmunomarcaje

Para detectar la internalización de los péptidos proapoptóticos en respuesta a los tratamientos se realizó la técnica de inmunomarcaje fluorescente en las células sometidas a tratamientos con los péptidos NRPD-H, KLAK-H, CTMP4-H, NRPD-KLAK-H y NRPD-CTMP4-H.

A partir de cultivos celulares con un 80% de confluencia, se realizaron 2 lavados con PBS seguido de una tripsinización (tripsina-EDTA 0.25%) y conteo en cámara de Neubauer. En una placa de 24 pozos se colocaron cubreobjetos circulares estériles (12 mm de diámetro) y se sembraron 70,000 células/pozo, incubando por 24 h a 37 °C en atmosfera de 5% CO₂. Luego, se sustituyó el medio por RPMI-1640 con SFB al 5% y se adicionó el tratamiento para cada péptido a una concentración de 50 µM y se incubó nuevamente por 30 min y 4 h. Al término de cada tratamiento, se realizaron 2 lavados con PBS y se fijaron las células con 1 mL de metanol frío incubando por 10 minutos a -20 °C, seguido de su permeabilización con una inmersión rápida con 500 µL de acetona fría. Se realizaron 2 lavados con PBS y se añadieron 400 µL de la solución de bloqueo de suero de caballo al 3% y se incubó por 1 h a 4 °C. Posteriormente, se retiró la solución de bloqueo y se añadieron 300 µL de solución de anticuerpo primario murino Anti-HisTag (Santa Cruz

Biotechnology) en una relación 1:250 y se dejó en incubación durante la noche a 4 °C. Luego, se realizaron 3 lavados con PBS, se añadieron 300 µL de solución de anticuerpo secundario Anti-ratón marcado con Alexa Fluor™ Plus 555 (Thermo Fisher Scientific) en una relación 1:500 y se incubó por 2 h a 4 °C. Se realizaron 3 lavados con PBS y se colectaron los cubreobjetos con las células inmunomarcadas para ser colocados en portaobjetos agregando 8 µL de medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Laboratories) como contratinción de núcleos. El resultado se observó en un microscopio de epifluorescencia Leica (modelo DM1000) y se fotodocumentó con QImaging MicroPublisher 5.0 RTV.¹¹³

2.3. Evaluación biológica *in vivo*

2.3.1. Evaluación del efecto antitumoral de los péptidos KLAH-H y NRPD-KLAH-H en el modelo *in vivo*

Para evaluar el efecto antitumoral de los péptidos KLAH-H y NRPD-KLAH-H, se realizó el ensayo en ratones hembra de la cepa Balb/c de 7 semanas de edad con 4 murinos por grupo y se mantuvieron con dieta chow estándar y agua *ad libitum* bajo ciclos circadianos de 12 h. Tras una semana de aclimatación en el bioterio, los murinos recibieron un implante tumoral de células CT26 (200,000 células) en 100 µL por inyección subcutánea en el flanco izquierdo. Los murinos fueron monitoreados para detectar la formación de la masa tumoral y se calculó su volumen empleando la fórmula mostrada en la figura 7. Al alcanzar un volumen de 200 mm³, se procedió a iniciar con los tratamientos con KLAH-H, NRPD-KLAH-H y erlotinib en dosis de 10 mg/kg de ratón siguiendo un

régimen de tratamiento por vía subcutánea peritumoral (3 aplicaciones con espacio de 5 días entre cada una).^{114,115} Los distintos grupos de estudio se presentan en la tabla 7.

$$V = \frac{d^2 \times D}{2}$$

Figura 7. Fórmula para calcular volumen tumoral. Volumen tumoral (V), diámetro menor (d), diámetro mayor (D).

TABLA 7

Grupos de estudio y tratamientos

Grupo	Tratamiento
1	PBS (control)
2	Erlotinib
3	KLAK-H
4	NRPD-KLAK-H

Se analizó el crecimiento del tumor y peso del murino para cada grupo. Los criterios de eutanasia contemplados corresponden si los murinos presentan señales de dolor, lesiones en piel o en tumor y baja de peso.

El manejo de los modelos murinos se llevó a cabo siguiendo cuidadosamente las instrucciones estipuladas por la norma oficial mexicana NOM-ZOO-062-1999, evitando en todo momento el sufrimiento innecesario de los animales. El bienestar general de los ratones, su peso y tamaño de tumor fue monitoreado continuamente hasta la conclusión

del ensayo. Al término del ensayo, se llevó a cabo el sacrificio de los ratones por medio de dislocación cervical, se colectaron órganos (corazón, hígado, pulmón y riñón) y tumores de los murinos, los cuales fueron destinados para su análisis histológico. Este protocolo fue revisado por el comité de revisión institucional.

2.3.2. Evaluación histológica del efecto de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H en el modelo *in vivo*

Los tumores y órganos aislados del ensayo *in vivo* fueron destinados para su análisis histológico. Primero, se realizó su fijación en formalina durante 72 h a 4 °C, su posterior deshidratación en etanol ascendente en el procesador automático de tejidos (Histokinette) Kedee (modelo KD-TS3D), su inclusión final en bloques de parafina empleando el centro de inclusión Kedee (modelo KD-BM). Los cortes histológicos fueron obtenidos con ayuda de un micrótopo de rotación Leica (modelo RM2235) con un grosor de 4 µm, y posteriormente fueron sometidos a la tinción histológica de hematoxilina y eosina. Las laminillas teñidas fueron montadas en medio de montaje EntellanTM y fueron analizadas en un microscopio óptico Leica para determinar alteraciones presentes en los órganos y tumores en respuesta a los tratamientos. Se utilizó una escala histológica para determinar los principales cambios estructurales.

2.4. Evaluación biológica *ex vivo*

2.4.1. Evaluación del efecto de los péptidos KLAH-H y NRPD-KLAH-H en el modelo *ex vivo*

Para garantizar el contacto y permanencia prolongada del tratamiento con los péptidos KLAH-H y NRPD-KLAH-H con las células tumorales, se decidió incorporar un ensayo de administración de los péptidos bajo cultivos tumorales *ex vivo*. A partir de un murino con implante tumoral CT26 no tratado, se realizó la obtención y disección del tumor y se procesó en fragmentos de 2 mm³, los cuales fueron colocados en una placa de 24 pozos en medio RPMI-1640 con SFB 10% y expuestos a la IC₅₀ de cada péptido durante 72 h, a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Al finalizar los tratamientos, las muestras fueron destinadas para su análisis histológico del mismo modo que los tejidos del modelo *in vivo*.

2.5. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y con 3 ensayos independientes en el caso de los ensayos *in vitro*. Para el análisis de los resultados obtenidos, se realizó una comparación de medias por medio de un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey, considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Además, para la evaluación de viabilidad celular relativa, se calcularon los valores correspondientes al IC₅₀ con ayuda del programa GraphPad Prism 8.

2.6. Disposición de residuos generados

La disposición de residuos generados durante el presente trabajo fue realizada de acuerdo con lo establecido en el Programa de Gestión para el Manejo Integral de los Residuos Generados en la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL y los lineamientos establecidos por el departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL. Los cultivos empleados fueron esterilizados a 121 °C durante 15 min y manejados como residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. Obtención de péptidos

3.1.1. Diseño y análisis de secuencias peptídicas

Se realizó el diseño de los péptidos NRPD-H, KLAK-H, CTMP4-H, NRPD-KLAK-H y NRPD-CTMP4-H tomando como base la literatura en donde se han reportado las secuencias aminoacídicas de NRPD, KLAK y CTMP4, así mismo, se añadieron modificaciones a sus secuencias basadas en lo siguiente: 1) aumentar el tiempo de vida media en plasma, 2) mejorar la actividad de internalización en células tumorales y 3) permitir su identificación por medio de anticuerpos. Para el primer caso, se añadió a cada secuencia un residuo de cisteína en el extremo N-terminal, estrategia desarrollada por Pang et al. que se basa en la posibilidad de establecer enlaces disulfuro con proteínas transportadoras.¹¹⁹ Finalmente, se agregaron de 4 a 6 residuos de histidina en el extremo C-terminal para permitir su reconocimiento con el anticuerpo anti-HisTag, y al mismo

tiempo, mejorar la habilidad de internalización de los péptidos.¹²⁰ Las secuencias aminoacídicas de los péptidos evaluados en este proyecto se muestran en la tabla 8.

TABLA 8

Péptidos obtenidos y sus secuencias aminoacídicas

Nombre	Secuencia
NRPD-H	CNRPDSAQFWLHHHHHH
KLAK-H	CKLAKLAKKLAKLAKHHHHHH
KLAK	KLAKLAKKLAKLAK
CTMP4-H	CLDPKLMKEEQMSQAQLFTRSFDDGLHHHHHH
NRPD-KLAK-H	CKLAKLAKKLAKLAKNRPDSAQFWLHHHHHH
NRPD-KLAK	KLAKLAKKLAKLAKNRPDSAQFWLHH
NRPD-CTMP4-H	CLDPKLMKEEQMSQAQLFTRSFDDGLNRPDSAQFWLHHHHHH

De modo complementario, los péptidos NRPD, NRPD-KLAK y NRPD-CTMP4 fueron sometidos a un análisis de predicción de acoplamiento molecular péptido – EGFR con el servidor HPEPDOCK 2.0, de esta forma se visualizó la región de interacción más probable del péptido NRPD original. La figura 8 muestra el modelo más confiable, de acuerdo con el servidor HPEPDOCK, para NRPD original acoplado con la región extracelular de EGFR (ID PDB: 1MOX), encontrando únicamente interacciones de tipo hidrofóbicas.

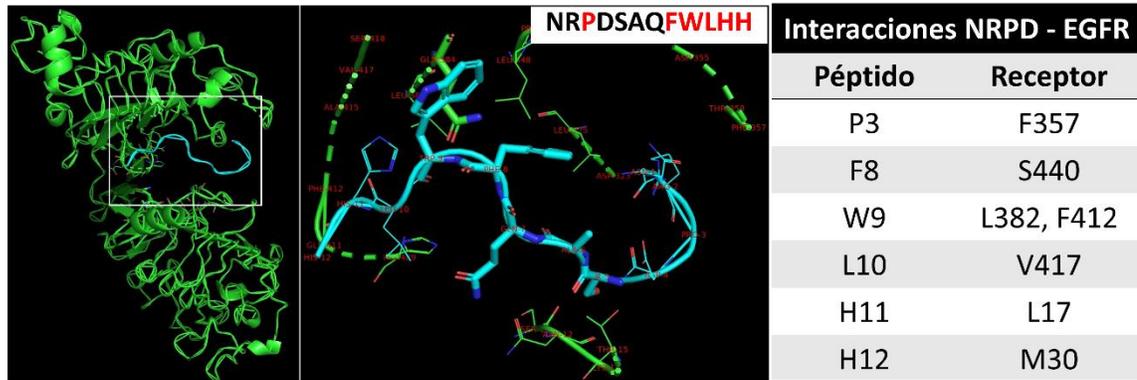


Figura 8. Modelo de acoplamiento molecular NRPD – EGFR. A la izquierda se observa el modelo general del acoplamiento (NRPD en color azul y EGFR en verde). Al centro se presenta un acercamiento a NRPD, mostrando sólo las regiones de EGFR más cercanas a él y la secuencia de NRPD con los residuos responsables de la interacción en color rojo. A la derecha se enlistan las interacciones hidrofóbicas entre los residuos de NRPD y EGFR.

El resultado de este primer acoplamiento sirvió como punto de comparación para las siguientes predicciones obtenidas. Se obtuvieron los modelos de los péptidos modificados acoplados con EGFR (NRPD-H – EGFR, NRPD-KLAK-H – EGFR, y NRPD-CTMP4-H – EGFR), los cuales se presentan en la figura 9, mostrando que la región de interacción en cada uno se conserva a pesar de las diferencias en las regiones modificadas.

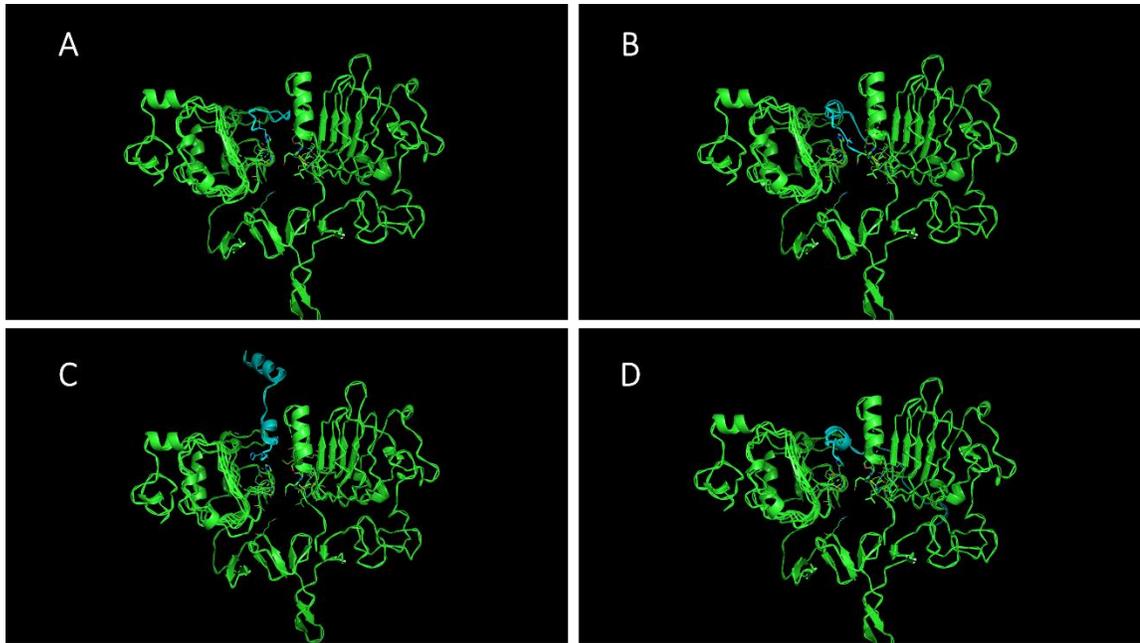


Figura 9. Modelos predictivos de acoplamiento molecular péptido – EGFR. Péptido (azul) y EGFR (verde). A) NRPD original – EGFR. B) NRPD-H – EGFR. C) NRPD-KLAK-H – EGFR. D) NRPD-CTMP4-H – EGFR.

3.2. Evaluación biológica *in vitro*

3.2.1. Determinación de viabilidad celular relativa por la técnica de MTT

Los péptidos NRPD-H, KLAK-H, KLAK, CTMP4-H, NRPD-KLAK-H, NRPD-KLAK y NRPD-CTMP4-H, así como el fármaco erlotinib, fueron aplicados como tratamiento a las células Vero, MCF-7, A-549 y CT26 en 5 diferentes concentraciones (5 μM – 80 μM). Esto permitió evaluar el efecto citotóxico y anticancerígeno de cada tratamiento a través de la cuantificación de la viabilidad celular relativa como se muestra a continuación.

El péptido NRPD-H no mostró una actividad citotóxica en las líneas celulares evaluadas. Como observa en la figura 10, no hay una disminución significativa del porcentaje de viabilidad celular con el aumento en la concentración del tratamiento.

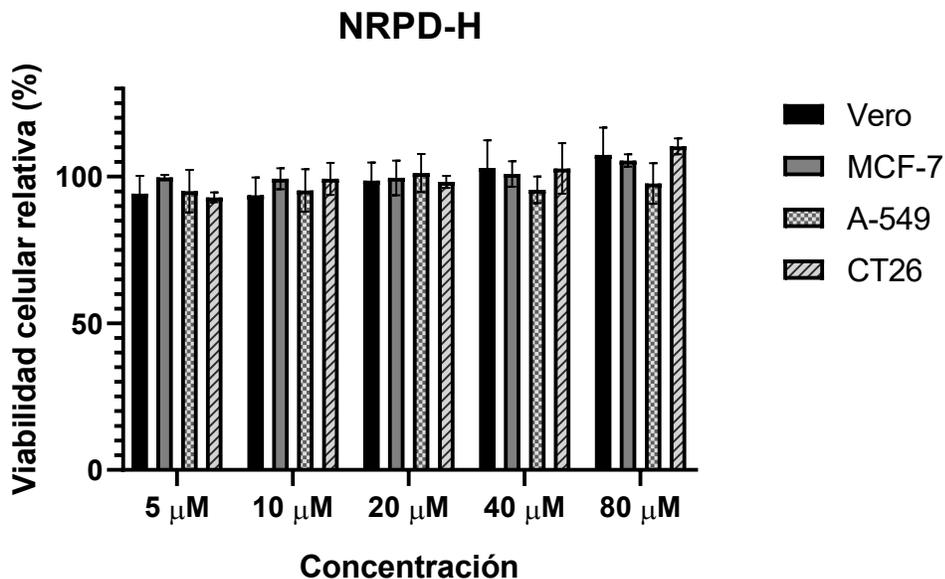


Figura 10. Gráfico del efecto citotóxico del péptido NRPD-H. Se presenta el porcentaje de viabilidad celular relativa de las células Vero, MCF-7, A-549 y CT26 tratadas con el péptido NRPD-H a distintas concentraciones. El control negativo fueron células sin tratamiento.

En el caso de los tratamientos con el péptido KLAK-H, se mostró una destacada actividad citotóxica y anticancerígena disminuyendo significativamente la viabilidad de las células al exponerse al péptido en concentraciones superiores a 20 μM, siendo las líneas celulares A-549 y CT26 las más susceptibles (figura 11).

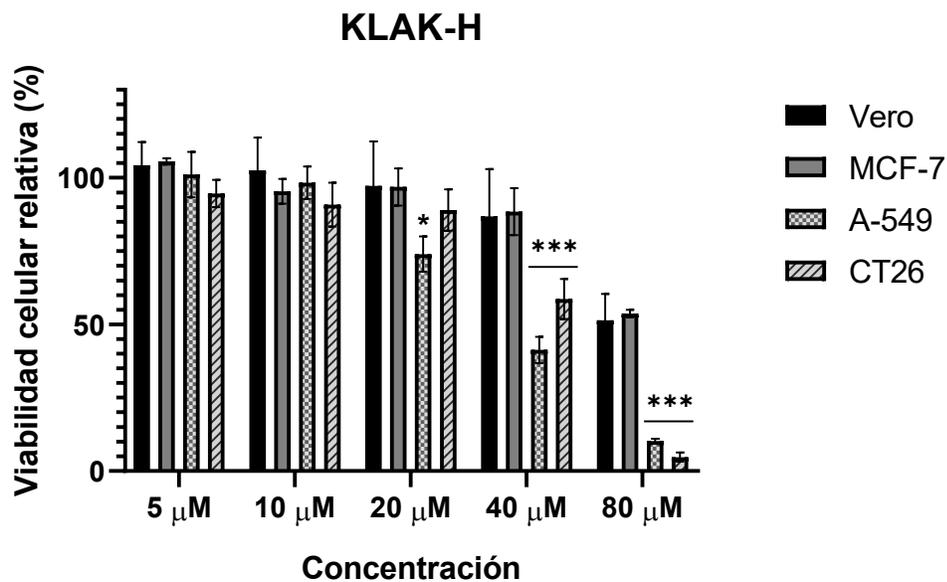


Figura 11. Gráfico del efecto citotóxico del péptido KLAK-H. Se presenta el porcentaje de viabilidad celular relativa de las células Vero, MCF-7, A-549 y CT26 tratadas con el péptido KLAK-H a distintas concentraciones. El control negativo fueron células sin tratamiento. (*) $p < 0.05$, (***) $p < 0.0001$.

Por otra parte, el péptido proapoptótico KLAK (sin modificaciones) fue evaluado para determinar si las modificaciones presentes en KLAK-H son importantes para su actividad. Como se muestra en la figura 12, KLAK no redujo significativamente la viabilidad de las células tratadas.

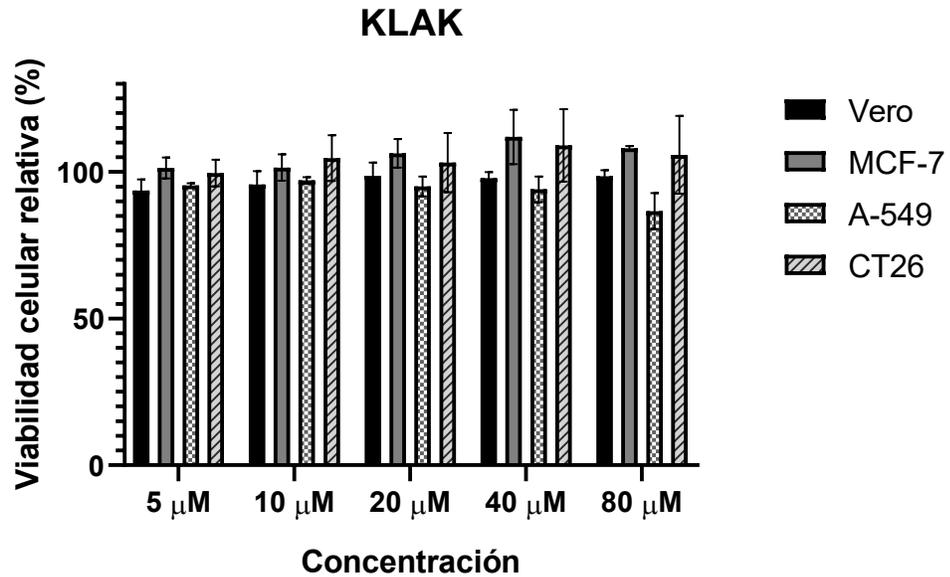


Figura 12. Gráfico del efecto citotóxico del péptido KLAK. Se presenta el porcentaje de viabilidad celular relativa de las células Vero, MCF-7, A-549 y CT26 tratadas con el péptido KLAK a distintas concentraciones. El control negativo fueron células sin tratamiento.

En cuanto a los tratamientos con el péptido CTMP4-H, no se observó citotoxicidad en las líneas celulares probadas. Como observa en la figura 13, no hay una disminución significativa de la viabilidad celular en ninguna concentración del tratamiento.

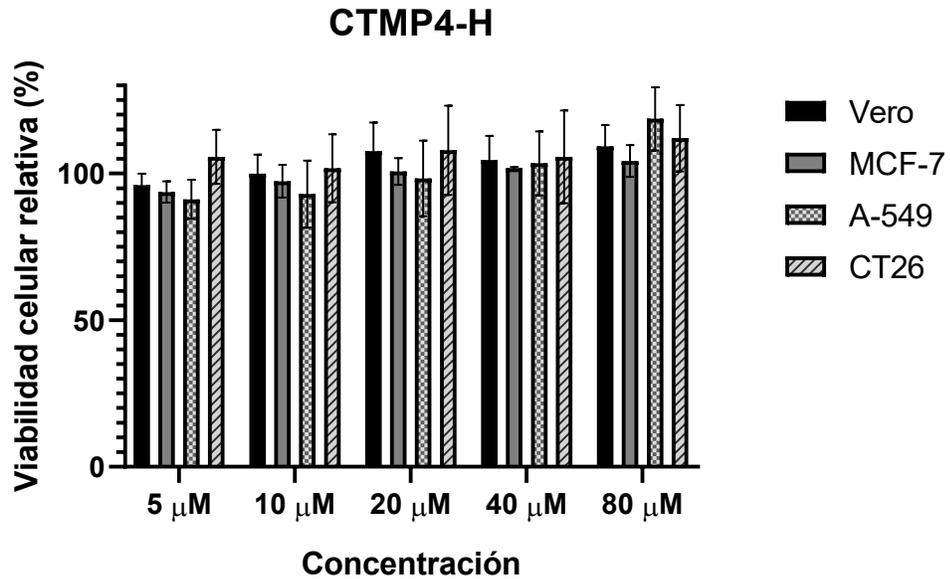


Figura 13. Gráfico del efecto citotóxico del péptido CTMP4-H. Se presenta el porcentaje de viabilidad celular relativa de las células Vero, MCF-7, A-549 y CT26 tratadas con el péptido CTMP4-H a distintas concentraciones. El control negativo fueron células sin tratamiento.

De modo similar al péptido KLAH-H, el péptido NRPD-KLAH-H presentó actividad citotóxica y anticancerígena significativa. La figura 14 refleja una marcada reducción en la viabilidad de las células tratadas a medida que aumenta la concentración del tratamiento. Así mismo, se puede observar que la línea celular A-549 fue la más susceptible al tratamiento con una disminución significativa en su viabilidad en concentraciones de 20 μ M y 40 μ M.

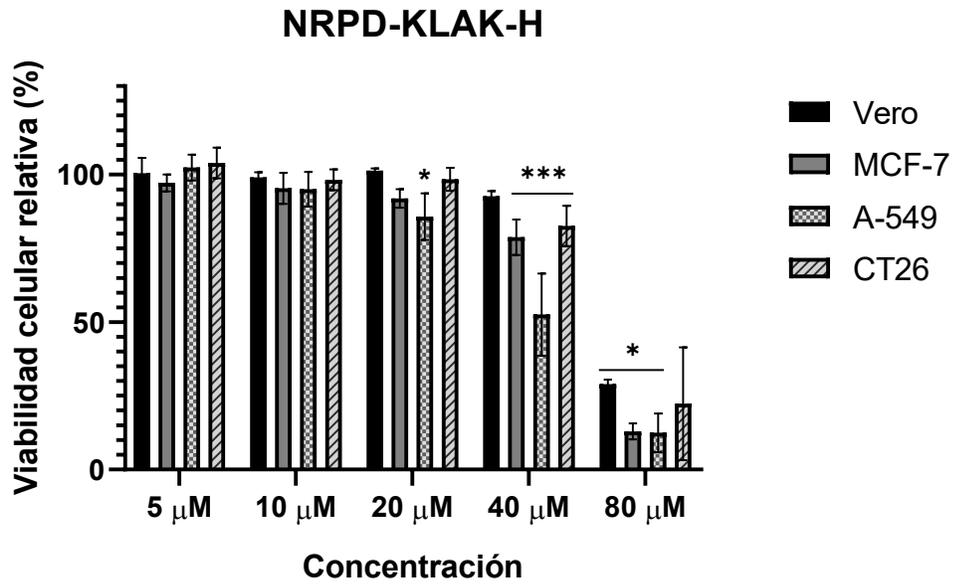


Figura 14. Gráfico del efecto citotóxico del péptido NRPD-KLAK-H. Se presenta el porcentaje de viabilidad celular relativa de las células Vero, MCF-7, A-549 y CT26 tratadas con el péptido NRPD-KLAK-H a distintas concentraciones. El control negativo fueron células sin tratamiento. (*) $p < 0.05$, (***) $p < 0.0001$.

Adicionalmente, se analizó el efecto del péptido NRPD-KLAK (sin modificaciones), el cual demostró una inhibición significativa de la viabilidad en las líneas celulares A-549 y CT26 a partir de una concentración de 40 μM (figura 15), pero con un efecto débil comparado con el de NRPD-KLAK-H.

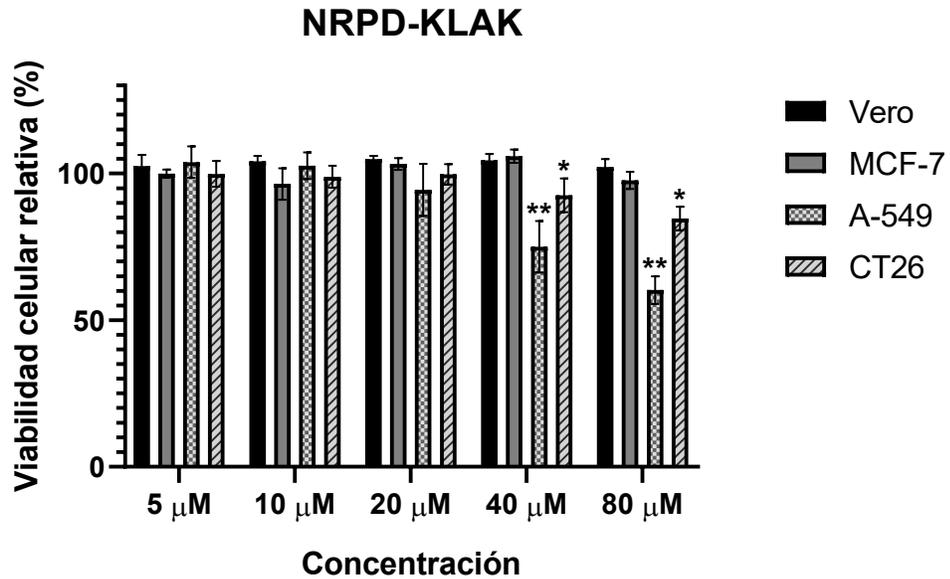


Figura 15. Gráfico del efecto citotóxico del péptido NRPD-KLAK. Se presenta el porcentaje de viabilidad celular relativa de las células Vero, MCF-7, A-549 y CT26 tratadas con el péptido NRPD-KLAK a distintas concentraciones. El control negativo fueron células sin tratamiento. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.001$.

En la figura 16 se presenta el efecto del péptido NRPD-CTMP4-H, estos resultados muestran que no existe una actividad citotóxica en ninguna línea celular tratada a las diferentes concentraciones.

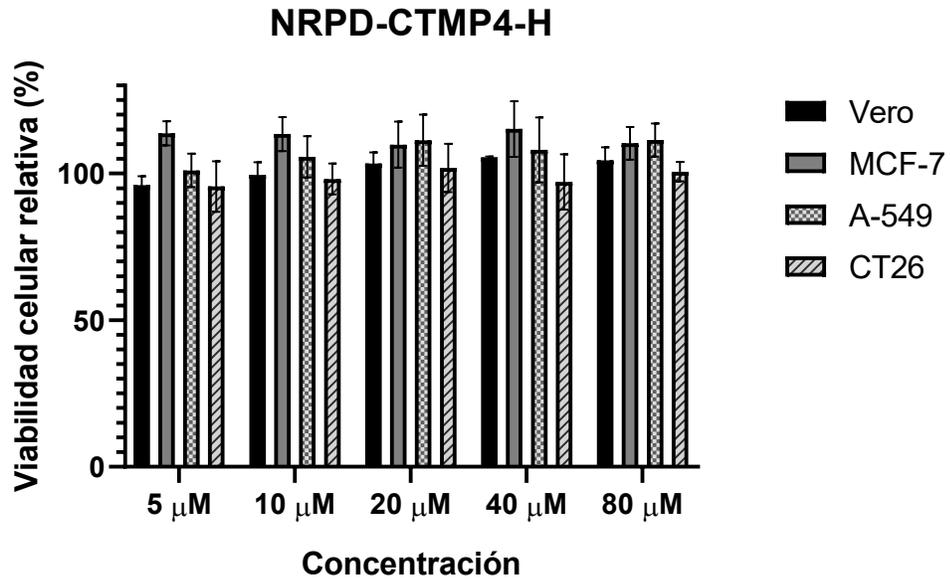


Figura 16. Gráfico del efecto citotóxico del péptido NRPD-CTMP4-H. Se presenta el porcentaje de viabilidad celular relativa de las células Vero, MCF-7, A-549 y CT26 tratadas con el péptido NRPD-CTMP4-H a distintas concentraciones. El control negativo fueron células sin tratamiento.

El inhibidor tirosina quinasa erlotinib fue evaluado en las mismas líneas celulares a las mismas concentraciones que los péptidos presentados anteriormente. Los resultados presentados en la figura 17 muestran una marcada reducción de la viabilidad celular en todas las líneas celulares desde una concentración de 5 μM. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa al comparar entre las concentraciones empleadas ni entre líneas celulares tratadas.

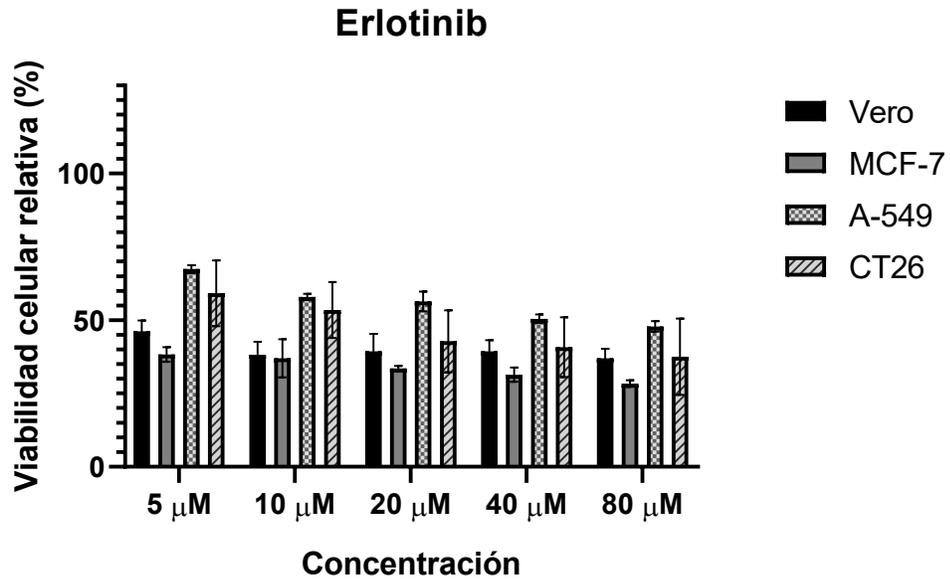


Figura 17. Gráfico del efecto citotóxico del fármaco erlotinib. Se presenta el porcentaje de viabilidad celular relativa de las células Vero, MCF-7, A-549 y CT26 tratadas con erlotinib a distintas concentraciones. El control negativo fueron células sin tratamiento.

Estos datos permitieron realizar el cálculo de valores de IC_{50} de los péptidos KLAH-H y NRPD-KLAH-H, así como el fármaco de referencia erlotinib, los cuales se presentan en la tabla 9. Se destaca que la línea celular A-549 es la más sensible a los tratamientos peptídicos y que el péptido KLAH-H muestra una actividad más potente que la fusión NRPD-KLAH-H (figura 18).

TABLA 9

IC₅₀ de los tratamientos con KLAH-H, NRPD-KLAH-H y erlotinib (μM)

	MCF-7	A-549	CT26	Vero
KLAH-H	86.3 ± 4.8	33.3 ± 2.9	42.3 ± 3.2	86.3 ± 14.0
NRPD-KLAH-H	52.8 ± 1.5	40.9 ± 6.9	59.6 ± 10.1	66.9 ± 0.5
Erlotinib	13.03 ± 2.86	44.79 ± 4.25	18.79 ± 7.74	10.2 ± 6.27

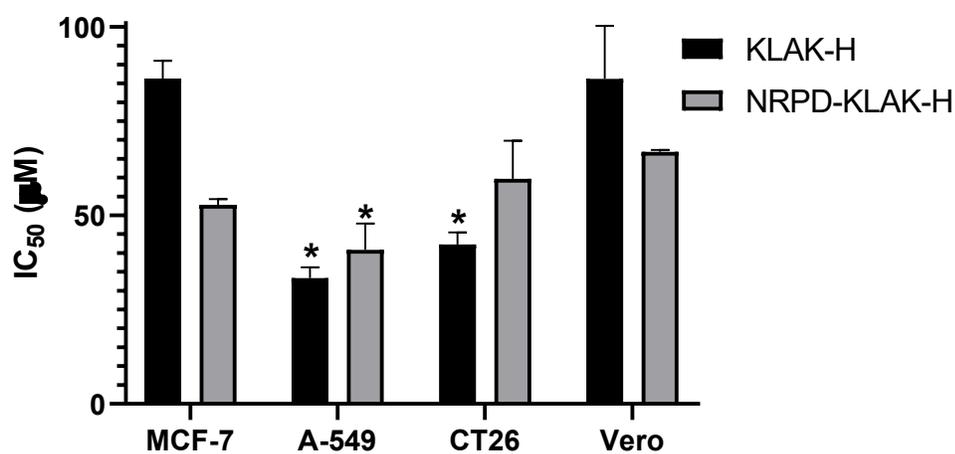


Figura 18. IC₅₀ de los péptidos KLAH-H y NRPD-KLAH-H. Se presentan los valores de IC₅₀ de los distintos tratamientos en las líneas celulares MCF-7, A-549, CT26 y Vero.

(*) p < 0.05.

3.2.2. Evaluación de la actividad proapoptótica por el método de TUNEL

Como se mencionó anteriormente, los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H mostraron la mayor citotoxicidad. Para confirmar si su mecanismo de inducción de muerte celular ocurre a través de la apoptosis, se llevó a cabo el ensayo TUNEL.

Los resultados de la figura 19 muestran que los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H inducen apoptosis en la línea celular Vero, estimándose un $22.90 \pm 9.77\%$ y $18.16 \pm 4.23\%$ de células TUNEL-positivas, respectivamente.

En la figura 20 se observa que los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H inducen apoptosis en la línea celular MCF-7, estimándose un $20.11 \pm 5.83\%$ y $24.28 \pm 7.75\%$ de células TUNEL-positivas, respectivamente.

En la figura 21 se confirma la habilidad de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H de inducir apoptosis en la línea celular A-549, estimándose un $64.77 \pm 6.28\%$ y $60.77 \pm 6.15\%$ de células TUNEL-positivas, respectivamente.

En la figura 22 se muestra que los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H son capaces de inducir apoptosis en la línea celular CT26, estimándose un $40.66 \pm 3.78\%$ y $39.90 \pm 8.74\%$ de células TUNEL-positivas, respectivamente.

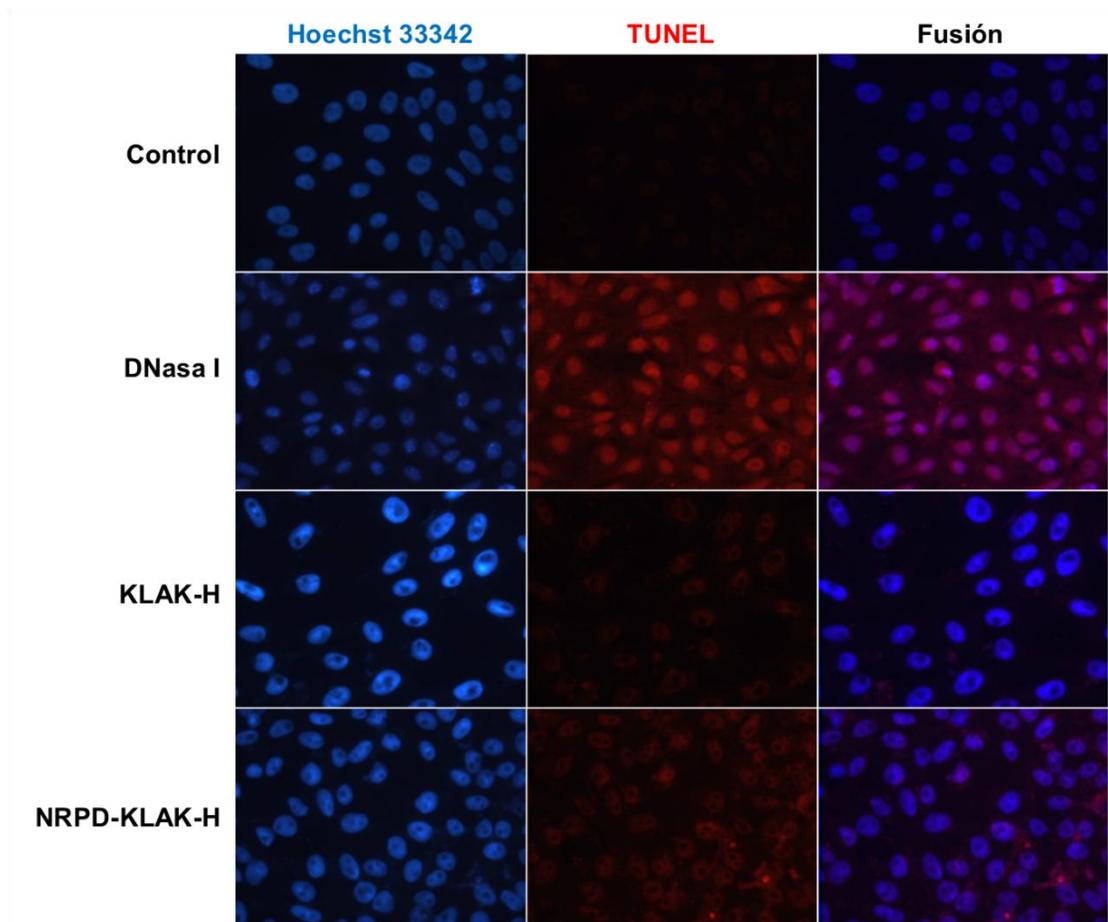


Figura 19. Efecto proapoptótico de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H en la línea celular Vero. Imágenes de microscopía de fluorescencia muestran núcleos teñidos con Hoechst 33342 (azul) y células TUNEL-positivas (rojo). El control negativo fueron células sin tratamiento y el control positivo fueron células tratadas con DNasa I.

Magnificación 400X.

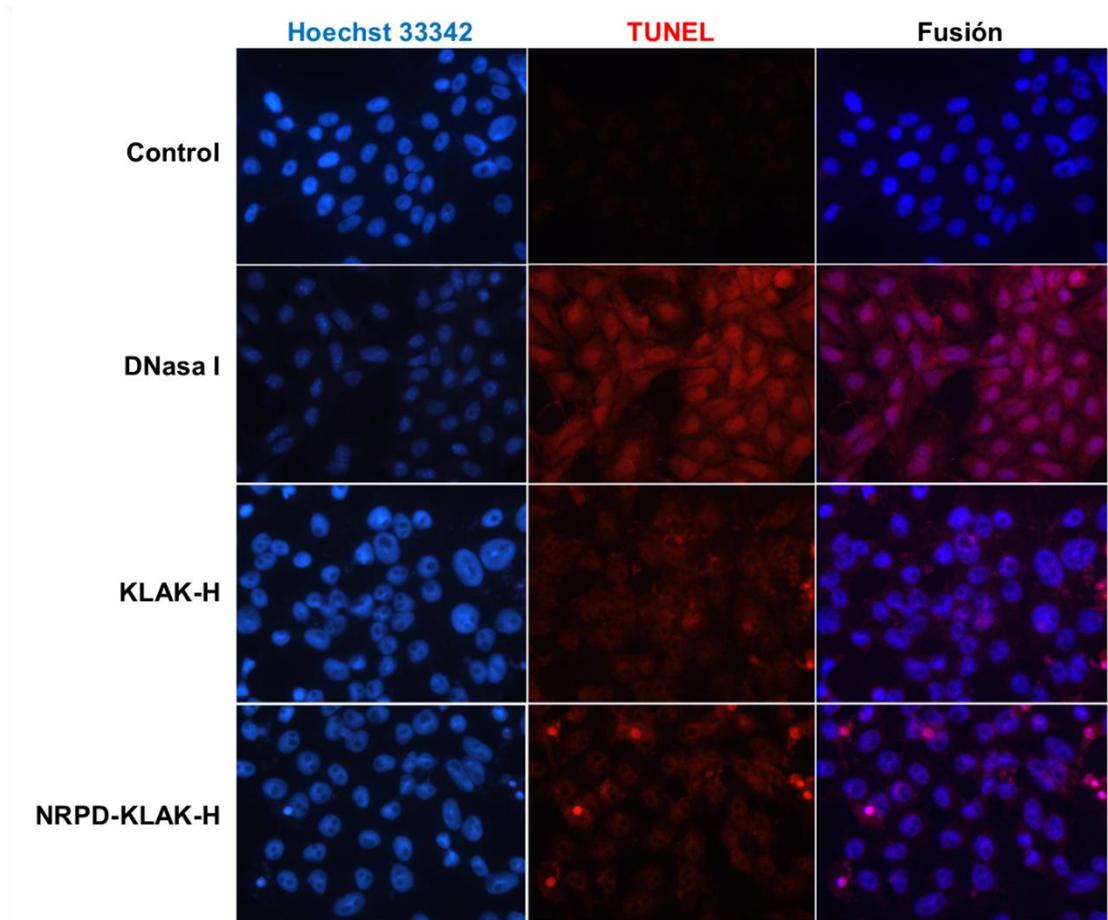


Figura 20. Efecto proapoptótico de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H en la línea celular MCF-7. Imágenes de microscopía de fluorescencia muestran núcleos teñidos con Hoechst 33342 (azul) y células TUNEL-positivas (rojo). El control negativo fueron células sin tratamiento y el control positivo fueron células tratadas con DNasa I.

Magnificación 400X.

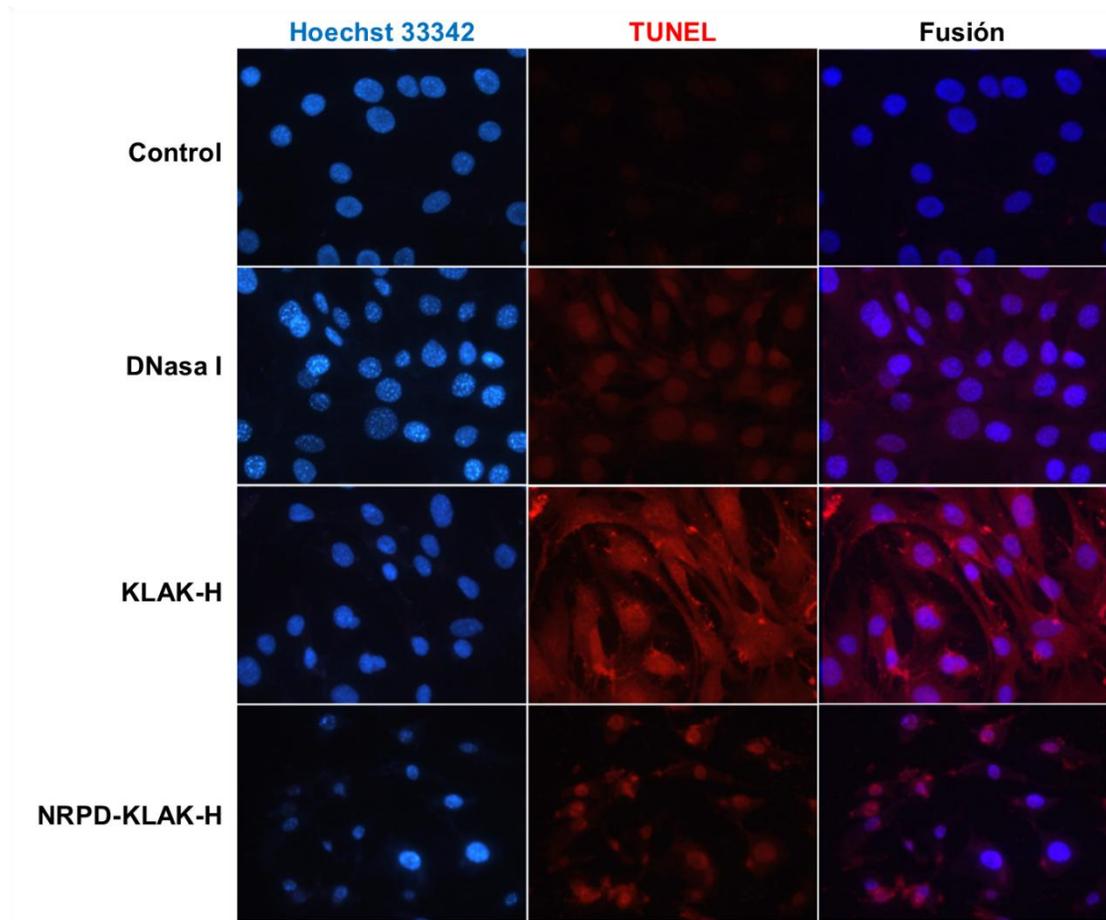


Figura 21. Efecto proapoptótico de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H en la línea celular A-549. Imágenes de microscopía de fluorescencia muestran núcleos teñidos con Hoechst 33342 (azul) y células TUNEL-positivas (rojo). El control negativo fueron células sin tratamiento y el control positivo fueron células tratadas con DNasa I.

Magnificación 400X.

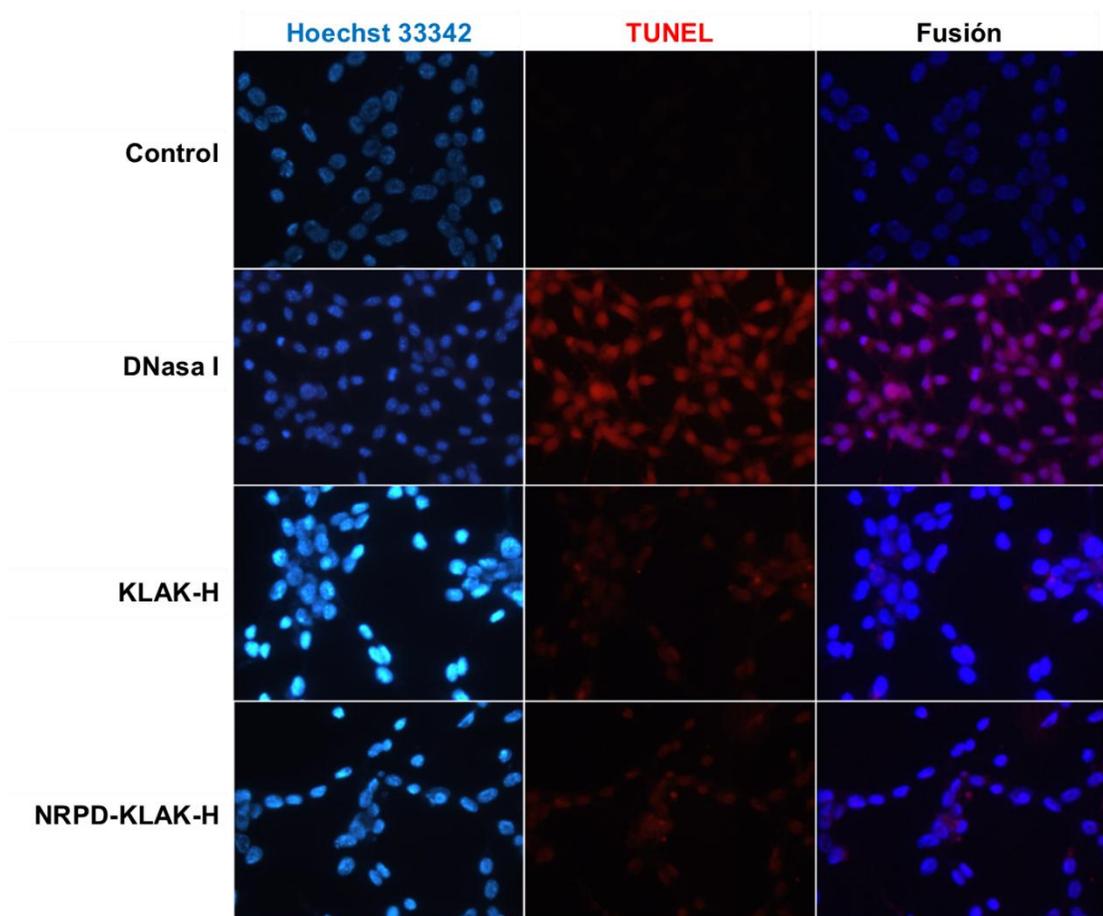


Figura 22. Efecto proapoptótico de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H en la línea celular CT26. Imágenes de microscopía de fluorescencia muestran núcleos teñidos con Hoechst 33342 (azul) y células TUNEL-positivas (rojo). El control negativo fueron células sin tratamiento y el control positivo fueron células tratadas con DNasa I.

Magnificación 400X.

3.2.3. Identificación de la internalización celular por el método de inmunomarcaje

Para evaluar la actividad de internalización celular de cada uno de los péptidos analizados, se realizó un inmunomarcaje fluorescente con el objetivo principal de detectar la etiqueta de histidinas (HisTag) añadida a los péptidos diseñados. Se evaluaron los péptidos NRPD-H, KLAK-H, CTMP4-H, NRPD-KLAK-H y NRPD-CTMP4-H en tratamientos de 30 minutos y 4 horas en las líneas celulares A-549, CT26, MCF-7 y Vero. La internalización celular se determinó cualitativamente mediante la observación de fluorescencia roja, indicando la captación de los péptidos.

Se detectó actividad de internalización celular para el péptido NRPD-H en las líneas celulares A-549 (figura 23a), CT26 (figura 23b) y Vero (figura 23d). Los mejores resultados se obtuvieron con el péptido KLAK-H, el cual se internalizó en las cuatro líneas celulares analizadas en ambos tiempos evaluados (figura 24). En contraste, el péptido NRPD-KLAK-H mostró internalización en las líneas celulares A-549 (figura 26a), MCF-7 (figura 26c) y Vero (figura 26d), pero no se detectó en las células CT26 (figura 26b). Finalmente, los péptidos CTMP4-H (figura 25) y NRPD-CTMP4-H (figura 27) presentaron una internalización pobre, limitada únicamente a la línea celular Vero. Un resumen de estos resultados se muestra en la tabla 10.

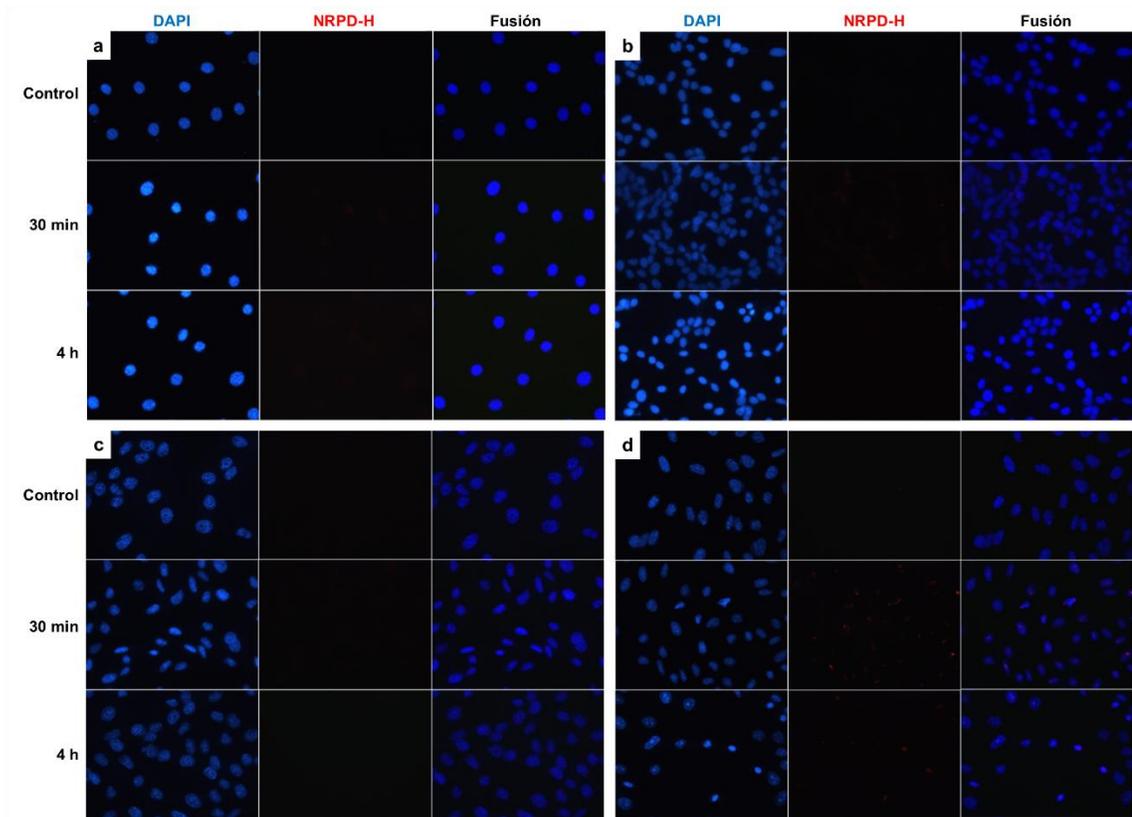


Figura 23. Internalización celular del péptido NRPD-H. Imágenes de microscopía de fluorescencia muestran núcleos teñidos con DAPI (azul) y péptido internalizado (rojo) en las líneas celulares: a) A-549, b) CT26, c) MCF-7, y d) Vero. El control negativo fueron células sin tratamiento. Magnificación 400X.

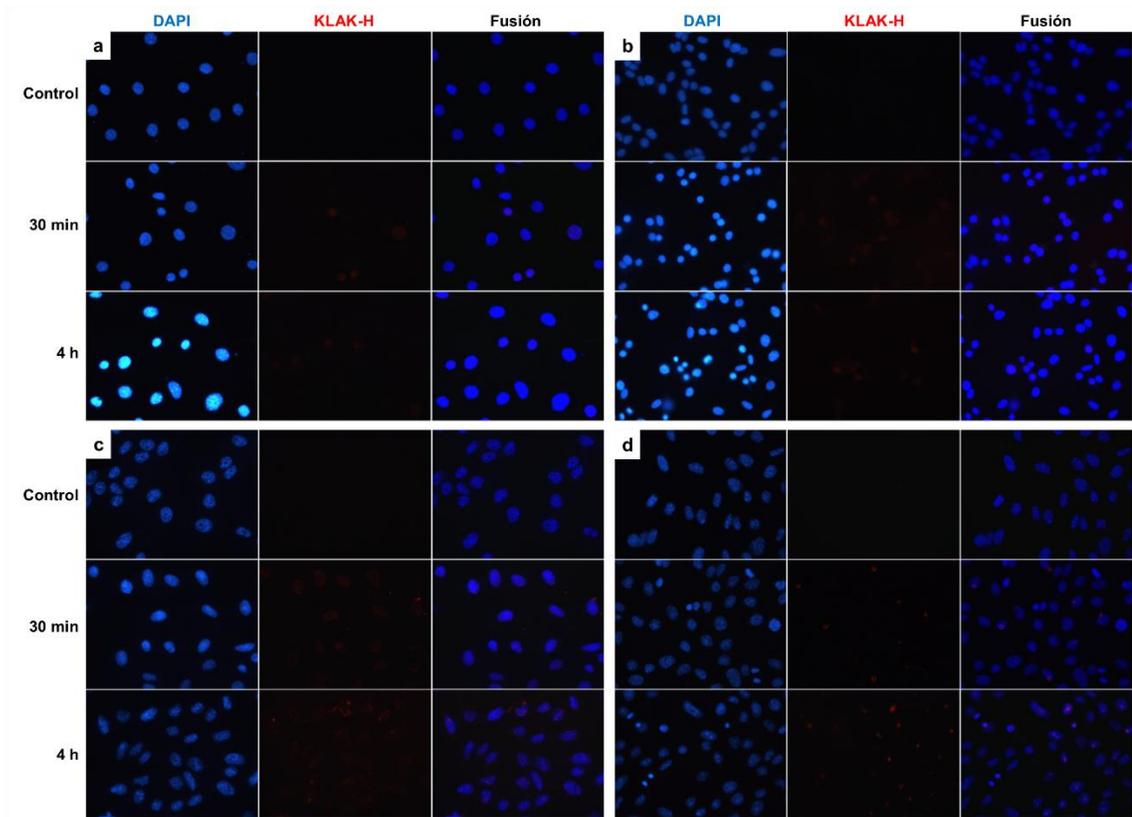


Figura 24. Internalización celular del péptido KLAH-H. Imágenes de microscopía de fluorescencia muestran núcleos teñidos con DAPI (azul) y péptido internalizado (rojo) en las líneas celulares: a) A-549, b) CT26, c) MCF-7, y d) Vero. El control negativo fueron células sin tratamiento. Magnificación 400X.

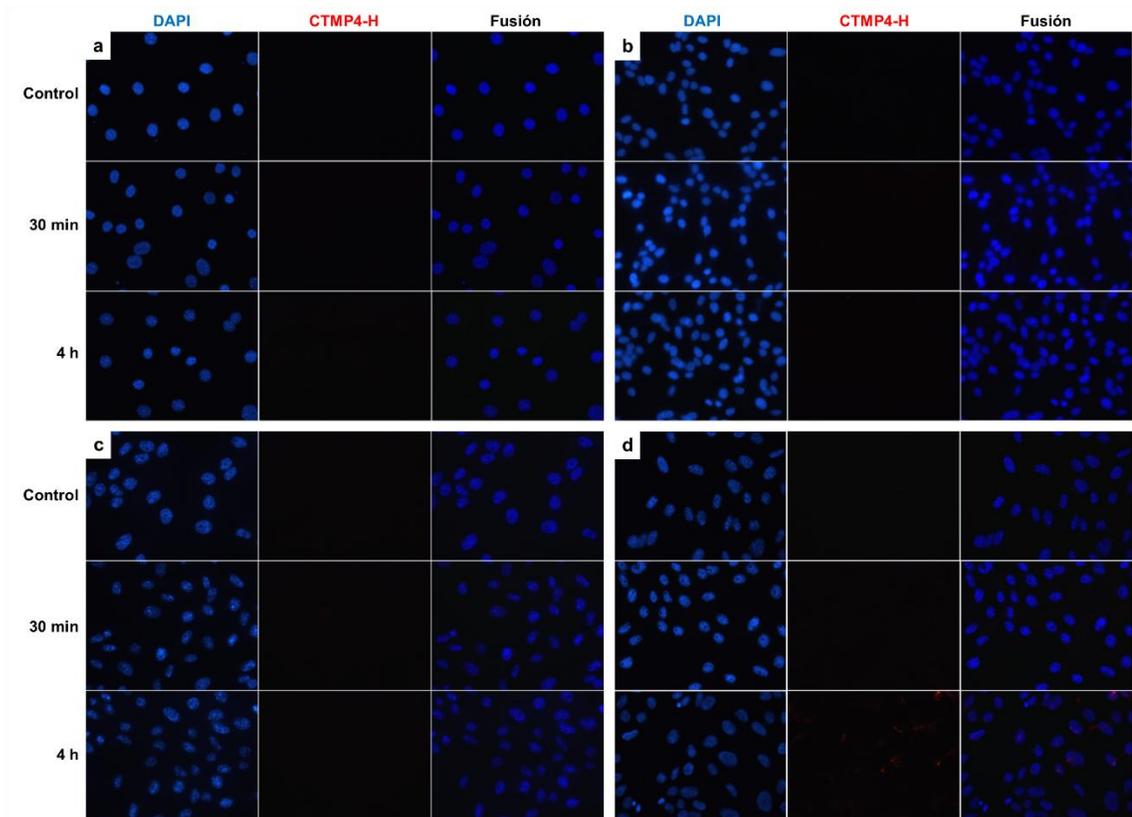


Figura 25. Internalización celular del péptido CTMP4-H. Imágenes de microscopía de fluorescencia muestran núcleos teñidos con DAPI (azul) y péptido internalizado (rojo) en las líneas celulares: a) A-549, b) CT26, c) MCF-7, y d) Vero. El control negativo fueron células sin tratamiento. Magnificación 400X.

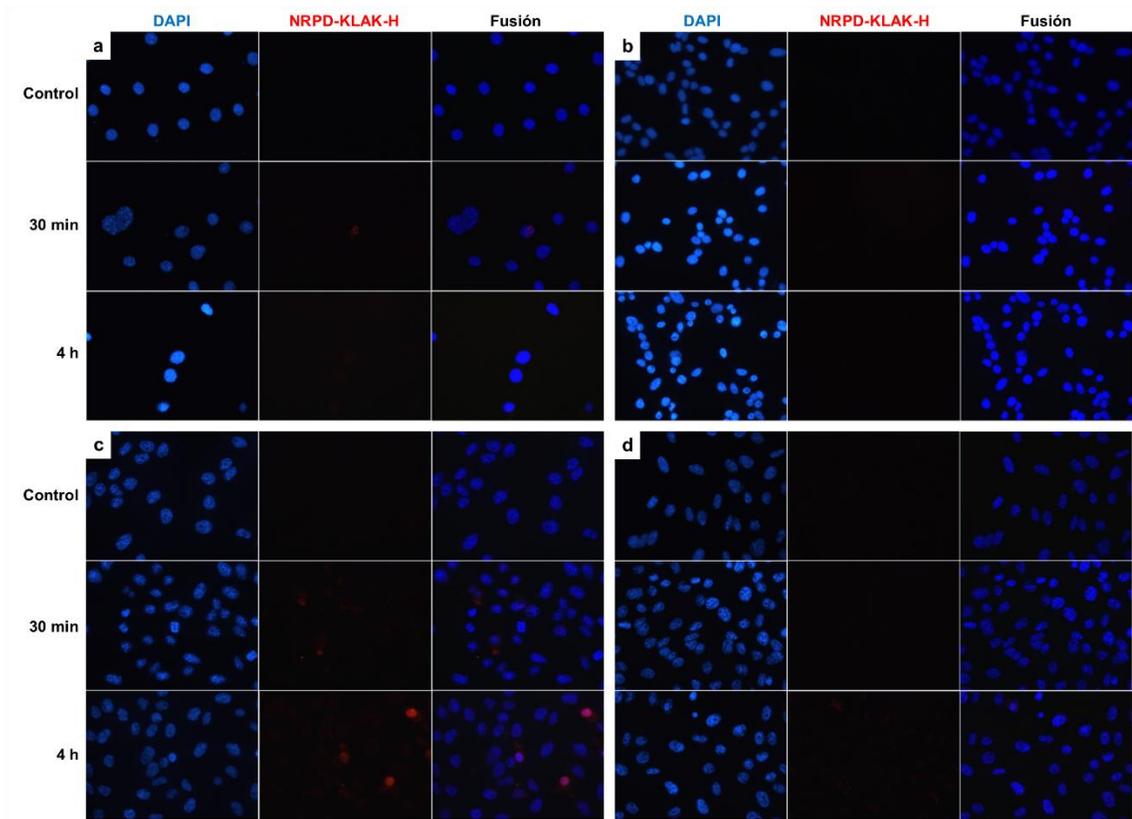


Figura 26. Internalización celular del péptido NRPD-KLAK-H. Imágenes de microscopía de fluorescencia muestran núcleos teñidos con DAPI (azul) y péptido internalizado (rojo) en las líneas celulares: a) A-549, b) CT26, c) MCF-7, y d) Vero. El control negativo fueron células sin tratamiento. Magnificación 400X.

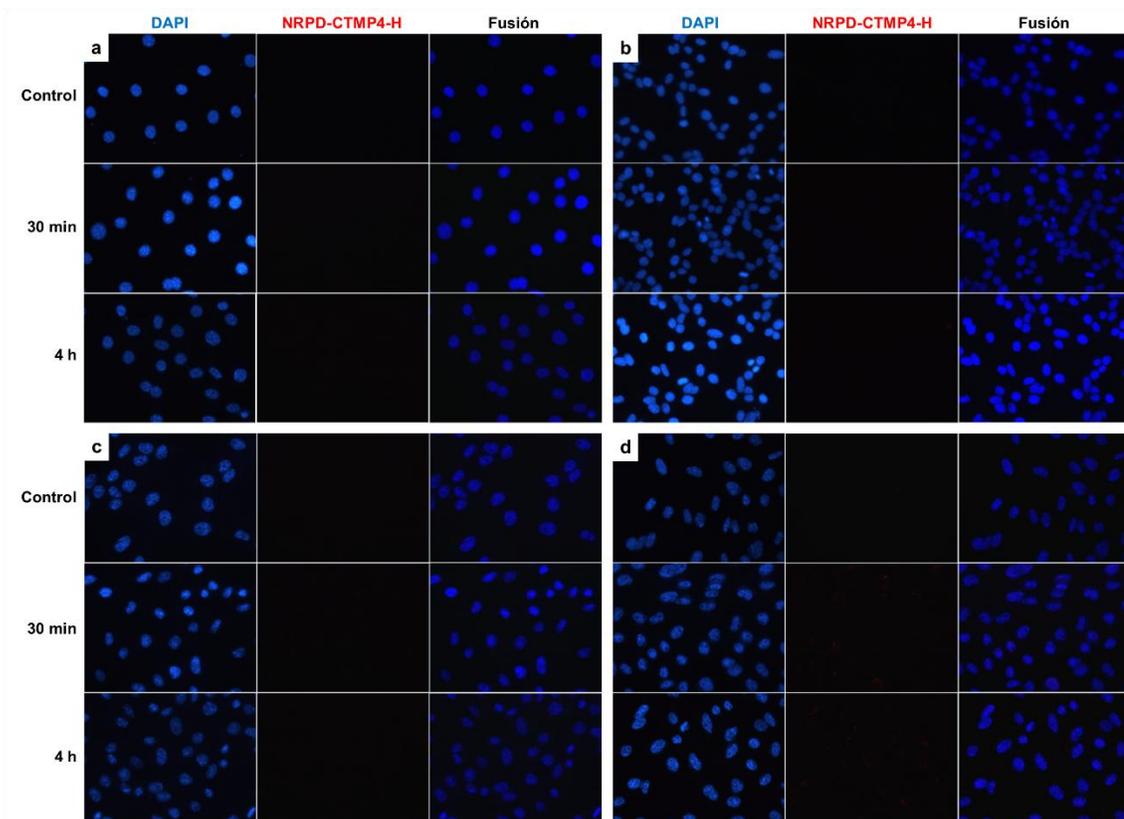


Figura 27. Internalización celular del péptido NRPD-CTMP4-H. Imágenes de microscopía de fluorescencia muestran núcleos teñidos con DAPI (azul) y péptido internalizado (rojo) en las líneas celulares: a) A-549, b) CT26, c) MCF-7, y d) Vero. El control negativo fueron células sin tratamiento. Magnificación 400X.

TABLA 10

Resumen de los resultados de internalización celular

Células	NRPD-H		KLAH-H		NRPD-KLAH-H		CTMP4-H		NRPD-CTMP4-H	
	30 min	4 h	30 min	4 h	30 min	4 h	30 min	4 h	30 min	4 h
A-549	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
CT26	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
MCF-7	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Vero	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+

(+) Internalización detectada. (-) Sin señal.

3.3. Evaluación biológica *in vivo*

3.3.1. Evaluación del efecto antitumoral de los péptidos KLAH-H y NRPD-KLAH-H en el modelo *in vivo*

La evaluación del efecto antitumoral *in vivo* fue realizada en 4 grupos de estudio: control (grupo 1), erlotinib (grupo 2), KLAH-H (grupo 3) y NRPD-KLAH-H (grupo 4). Como se muestra en la figura 28, no hubo una reducción del volumen tumoral por los tratamientos aplicados. En la tabla 11 se presenta el volumen tumoral registrado los ratones de cada grupo de estudio desde el inicio hasta el fin del ensayo, en los casos en los que se determinó la presencia de masa tumoral pero no fue posible realizar su medición se reportó como no medible (NM) seguido de signos '+' como un sistema arbitrario para su comparación.

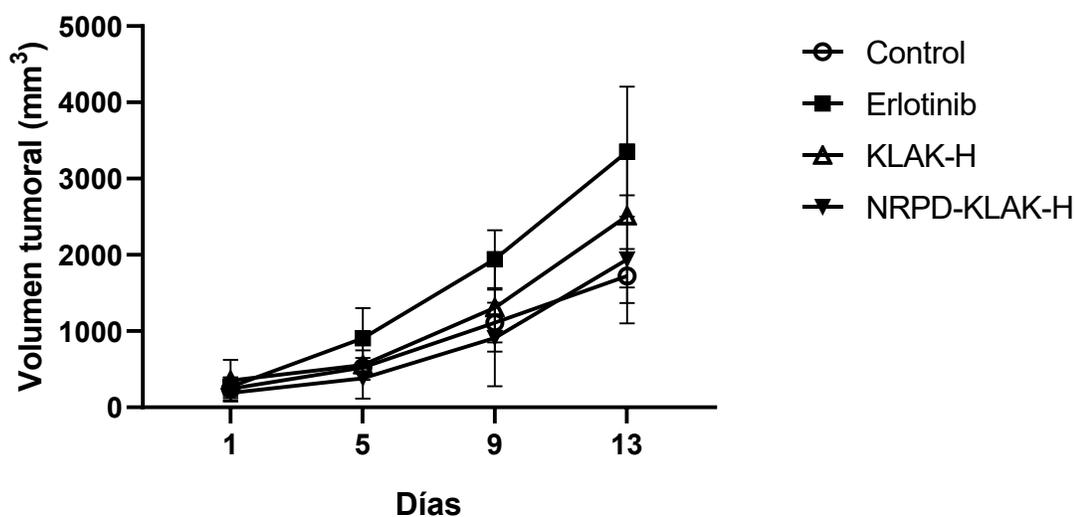


Figura 28. Gráfico del volumen tumoral resultado de los tratamientos *in vivo*. Se presenta el progreso del volumen tumoral en cada grupo de estudio durante el ensayo.

TABLA 11

Volumen tumoral del inicio al fin del ensayo (mm³)

Grupo	Inicio del ensayo				Fin del ensayo			
	<i>Ratón 1</i>	<i>Ratón 2</i>	<i>Ratón 3</i>	<i>Ratón 4</i>	<i>Ratón 1</i>	<i>Ratón 2</i>	<i>Ratón 3</i>	<i>Ratón 4</i>
1	239.72	296.42	NM +	98.22	1796.81	2085.87	1237.49	1775.93
2	403.44	NM +	172.22	229.68	2673.24	NM+	4310.91	3078.25
3	662.97	227.26	162.69	NM +	3499.03	2393.34	1636.4	-
4	NM +	142.32	239.07	NM ++	-	2170.43	2639.88	1009.23

(NM) No medible. (-) Masa tumoral no detectada.

3.3.2. Evaluación histológica del efecto de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H en el modelo *in vivo*

En la evaluación histopatológica de los tumores obtenidos del modelo *in vivo*, se identificaron alteraciones estructurales asociadas al proceso de apoptosis en los grupos tratados con erlotinib, así como con los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H. Entre estas alteraciones se observaron condensación de la cromatina e infiltración leucocitaria, como se muestra en la figura 29. No obstante, aunque el efecto de los tratamientos fue evidente en comparación con el grupo control, la presencia de dichas características fue limitada.

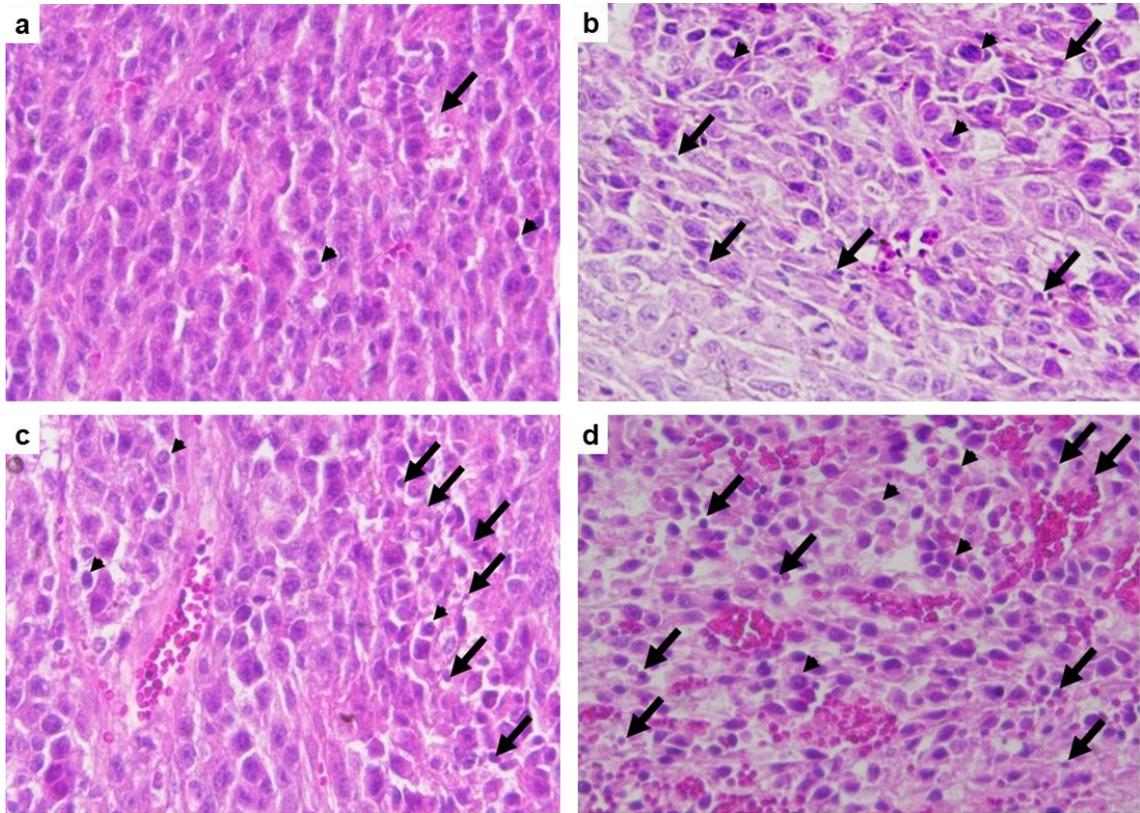


Figura 29. Micrografías representativas del análisis histopatológico de los tumores CT26 del modelo *in vivo*. Las imágenes muestran los resultados de los grupos: a) control, b) erlotinib, c) KLAH y d) NRPD-KLAH. Se presentan alteraciones estructurales como la condensación de la cromatina (flecha) e infiltrado leucocitario (cabeza de flecha). Tinción por hematoxilina y eosina. Magnificación 400X.

Además, con el objetivo de validar si otros órganos presentan alteraciones histopatológicas en respuesta a los tratamientos, se analizaron 4 de los principales órganos con mayor irrigación sanguínea: corazón, hígado, pulmón y riñón.

En la figura 30 se muestran los resultados correspondientes al análisis del tejido cardíaco. No se detectaron alteraciones estructurales que indiquen algún daño derivado de

los distintos tratamientos. Se observan fascículos de fibras musculares estriadas formados por cardiomiocitos alargados y ramificados con núcleo central. Entre las células y fascículos hay tejido conjuntivo (endomisio y perimisio, respectivamente) con vasos sanguíneos y eritrocitos. En el citoplasma se perciben las estriaciones transversales por los sarcómeros, unidades contráctiles, y entre cada célula se perciben los discos intercalares que conectan y permiten la comunicación y sincronía entre los cardiomiocitos.

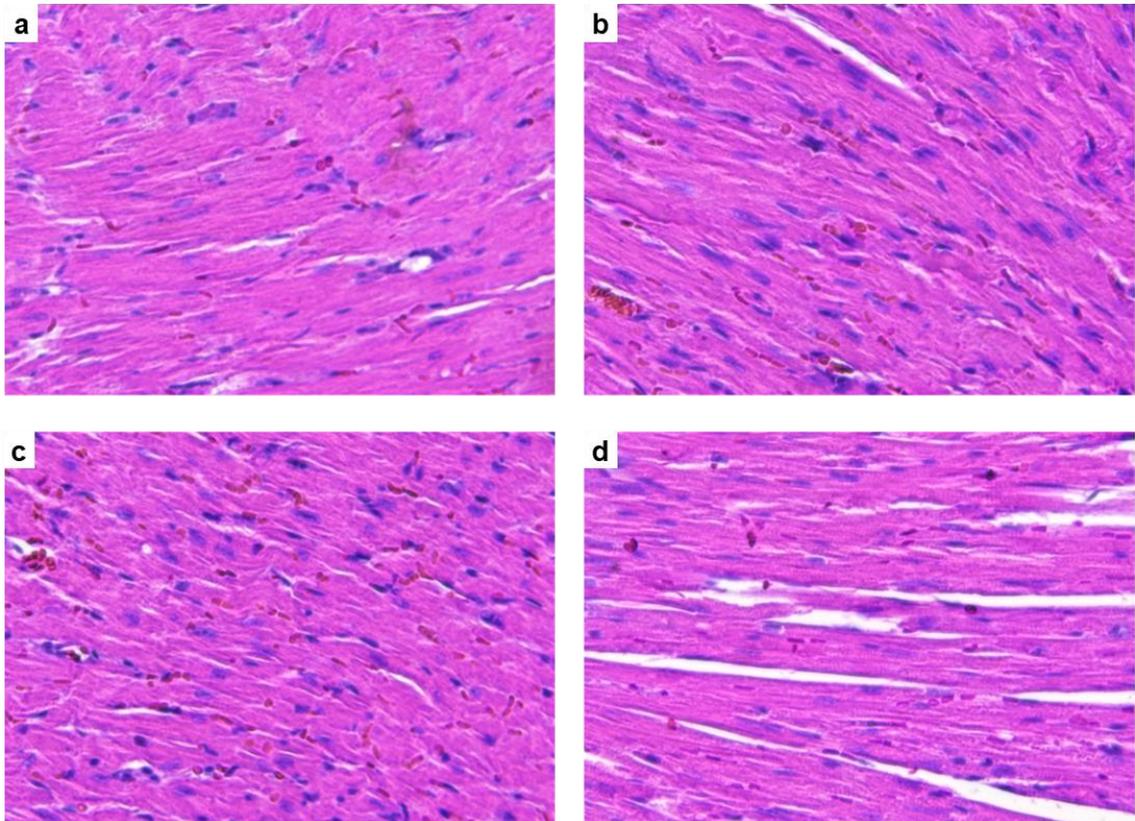


Figura 30. Micrografías representativas de tejido cardíaco del modelo *in vivo*. Las imágenes muestran los resultados de los grupos: a) control, b) erlotinib, c) KLAK-H y d) NRPD-KLAK-H. No se detectaron alteraciones estructurales que indiquen una lesión por los distintos tratamientos. Tinción por hematoxilina y eosina. Magnificación 200X.

En la figura 31 se muestran los resultados correspondientes al análisis del tejido hepático. No se detectaron alteraciones morfológicas en los hepatocitos, señales de fibrosis o congestión hepática que indiquen algún daño derivado de los distintos tratamientos. Se observa la organización clásica de lóbulos hepáticos, con cordones de hepatocitos dispuestos radialmente hacia una vena central y conectados a espacios porta conformados por vena porta, arteria hepática y conducto biliar. Los hepatocitos tienen núcleos centrales, algunos binucleados, y citoplasma eosinófilo. Entre los cordones se localizan sinusoides hepáticos con eritrocitos, células endoteliales y células de Kupffer.

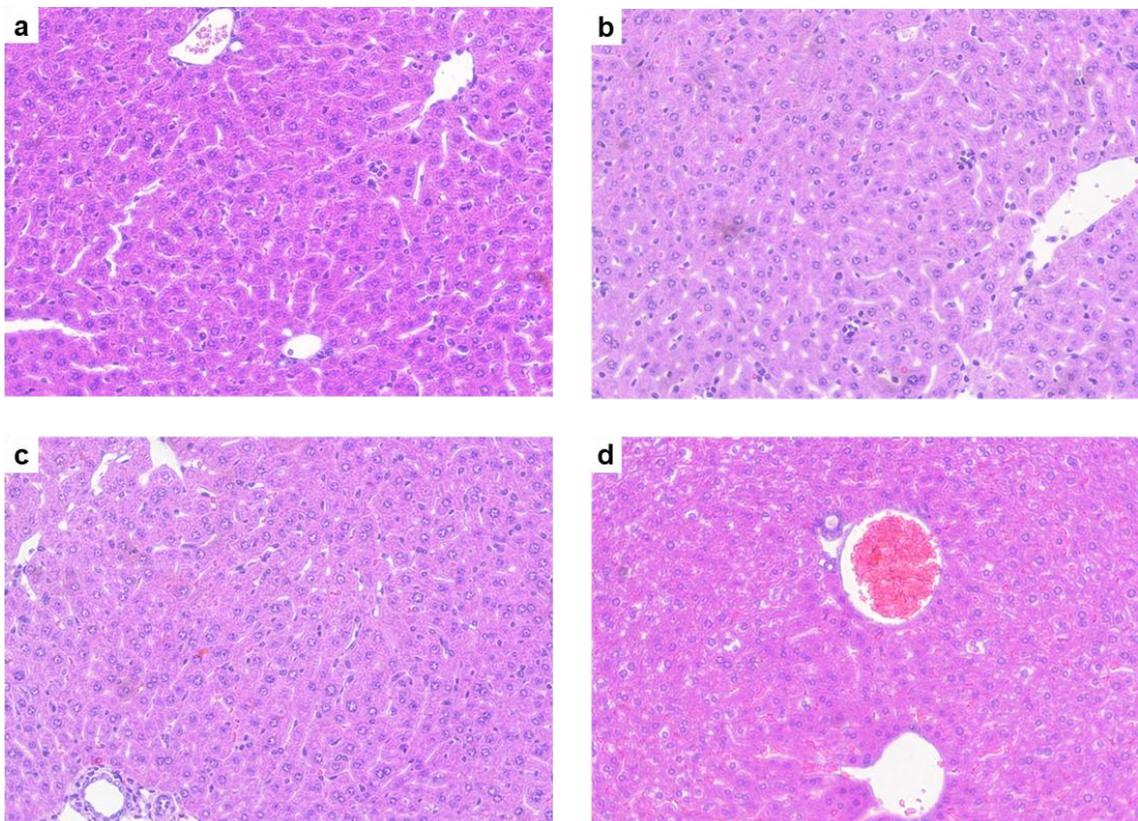


Figura 31. Micrografías representativas de tejido hepático del modelo *in vivo*. Las imágenes muestran los resultados de los grupos: a) control, b) erlotinib, c) KLAK-H y d)

NRPD-KLAK-H. No se detectaron alteraciones en la morfología de los hepatocitos, así como señales de fibrosis o congestión hepática por los distintos tratamientos. Tinción por hematoxilina y eosina. Magnificación 200X.

En la figura 32 se muestran los resultados correspondientes al análisis del tejido pulmonar. No se detectaron señales de infiltrado leucocitario en los tabiques y luz de los alveolos, ni colapso de dichas estructuras asociado a los distintos tratamientos. Se observan sacos alveolares formados por numerosos alveolos, delimitados por paredes delgadas de epitelio plano simple (neumocitos tipo I) y algunas células cúbicas (neumocitos tipo II) productoras de surfactante. En las paredes se identifican capilares alveolares con eritrocitos. También se distinguen bronquiolos respiratorios revestidos por epitelio cúbico simple que se continúa con epitelio plano en los conductos alveolares.

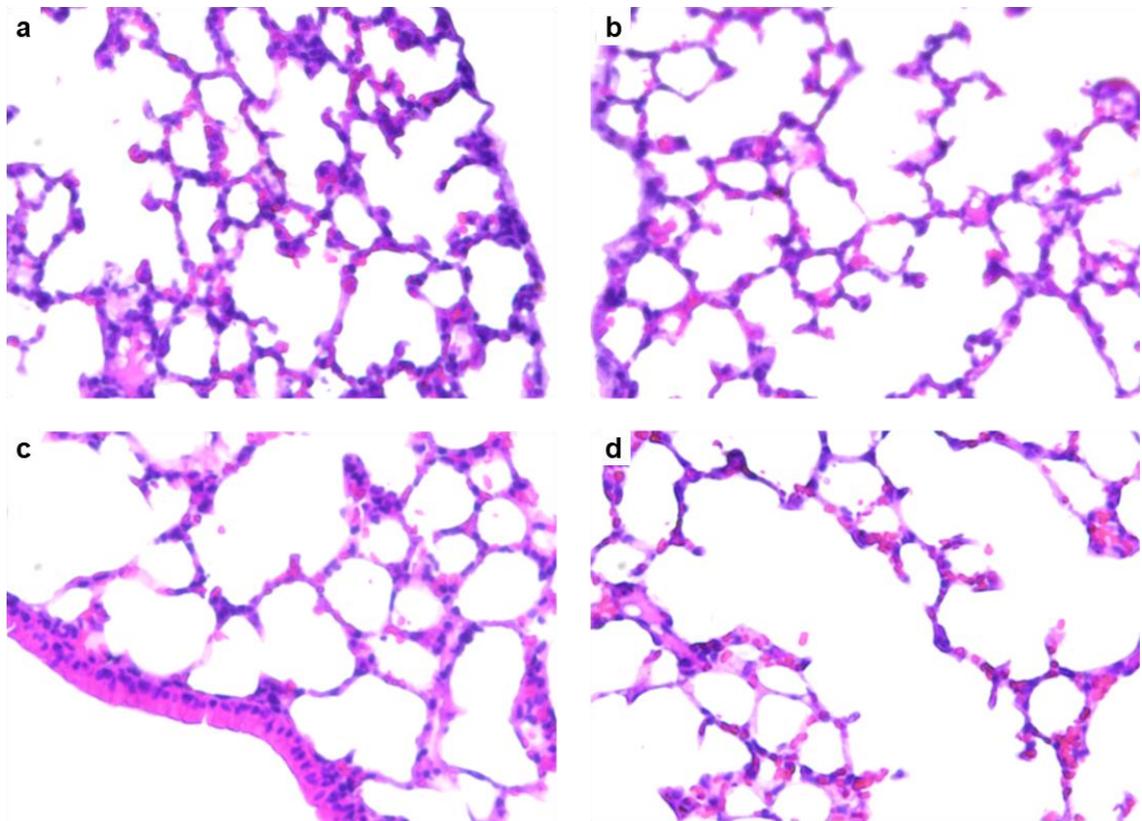


Figura 32. Micrografías representativas del tejido pulmonar del modelo *in vivo*. Las imágenes muestran los resultados de los grupos: a) control, b) erlotinib, c) KLAH-H y d) NRPD-KLAH-H. No se detectaron señales de infiltrado leucocitario en los tabiques y luz de los alveolos, ni daño de dichas estructuras por los distintos tratamientos. Tinción por hematoxilina y eosina. Magnificación 400X.

En la figura 33 se muestran los resultados correspondientes al análisis del tejido renal. No se detectaron alteraciones en el corpúsculo renal que puedan indicar un daño o lesión en el ovillo de vasos sanguíneos y sus componentes anexos por los distintos tratamientos. Se observa la región cortical con corpúsculos renales formados por un glomérulo rodeado por la cápsula de Bowman, que presenta polos vascular y urinario. A partir de este último

se originan los túbulos contorneados. Los túbulos proximales tienen epitelio cúbico simple con citoplasma eosinófilo y borde en cepillo, mientras que los distales muestran luz más amplia y carecen de micropliegues. Entre los túbulos se identifican capilares y venas, a menudo con eritrocitos.

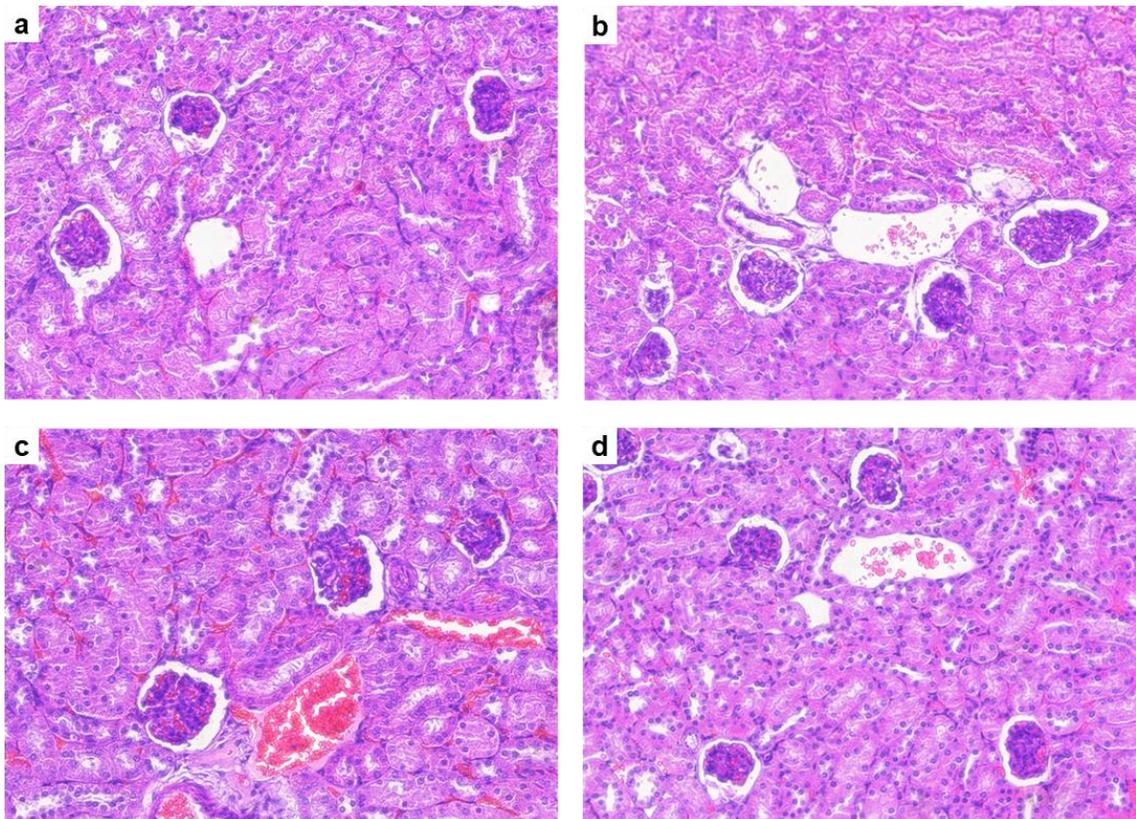


Figura 33. Micrografías representativas de la corteza renal del modelo *in vivo*. Las imágenes muestran los resultados de los grupos: a) control, b) erlotinib, c) KLAH-H y d) NRPD-KLAH-H. No se detectaron alteraciones que puedan indicar un daño o lesión por los distintos tratamientos. Tinción por hematoxilina y eosina. Magnificación 400X.

3.4. Evaluación biológica *ex vivo*

3.4.1. Evaluación del efecto de los péptidos KLAH-H y NRPH-KLAH-H en el modelo *ex vivo*

Debido a la escasa identificación de alteraciones asociadas al proceso de apoptosis en el modelo *in vivo*, se realizó un ensayo en un modelo *ex vivo* para favorecer una interacción prolongada de los tratamientos peptídicos con el tejido tumoral. En los resultados se observa una alteración en el balance de eucromatina y heterocromatina en las células que conforman la masa tumoral. En el control negativo se aprecia predominio de señales de eucromatina, mientras que en los tratamientos se evidencia un aumento de la basofilia nuclear asociado a la condensación de la cromatina. Como se muestra en la figura 34, se puede apreciar este cambio en la tinción nuclear, indicativo de modificaciones en el balance eucromatina/heterocromatina (señalado con flechas), en la mayoría de las células tratadas con KLAH-H y NRPH-KLAH-H, en contraste con lo observado en el control negativo.

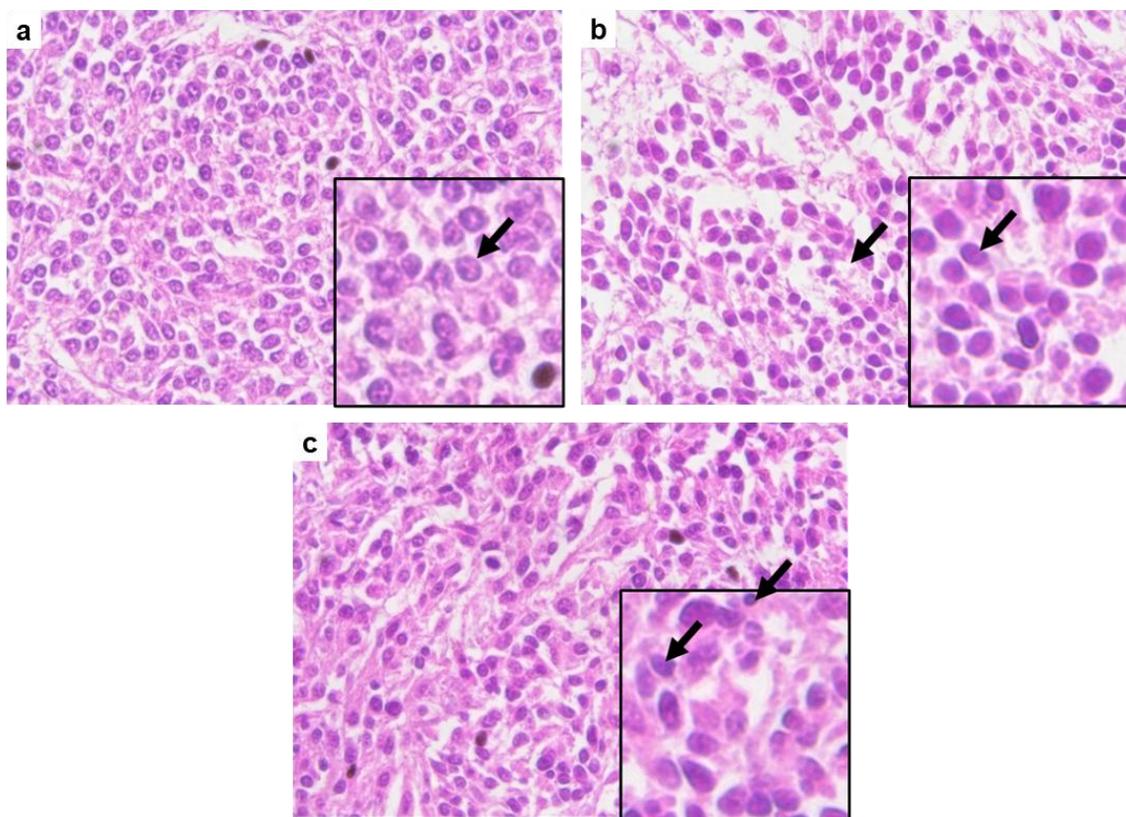


Figura 34. Micrografías representativas del análisis histopatológico de los tumores CT26 del modelo *ex vivo*. Las imágenes muestran los resultados correspondientes a: a) control, b) KLAH y c) NRPD-KLAH. Las flechas indican el balance de eucromatina/heterocromatina en el control negativo y la condensación de la cromatina en los tratamientos con KLAH y NRPD-KLAH. Tinción por hematoxilina y eosina. Magnificación 400X, Recuadros 800X.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

Recientemente, los péptidos proapoptóticos combinados con sistemas de liberación dirigida han cobrado relevancia como un enfoque prometedor para el tratamiento de cánceres resistentes a múltiples fármacos.^{121,122} En este proyecto, se propuso el péptido NRPDSAQFWLHH para dirigirse al receptor EGFR y facilitar la entrega selectiva de los péptidos proapoptóticos KLAK y CTMP4 con el objetivo de inhibir el crecimiento de células de cáncer EGFR-positivo.

Los cánceres EGFR-positivos suelen estar asociados con resistencia a los fármacos, y las terapias dirigidas actualmente disponibles con frecuencia provocan efectos adversos.^{15,18} Para abordar estos desafíos, se diseñaron los péptidos proapoptóticos NRPD-KLAK-H y NRPD-CTMP4-H dirigidos a EGFR, con el fin de mejorar la liberación intracelular de los péptidos. Basándonos en estudios previos que demostraron la internalización selectiva del péptido NRPDSAQFWLHH en la línea celular de carcinoma epidermoide A-431, EGFR-positivo,^{99,109} se esperaban efectos selectivos

similares en las líneas celulares A-549 y CT26, también EGFR-positivo. Sin embargo, los ensayos de citotoxicidad revelaron que, aunque NRPD-KLAK mostró cierto efecto anticancerígeno selectivo, evidenciado por una reducción significativa de la viabilidad celular en las líneas celulares A-549 y CT26, el péptido NRPD-KLAK-H presentó una mayor actividad citotóxica en todas las líneas celulares analizadas. Esto sugiere que la adición de la etiqueta de histidinas podría modificar la bioactividad del péptido. En contraste, NRPD-CTMP4-H no indujo efectos citotóxicos en ninguna de las líneas celulares evaluadas.

La ausencia de actividad citotóxica observada para NRPD-CTMP4-H podría deberse a una internalización deficiente del péptido NRPDSAQFWLHH o a una incompatibilidad en el diseño del péptido. Se ha reportado que CTMP4 ejerce efectos proapoptóticos tras su internalización en líneas celulares cancerosas con desregulación de Akt.⁵⁴ Para profundizar en este aspecto, se comparó el efecto de la expresión intracelular de CTMP4 mediante la transfección de células A-549, confirmando que CTMP4 puede inducir un efecto antiproliferativo en estas células (apéndice A). Por lo tanto, se infiere que tanto CTMP4 como NRPD-CTMP4-H no logran internalizarse en estas líneas celulares, lo que concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos de internalización por inmunomarcaje.

De manera interesante, los péptidos con etiqueta de histidinas, KLAK-H y NRPD-KLAK-H, exhibieron los mayores efectos citotóxicos entre todos los péptidos analizados, superando incluso a sus contrapartes sin etiqueta de histidinas. Ambos péptidos indujeron apoptosis de manera efectiva, en concordancia con estudios previos sobre el péptido proapoptótico KLAK.^{106,123,124} Cabe destacar que el péptido KLAK (sin etiqueta de

histidinas), por sí solo, tiene una capacidad de internalización deficiente y requiere la conjugación con un sistema de transporte para llegar a las mitocondrias,^{106,125} lo que explica la ausencia de efectos citotóxicos observados para KLAK en este estudio. Estos hallazgos confirman que los péptidos derivados de KLAK, con etiqueta de histidinas, lograron internalizarse en las líneas celulares evaluadas. Así, la adición de la etiqueta de histidinas no solo facilitó su detección por inmunomarcaje, sino que también pudo mejorar su captación celular. Esta observación concuerda con estudios previos que han demostrado que las secuencias cortas de poli-histidina pueden mejorar la internalización de péptidos de penetración celular (CPPs), debido a que el anillo de imidazol en la histidina tiene un pKa de aproximadamente 6.5. Esta propiedad permite que la histidina permanezca neutra en condiciones fisiológicas, pero se protona en ambientes ligeramente ácidos, como los cultivos celulares de cáncer y el microambiente tumoral, favoreciendo la captación celular de péptidos ricos en histidina.^{126,127}

En el caso específico del péptido NRPD-KLAK-H, que no mostró internalización en las células CT26, se plantea la hipótesis de que se podría requerir un tiempo de tratamiento más prolongado para lograr una internalización efectiva, dado que su actividad citotóxica fue evidente en los ensayos de MTT. Adicionalmente, los resultados presentados en este trabajo permiten cuestionar la selectividad del péptido NRPDSAQFWLHH reportado por el grupo de Gan y colaboradores,^{99,109} pues es posible que este no sea dependiente de EGFR, sino que exista algún otro factor que permita su internalización en la línea celular A-431 particularmente.

La evaluación del efecto antitumoral *in vivo* de los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H no mostró resultados esperados en la reducción del volumen tumoral con respecto al

control. Otros estudios presentan resultados favorables en la reducción del tamaño tumoral en modelos de ratones Balb/c con implante de células CT26 al ser tratados con el péptido KLAKE acoplado con nanopartículas y en combinación con quimioterapia e inmunoterapia.^{128,129} En estos casos, el empleo de terapias combinadas, así como el aumento en la frecuencia de administración de dosis de péptido mejora sustancialmente el efecto antitumoral de los tratamientos a nivel macroscópico. No obstante, los resultados del análisis histopatológico de los tumores tratados con los péptidos KLAKE-H y NRPE-KLAKE-H en este modelo mostraron escasas alteraciones estructurales asociadas al proceso de apoptosis. Esta baja actividad antitumoral se atribuye a una de las principales limitaciones de los péptidos proapoptóticos: la dispersión del tratamiento tras su administración, lo que probablemente redujo su captación por las células tumorales.^{130,131} Cabe destacar que la literatura disponible sobre el modelo de tumor subcutáneo CT26 en ratones Balb/c presenta una notable variabilidad tanto en el número de células implantadas (que varía desde 1×10^5 hasta 1×10^6 células en 100 μ L) como en la velocidad de crecimiento tumoral.^{114,115,132,133} Esta falta de estandarización en las condiciones de establecimiento del modelo representa una limitante para la comparación de resultados entre estudios y pudo haber influido en la respuesta observada a los tratamientos evaluados en este trabajo.

Los explantes tumorales constituyen una herramienta valiosa para el estudio de la complejidad celular de la masa tumoral, donde coexisten células tumorales, células estromales del hospedero y vasos sanguíneos. El empleo de estos cultivos *ex vivo* permite evaluar de manera más precisa el efecto de los fármacos sobre los distintos tipos celulares que integran el tumor.^{117,118} En este estudio, los resultados obtenidos en el modelo *ex vivo*

demostraron que los péptidos KLAK-H y NRPD-KLAK-H ejercen un efecto superior respecto al modelo *in vivo*, evidenciado por una marcada alteración en el balance de eucromatina y heterocromatina en las células tratadas, atribuible a su acumulación directa en los tejidos tumorales. Este hallazgo sugiere que una interacción prolongada de los péptidos con el tejido favorece su efecto citotóxico, lo que podría respaldar su aplicación en esquemas de administración sostenida para potenciar su actividad antitumoral en estudios posteriores.¹¹⁶

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- Los péptidos NRPD-H, CTMP4-H y NRPD-CTMP4-H no indujeron citotoxicidad en las líneas celulares evaluadas.
- Los péptidos KLAH-H y NRPD-KLAH-H obtenidos, presentaron citotoxicidad sobre las líneas celulares tratadas, siendo A-549 y CT26 las más susceptibles.
- Los péptidos KLAH-H y NRPD-KLAH-H fueron capaces de inducir apoptosis en todas las líneas celulares probadas.
- Los péptidos KLAH-H y NRPD-KLAH-H mostraron la mejor capacidad de internalización celular en comparación con los demás péptidos del estudio.
- La adición de una etiqueta de histidinas a la secuencia de los péptidos derivados de KLAH, otorga o mejora la capacidad de internalización celular.
- Los tratamientos con los péptidos KLAH-H y NRPD-KLAH-H no redujeron el volumen tumoral en el modelo *in vivo*.
- Los tumores presentaron alteraciones histopatológicas asociadas al proceso de apoptosis en respuesta a los tratamientos con KLAH-H y NRPD-KLAH-H.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

Con el objetivo de complementar la información obtenida en este proyecto, se considera importante la evaluación de los péptidos proapoptóticos en más líneas celulares con y sin sobreexpresión de EGFR, incluyendo la línea celular A-431, y así tratar de caracterizar el mecanismo de selectividad del péptido NRPDSAQFWLHH.

Además, se propone la realización de diversos ensayos para la evaluación biológica *in vitro* como la caracterización de los mecanismos de internalización e inducción de apoptosis, así como la determinación del efecto de los péptidos sobre la migración e invasión de células cancerosas. En cuanto a los ensayos *in vivo*, se propone estandarizar las condiciones del tratamiento en el modelo murino e incorporar grupos para terapia combinada con quimioterapia convencional e inmunoterapia.

REFERENCIAS

1. Catherine Sánchez N. Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2013;24(4):553-562. doi:10.1016/s0716-8640(13)70659-x
2. Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer. 2024. Accessed June 21, 2025. <https://gco.iarc.who.int/today>
3. Hanahan D, Weinberg RA. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
4. Ju YS, Alexandrov LB, Gerstung M, et al. Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer. Published online 2014:1-28. doi:10.7554/eLife.02935
5. Spector NL, Blackwell KL. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Understanding the Mechanisms Behind Trastuzumab Therapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 – Positive Breast Cancer. 2014;27(34). doi:10.1200/JCO.2009.22.1507.A
6. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, et al. Mechanisms of Tamoxifen Resistance : Increased Estrogen Receptor-HER2 / neu Cross-Talk in ER / HER2 – Positive Breast Cancer. 2004;96(12). doi:10.1093/jnci/djh166
7. Lin KH, Hong ST, Wang HT, Lo YL, Lin AMY, Yang JCH. Enhancing anticancer effect of gefitinib across the blood-brain barrier model using liposomes modified with

- one α -helical cell-penetrating peptide or glutathione and Tween 80. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):1-17. doi:10.3390/ijms17121998
8. Weinstein IB. The Origins of Human Cancer: Molecular Mechanisms of Carcinogenesis and Their Implications for Cancer Prevention and Treatmentâ € ” Twenty-seventh G . H . A . Clowes Memorial Award Lecture1. Published online 1988.
 9. Berdasco M, Esteller M. Aberrant Epigenetic Landscape in Cancer: How Cellular Identity Goes Awry. *Dev Cell*. 2010;19(5). doi:10.1016/j.devcel.2010.10.005
 10. Zanetti-Domingues LC, Bonner SE, Martin-Fernandez ML, Huber V. Mechanisms of Action of EGFR Tyrosine Kinase Receptor Incorporated in Extracellular Vesicles. *Cells*. 2020;9(11). doi:10.3390/cells9112505
 11. Lemmon MA, Schlessinger J, Ferguson KM. The EGFR family: Not so prototypical receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(4). doi:10.1101/cshperspect.a020768
 12. Kim YS, Kim JS, Kim YS. EGFR and HER2 Expression in Papillary Thyroid Carcinoma. *Journal of Endocrine Surgery*. 2018;18(4):228. doi:10.16956/jes.2018.18.4.228
 13. Sabbah DA, Hajjo R, Sweidan K. Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors. *Curr Top Med Chem*. 2020;20(10):815-834. doi:10.2174/1568026620666200303123102
 14. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the <sc>EGFR</sc> in cancer. *Mol Oncol*. 2018;12(1):3-20. doi:10.1002/1878-0261.12155

15. Frattini M, Saletti P, Molinari F, De Dosso S. EGFR signaling in colorectal cancer: a clinical perspective. *Gastrointest Cancer*. Published online 2015. doi:10.2147/gicct.s49002
16. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: Mechanisms and advances in clinical trials 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology. *Mol Cancer*. 2019;18(1):1-28.
17. Ladanyi M, Pao W. Lung adenocarcinoma: Guiding EGFR-targeted therapy and beyond. *Modern Pathology*. 2008;21. doi:10.1038/modpathol.3801018
18. Antonicelli A, Cafarotti S, Indini A, et al. Egfr-targeted therapy for non-small cell lung cancer: Focus on EGFR oncogenic mutation. *Int J Med Sci*. 2013;10(3). doi:10.7150/ijms.4609
19. Ciardiello F, Tortora G. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: Understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs. *Eur J Cancer*. 2003;39(10). doi:10.1016/S0959-8049(03)00235-1
20. Al Olayan A, Al Hussaini H, Jazieh AR, et al. The roles of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors in the management of lung cancer. *J Infect Public Health*. 2021;5(5). doi:10.1016/j.jiph.2012.09.004
21. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(21). doi:10.1056/nejmoa040938

22. Grapa CM, Mocan T, Gonciar D, et al. Epidermal growth factor receptor and its role in pancreatic cancer treatment mediated by nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2019;14. doi:10.2147/IJN.S226628
23. Oliveira-Cunha M, Newman WG, Siriwardena AK. Epidermal growth factor receptor in pancreatic cancer. *Cancers (Basel)*. 2011;3(2). doi:10.3390/cancers3021513
24. Ma X, Liu X, Ou K, Zhang M, Gao L, Yang L. Advanced pancreatic cancer with KRAS wild-type and EGFR-sensitive mutation respond favorably to furmonertinib: A case report. *Front Oncol*. 2023;13. doi:10.3389/fonc.2023.1151178
25. Kim MA, Lee HS, Lee HE, Jeon YK, Yang HK, Kim WH. EGFR in gastric carcinomas: Prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number. *Histopathology*. 2008;52(6). doi:10.1111/j.1365-2559.2008.03021.x
26. Dulak AM, Schumacher SE, Van Lieshout J, et al. Gastrointestinal adenocarcinomas of the esophagus, stomach, and colon exhibit distinct patterns of genome instability and oncogenesis. *Cancer Res*. 2012;72(17). doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3893
27. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(15). doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-3045
28. Nastały P, Stoupiec S, Popęda M, et al. EGFR as a stable marker of prostate cancer dissemination to bones. *Br J Cancer*. 2020;123(12). doi:10.1038/s41416-020-01052-

29. hashmi AA, Hashmi SK, Irfan M, et al. Prognostic utility of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in prostatic acinar adenocarcinoma. *Applied Cancer Research*. 2019;39(1). doi:10.1186/s41241-018-0069-5
30. Oprita A, Baloi SC, Staicu GA, et al. Updated insights on EGFR signaling pathways in glioma. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2). doi:10.3390/ijms22020587
31. Tripathy K, Das B, Singh AK, Misra A, Misra S, Misra SS. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in patients of glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2017;11(8). doi:10.7860/JCDR/2017/30138.10327
32. Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. Epidermal growth factor receptor in glioma: Signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance1. *Neoplasia*. 2010;12(9). doi:10.1593/neo.10688
33. Chong CR, Jänne PA. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nat Med*. 2013;19(11). doi:10.1038/nm.3388
34. Absenger G. Resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in mutated non-small cell lung cancer: new avenues and strategies to overcome resistance. *Memo - Magazine of European Medical Oncology*. 2019;12(2). doi:10.1007/s12254-019-0488-3
35. Deaconess BI, Program CB, Israel B, Medical D. New insights into tumor suppression : PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase $\bar{\text{A}}\text{KT}$ pathway. 1999;96(April):4240-4245.

36. Aziz SA, Davies M, Pick E, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase as a therapeutic target in melanoma. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(9). doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2768
37. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-Kinase: Implications for development, immunity, homeostasis, and cancer. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Vol 17. 2001. doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.615
38. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*. 2006;7(8). doi:10.1038/nrg1879
39. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: Mechanisms and advances in clinical trials 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology. *Mol Cancer*. 2019;18(1):1-28.
40. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(12). doi:10.1038/nrd1902
41. Gao T, Furnari F, Newton AC. PHLPP: A phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell*. 2005;18(1). doi:10.1016/j.molcel.2005.03.008
42. Wang J, Fry CME, Walker CL. Carboxyl-terminal modulator protein regulates Akt signaling during skeletal muscle atrophy in vitro and a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep*. 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-40553-2

43. Dillon L, Miller T. Therapeutic Targeting of Cancers with Loss of PTEN Function. *Curr Drug Targets*. 2014;15(1). doi:10.2174/1389450114666140106100909
44. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: Variations on a theme. *Oncogene*. 2008;27(41). doi:10.1038/onc.2008.245
45. Dillon RL, White DE, Muller WJ. The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: Implications for human breast cancer. *Oncogene*. 2007;26(9). doi:10.1038/sj.onc.1210202
46. Roth KG, Mambetsariev I, Kulkarni P, Salgia R. The Mitochondrion as an Emerging Therapeutic Target in Cancer. *Trends Mol Med*. 2020;26(1). doi:10.1016/j.molmed.2019.06.009
47. Greer YE, Porat-Shliom N, Nagashima K, et al. ONC201 kills breast cancer cells in vitro by targeting mitochondria. *Oncotarget*. 2018;9(26). doi:10.18632/oncotarget.24862
48. Lim SC, Carey KT, McKenzie M. Anti-cancer analogues ME-143 and ME-344 exert toxicity by directly inhibiting mitochondrial NADH: Ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *Am J Cancer Res*. 2015;5(2).
49. Alvero AB, Montagna MK, Holmberg JC, Craveiro V, Brown D, Mor G. Targeting the mitochondria activates two independent cell death pathways in ovarian cancer stem cells. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(8). doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0023
50. Li CM, Haratipour P, Lingeman RG, et al. Novel Peptide Therapeutic Approaches for Cancer Treatment. *Cells*. 2021;10(11):2908. doi:10.3390/cells10112908

51. Marqus S, Pirogova E, Piva TJ. Evaluation of the use of therapeutic peptides for cancer treatment. *J Biomed Sci.* 2017;24(1):21. doi:10.1186/s12929-017-0328-x
52. Min KA, Maharjan P, Ham S, Shin MC. Pro-apoptotic peptides-based cancer therapies: challenges and strategies to enhance therapeutic efficacy. *Arch Pharm Res.* 2018;41(6):594-616. doi:10.1007/s12272-018-1038-y
53. Javadpour MM, Juban MM, Lo WCJ, et al. De Novo Antimicrobial Peptides with Low Mammalian Cell Toxicity. *J Med Chem.* 1996;39(16):3107-3113. doi:10.1021/jm9509410
54. Simon PO, McDunn JE, Kashiwagi H, et al. Targeting AKT with the proapoptotic peptide, TAT-CTMP: A novel strategy for the treatment of human pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2009;125(4):942-951. doi:10.1002/ijc.24424
55. Hasegawa M, Sinha RK, Kumar M, et al. Intracellular targeting of the oncogenic MUC1-C protein with a novel GO-203 nanoparticle formulation. *Clinical Cancer Research.* 2015;21(10). doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3000
56. Yoshimori A, Takasawa R, Hayakawa A, Mizuno M, Yoshida J, Tanuma S. Structure-based design of an agonistic peptide targeting Fas. *Apoptosis.* 2005;10(2). doi:10.1007/s10495-005-0806-6
57. Prezma T, Shteinfer A, Admoni L, et al. VDAC1-based peptides: Novel pro-apoptotic agents and potential therapeutics for B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cell Death Dis.* 2013;4(9). doi:10.1038/cddis.2013.316

58. Kim AL, Raffo AJ, Brandt-Rauf PW, et al. Conformational and molecular basis for induction of apoptosis by a p53 C-terminal peptide in human cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(49). doi:10.1074/jbc.274.49.34924
59. Jiang Y, Yang N, Zhang H, et al. Enhanced in vivo antitumor efficacy of dual-functional peptide-modified docetaxel nanoparticles through tumor targeting and Hsp90 inhibition. *Journal of Controlled Release*. 2016;221. doi:10.1016/j.jconrel.2015.11.029
60. Kumar M, Gupta D, Singh G, et al. Novel polymeric nanoparticles for intracellular delivery of peptide cargos: Antitumor efficacy of the BCL-2 conversion peptide NuBCP-9. *Cancer Res*. 2014;74(12). doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2015
61. Wu D, Gao Y, Qi Y, Chen L, Ma Y, Li Y. Peptide-based cancer therapy: Opportunity and challenge. *Cancer Lett*. 2014;351(1). doi:10.1016/j.canlet.2014.05.002
62. Yingchoncharoen P, Kalinowski DS, Richardson DR. Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: What Is Available and What Is Yet to Come. *Pharmacol Rev*. 2016;68(3):701-787. doi:10.1124/pr.115.012070
63. Seidu TA, Kutoka PT, Asante DO, Farooq MA, Alolga RN, Bo W. Functionalization of Nanoparticulate Drug Delivery Systems and Its Influence in Cancer Therapy. *Pharmaceutics*. 2022;14(5):1113. doi:10.3390/pharmaceutics14051113
64. Dinca A, Chien W ming, Chin MT. Intracellular Delivery of Proteins with Cell-Penetrating Peptides for Therapeutic Uses in Human Disease. Published online 2016. doi:10.3390/ijms17020263

65. King A, Ndifon C, Lui S, et al. Tumor-homing peptides as tools for targeted delivery of payloads to the placenta. 2016;(May).
66. González-Cruz AO, Hernández-Juárez J, Ramírez-Cabrera MA, Balderas-Rentería I, Arredondo-Espinoza E. Peptide-based drug-delivery systems: A new hope for improving cancer therapy. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2022;72:103362. doi:10.1016/j.jddst.2022.103362
67. Zhu YS, Tang K, Lv J. Peptide–drug conjugate-based novel molecular drug delivery system in cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2021;42(10):857-869. doi:10.1016/j.tips.2021.07.001
68. Lindgren M, Hällbrink M, Prochiantz A, Langel Ü. Cell-penetrating peptides. 2000;21(March):99-103.
69. Morshed RA, Muroski ME, Dai Q, et al. Cell-Penetrating Peptide-Modified Gold Nanoparticles for the Delivery of Doxorubicin to Brain Metastatic Breast Cancer. *Mol Pharm.* 2016;13(6):1843-1854. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00004
70. Duan Z, Chen C, Qin J, et al. Cell-penetrating peptide conjugates to enhance the antitumor effect of paclitaxel on drug-resistant lung cancer. *Drug Deliv.* 2017;24(1):752-764. doi:10.1080/10717544.2017.1321060
71. Soler M, González-Bártulos M, Figueras E, et al. Delivering aminopyridine ligands into cancer cells through conjugation to the cell-penetrating peptide BP16. *Org Biomol Chem.* 2016;14(17):4061-4070. doi:10.1039/c6ob00470a

72. Carnevale KJF, Muroski ME, Vakil PN, et al. Selective Uptake into Drug Resistant Mammalian Cancer by Cell Penetrating Peptide-Mediated Delivery. *Bioconjug Chem.* 2018;29(10):3273-3284. doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00429
73. Langel Ü. *CPP, Cell-Penetrating Peptides.*; 2019. doi:10.1007/978-981-13-8747-0
74. Milletti F. Cell-penetrating peptides: Classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today.* 2012;17(15-16):850-860. doi:10.1016/j.drudis.2012.03.002
75. Nischan N, Herce HD, Natale F, et al. Angewandte Covalent Attachment of Cyclic TAT Peptides to GFP Results in Protein Delivery into Live Cells with Immediate Bioavailability **. 2015;12180:1950-1953. doi:10.1002/anie.201410006
76. Herce HD, Garcia AE, Litt J, et al. Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides. *Biophys J.* 2009;97(7):1917-1925. doi:10.1016/j.bpj.2009.05.066
77. Xiang B, Jia XL, Qi JL, et al. Enhancing siRNA-based cancer therapy using a new pH-responsive activatable cell-penetrating peptide-modified liposomal system. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:2385-2405. doi:10.2147/IJN.S129574
78. Ye J, Pei X, Cui H, et al. Cellular uptake mechanism and comparative in vitro cytotoxicity studies of monomeric LMWP-siRNA conjugate. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry.* 2018;63:103-111. doi:10.1016/j.jiec.2018.02.005
79. Gronewold A, Horn M, Randelović I, et al. Characterization of a Cell-Penetrating Peptide with Potential Anticancer Activity. *ChemMedChem.* 2017;12(1):42-49. doi:10.1002/cmdc.201600498

80. Almarwani B, Phambu EN, Alexander C, Nguyen HAT, Phambu N, Sunda-Meya A. Vesicles mimicking normal and cancer cell membranes exhibit differential responses to the cell-penetrating peptide Pep-1. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2018;1860(6):1394-1402. doi:10.1016/j.bbamem.2018.03.022
81. Zhang X, Lin C, Lu A, et al. Liposomes equipped with cell penetrating peptide BR2 enhances chemotherapeutic effects of cantharidin against hepatocellular carcinoma. *Drug Deliv.* 2017;24(1):986-998. doi:10.1080/10717544.2017.1340361
82. Gomez JA, Gama V, Yoshida T, et al. Bax-inhibiting peptides derived from Ku70 and cell-penetrating pentapeptides. In: *Biochemical Society Transactions.* Vol 35. 2007. doi:10.1042/BST0350797
83. Langel Ü. Cell-penetrating peptides: Methods and protocols. *Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols.* 2015;1324:1-468. doi:10.1007/978-1-4939-2806-4
84. Ablan FDO, Spaller BL, Abdo KI, Almeida PF. Charge Distribution Fine-Tunes the Translocation of α -Helical Amphipathic Peptides across Membranes. *Biophys J.* 2016;111(8). doi:10.1016/j.bpj.2016.08.047
85. Langel Ü. *CPP, Cell-Penetrating Peptides.*; 2019. doi:10.1007/978-981-13-8747-0
86. Sharma A, Kapoor P, Gautam A, et al. Computational approach for designing tumor homing peptides. *Sci Rep.* 2013;3(Figure 1):1-7. doi:10.1038/srep01607
87. Yin R, Guo L, Zhang J, et al. RGD and polyhistidine tumor homing peptides potentiates the action of human Maspin as an antineoplastic candidate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(14):6209-6218. doi:10.1007/s00253-016-7345-7

88. Plesniak LA, Salzameda B, Hinderberger H, et al. Structure and activity of CPNGRC: A modified CD13/APN peptidic homing motif. *Chem Biol Drug Des.* 2010;75(6):551-562. doi:10.1111/j.1747-0285.2010.00974.x
89. Nguyen LT, Yang XZ, Du X, et al. Enhancing tumor-specific intracellular delivering efficiency of cell-penetrating peptide by fusion with a peptide targeting to EGFR. *Amino Acids.* 2015;47(5). doi:10.1007/s00726-015-1928-y
90. Bondarev N, Ivanenko K, Khabusheva E, Lebedev T, Manukhov I, Prassolov V. MGL S3 Chimeric Enzyme Drives Apoptotic Death of EGFR-Dependent Cancer Cells through ERK Downregulation. *Int J Mol Sci.* 2022;23(21). doi:10.3390/ijms232112807
91. Gong C, Pan D, Qiu F, Sun P, Zhang YH. Selective DNA delivery to tumor cells using an oligoarginine-LTVSPWY peptide. *PLoS One.* 2014;9(10). doi:10.1371/journal.pone.0110632
92. Biabani Ardakani J, Akhlaghi M, Nikkholgh B, Hosseinimehr SJ. Targeting and imaging of HER2 overexpression tumor with a new peptide-based ⁶⁸Ga-PET radiotracer. *Bioorg Chem.* 2021;106. doi:10.1016/j.bioorg.2020.104474
93. Capasso D, de Paola I, Liguoro A, et al. RGDechi-hCit: $\alpha v\beta 3$ Selective Pro-Apoptotic Peptide as Potential Carrier for Drug Delivery into Melanoma Metastatic Cells. *PLoS One.* 2014;9(9):e106441. doi:10.1371/journal.pone.0106441
94. Li HM, Dong ZP, Wang QY, et al. De Novo Computational Design for Development of a Peptide Ligand Oriented to VEGFR-3 with High Affinity and Long Circulation. *Mol Pharm.* 2017;14(7). doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00070

95. Ceren A, Erkoc P, Kizilel S. Targeting Cancer Cells Via Tumor-Homing Peptide Creka Conjugated Peg Hydrogel Nanoparticles Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Targeting cancer cells via tumor-homing peptide CREKA functional PEG nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;147(November):191-200. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.08.005
96. Kinsella JM, Jimenez RE, Karmali PP, et al. X-ray computed tomography imaging of breast cancer by using targeted peptide-labeled bismuth sulfide nanoparticles. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2011;50(51). doi:10.1002/anie.201104507
97. Kondo E, Saito K, Tashiro Y, et al. Tumour lineage-homing cell-penetrating peptides as anticancer molecular delivery systems. *Nat Commun*. 2012;3. doi:10.1038/ncomms1952
98. Maity SK, Stahl P, Hensel A, Knauer S, Hirschhäuser C, Schmuck C. Cancer-Cell-Specific Drug Delivery by a Tumor-Homing CPP-Gossypol Conjugate Employing a Tracelessly Cleavable Linker. *Chemistry - A European Journal*. 2020;26(14). doi:10.1002/chem.201905159
99. Gan BK, Yong CY, Ho KL, Omar AR, Alitheen NB, Tan WS. Targeted Delivery of Cell Penetrating Peptide Virus-like Nanoparticles to Skin Cancer Cells. *Sci Rep*. 2018;8(1):8499. doi:10.1038/s41598-018-26749-y
100. Woldetsadik AD, Vogel MC, Rabeh WM, Magzoub M. Hexokinase II-derived cell-penetrating peptide targets mitochondria and triggers apoptosis in cancer cells. *FASEB Journal*. 2017;31(5). doi:10.1096/fj.201601173R

101. Gao H, Yang Z, Zhang S, et al. Glioma-homing peptide with a cell-penetrating effect for targeting delivery with enhanced glioma localization, penetration and suppression of glioma growth. *Journal of Controlled Release*. 2013;172(3):921-928. doi:10.1016/j.jconrel.2013.10.002
102. Lin C, Zhang X, Chen H, et al. Dual-ligand modified liposomes provide effective local targeted delivery of lung-cancer drug by antibody and tumor lineage-homing cell-penetrating peptide. *Drug Deliv*. 2018;25(1). doi:10.1080/10717544.2018.1425777
103. Wang D, Chen L, Wang M, et al. Delivering Proapoptotic Peptide by HSP Nanocage for Cancer Therapy. *Macromol Chem Phys*. 2020;221(12):2000003. doi:10.1002/macp.202000003
104. Qiao ZY, Hou CY, Zhang D, et al. Self-assembly of cytotoxic peptide conjugated poly(β -amino ester)s for synergistic cancer chemotherapy. *J Mater Chem B*. 2015;3(15). doi:10.1039/c4tb02144d
105. Sun Y, Li J, Sun Y, et al. A Stable Pep2-proapoptotic Peptide Inducing Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Cells by Down-Regulating EZH2. *Cell Mol Bioeng*. 2020;13(2):165-177. doi:10.1007/s12195-019-00605-z
106. Sarangthem V, Yi A, Kim Y, et al. Therapeutic Effect of IL-4 Receptor-Targeting Pro-Apoptotic Peptide (AP1-ELP-KLAK) in Glioblastoma Tumor Model. *Int J Nanomedicine*. 2021;Volume 16:5039-5052. doi:10.2147/IJN.S316388
107. Spitzer D, Simon PO, Kashiwagi H, et al. Use of Multifunctional Sigma-2 Receptor Ligand Conjugates to Trigger Cancer-Selective Cell Death Signaling. *Cancer Res*. 2012;72(1):201-209. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1354

108. Jin W, Qin B, Chen Z, Liu H, Barve A, Cheng K. Discovery of PSMA-specific peptide ligands for targeted drug delivery. *Int J Pharm.* 2016;513(1-2):138-147. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.08.048
109. Gan BK, Rullah K, Yong CY, et al. Targeted delivery of 5-fluorouracil-1-acetic acid (5-FA) to cancer cells overexpressing epithelial growth factor receptor (EGFR) using virus-like nanoparticles. *Sci Rep.* 2020;10(1). doi:10.1038/s41598-020-73967-4
110. Hyun S, Lee S, Kim S, Jang S, Yu J, Lee Y. Apoptosis Inducing, Conformationally Constrained, Dimeric Peptide Analogs of KLA with Submicromolar Cell Penetrating Abilities. *Biomacromolecules.* 2014;15(10):3746-3752. doi:10.1021/bm501026e
111. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2). doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
112. Liu J, Xu Y, Wu Q, Ding Q, Fan W. Sirtuin-1 protects hair follicle stem cells from TNF α -mediated inflammatory stress via activating the MAPK-ERK-Mfn2 pathway. *Life Sci.* 2018;212. doi:10.1016/j.lfs.2018.10.003
113. Wang B, Liu F, Liu Z, et al. Internalization of the TAT-PBX1 fusion protein significantly enhances the proliferation of human hair follicle-derived mesenchymal stem cells and delays their senescence. *Biotechnol Lett.* 2020;42(10):1877-1885. doi:10.1007/s10529-020-02909-x
114. Gong JE, Jin YJ, Kim JE, et al. Comparison of cisplatin-induced anti-tumor response in CT26 syngeneic tumors of three BALB/c substrains. *Lab Anim Res.* 2021;37(1). doi:10.1186/s42826-021-00110-3

115. Shindo Y, Yoshimura K, Kuramasu A, et al. Combination immunotherapy with 4-1BB activation and PD-1 blockade enhances antitumor efficacy in a mouse model of subcutaneous tumor. *Anticancer Res.* 2015;35(1).
116. Majumder B, Baraneedharan U, Thiyagarajan S, et al. Predicting clinical response to anticancer drugs using an ex vivo platform that captures tumour heterogeneity. *Nat Commun.* 2015;6. doi:10.1038/ncomms7169
117. Capala ME, Pachler KS, Lauwers I, et al. Ex Vivo Functional Assay for Evaluating Treatment Response in Tumor Tissue of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2023;15(2). doi:10.3390/cancers15020478
118. Sarafraz-Yazdi E, Gorelick C, Wagreich AR, et al. Ex vivo efficacy of anti-cancer drug PNC-27 in the treatment of patient-derived epithelial ovarian cancer. *Ann Clin Lab Sci.* 2015;45(6).
119. Pang HB, Braun GB, She ZG, et al. A free cysteine prolongs the half-life of a homing peptide and improves its tumor-penetrating activity. *Journal of Controlled Release.* 2014;175(1):48-53. doi:10.1016/j.jconrel.2013.12.006
120. Lee HJ, Huang YW, Chiou SH, Aronstam RS. Polyhistidine facilitates direct membrane translocation of cell-penetrating peptides into cells. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-11. doi:10.1038/s41598-019-45830-8
121. Kim J, Shim MK, Moon Y, et al. Cancer cell-specific and pro-apoptotic SMAC peptide-doxorubicin conjugated prodrug encapsulated aposomes for synergistic cancer immunotherapy. *J Nanobiotechnology.* 2024;22(1). doi:10.1186/s12951-024-02314-w

122. Lacroix A, Farhat R, Robert A, Brenner C, Wiels J, Germini D. The first-in-class pro-apoptotic peptide PEP-010 is effective in monotherapy and in combination with paclitaxel on resistant ovarian adenocarcinoma cell models. *Front Pharmacol.* 2024;15. doi:10.3389/fphar.2024.1444973
123. Hu C, Chen X, Huang Y, Chen Y. Synergistic effect of the pro-apoptosis peptide klat-TAT and the cationic anticancer peptide HPRP-A1. *Apoptosis.* 2018;23(2). doi:10.1007/s10495-018-1443-1
124. Iwasaki T, Tokuda Y, Kotake A, et al. Cellular uptake and in vivo distribution of polyhistidine peptides. *Journal of Controlled Release.* 2015;210. doi:10.1016/j.jconrel.2015.05.268
125. Kim HY, Kim S, Youn H, Chung JK, Shin DH, Lee K. The cell penetrating ability of the proapoptotic peptide, KLAKLAKKLAKLAK fused to the N-terminal protein transduction domain of translationally controlled tumor protein, MIIYRDLISH. *Biomaterials.* 2011;32(22). doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.074
126. Xiang B, Jia XL, Qi JL, et al. Enhancing siRNA-based cancer therapy using a new pH-responsive activatable cell-penetrating peptide-modified liposomal system. *Int J Nanomedicine.* 2017;Volume 12:2385-2405. doi:10.2147/IJN.S129574
127. Yao J, Ma Y, Zhang W, et al. Design of new acid-activated cellpenetrating peptides for tumor drug delivery. *PeerJ.* 2017;2017(6). doi:10.7717/peerj.3429
128. Obeid M. Anticancer activity of targeted proapoptotic peptides and chemotherapy is highly improved by targeted cell surface calreticulin-inducer peptides. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(9). doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0228

129. Martins F, Stalder G, Obeid M. Generating the Abscopal Effect by Combining Proapoptotic Peptides With IL-12-Based Immunotherapy. *Neoplasia (United States)*. 2018;20(2). doi:10.1016/j.neo.2017.11.009
130. Priwitaningrum DL, Jentsch J, Bansal R, et al. Apoptosis-inducing peptide loaded in PLGA nanoparticles induces anti-tumor effects in vivo. *Int J Pharm*. 2020;585. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119535
131. Li H, E. Nelson C, C. Evans B, L. Duvall C. Delivery of Intracellular-Acting Biologics in Pro-Apoptotic Therapies. *Curr Pharm Des*. 2011;17(3). doi:10.2174/138161211795049642
132. Chamani FK, Shabani M, Moradi A, Alinejad M, Jalali SA. Evaluation of Molecular-level Changes of Programmed Cell Death Ligand-1 after Radiation Therapy in a BALB/c CT26 Colorectal Mouse Tumor Model. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2023;22(2). doi:10.18502/ijaa.v22i2.12677
133. Fu X, Yang Y, Xie J, et al. Subcutaneous inoculation position affects the immune environment in CT26 carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;512(2). doi:10.1016/j.bbrc.2019.03.042
134. Nedorubova IA, Bukharova TB, Vasilyev A V., Syachina MA, Goldshtein D V., Kulakov AA. Comparative study of BMP-2 gene delivery to Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with Turbofect and Polyethylenimine. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. Vol 677. 2021. doi:10.1088/1755-1315/677/4/042024

APÉNDICE A

MODELO DE CO-TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS A-549 PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS PÉPTIDOS KLAKE Y CTMP4

Metodología

Con el objetivo de comparar el efecto de los péptidos libres KLAKE y CTMP4 de manera directa, se realizó un modelo de expresión recombinante en la línea celular A-549 empleando un sistema inducible por doxiciolina (Tet-On) con plásmidos que contienen las secuencias codificantes de los péptidos KLAKE y CTMP4.

A partir de cultivos con un 80% de confluencia, se realizaron 2 lavados con PBS seguido de una tripsinización (tripsina-EDTA 0.25%) y conteo en cámara de Neubauer. Se sembraron 70,000 células en 1 mL de medio de cultivo por pozo en una placa de 24 pozos y se incubaron por 24 h. Después, se realizó la co-transfección de células A-549 por medio del reactivo TurboFect con los vectores pCMV-Tet3G, pTRE3G-ZsGreen1-Klak y pTRE3G-ZsGreen1-Ctmp4 como se muestra en la tabla 12. Para ello, se diluyó el ADN en 100 μ L de medio RPMI-1640 sin SFB en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se le adicionaron 2 μ L del reactivo TurboFect y se mezcló por vortex. La mezcla de TurboFect/ADN se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Después, se agregaron las mezclas de transfección gota a gota en cada pozo con células, se mezcló suavemente

y se incubó a 37 °C.¹³⁴ Pasadas 4 h, se adicionó doxiciclina (1 µg/mL) a cada pozo para inducir la expresión y se incubó nuevamente durante 48 h. Los resultados fueron analizados por medio del método de MTT como se mencionó previamente, empleando como control negativo células co-transfectadas utilizando un vector sin inserto.

TABLA 12

Relación de ADN-TurboFect empleada

Transfección	Cantidad de ADN		TurboFect
1	0.25 µg pCMV-Tet3G	0.25 µg pTRE3G-ZsGreen1-Klak	2 µL
2	0.25 µg pCMV-Tet3G	0.25 µg pTRE3G-ZsGreen1-Ctmp4	2 µL

Resultados

El modelo de co-transfección en células A-549 permitió determinar el efecto citotóxico de los péptidos KLAK y CTMP4. Se confirmó una inhibición de la viabilidad celular por la expresión de los péptidos KLAK y CTMP4, con porcentajes de inhibición de 20.77% ± 7.18% y 21.79% ± 5.02%, respectivamente (figura 35).

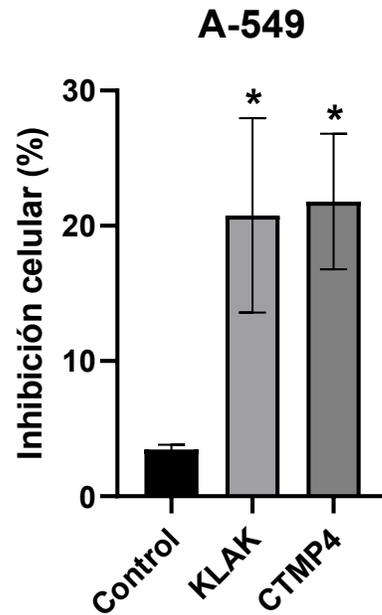


Figura 35. Gráfico del efecto citotóxico de la expresión de KLAK y CTMP4. Se presenta el porcentaje de inhibición celular relativa de la línea celular A-549 después de la expresión intracelular de los péptidos KLAK y CTMP4. Se utilizó pTRE3G-ZsGreen1 sin inserto control negativo. (*) $p < 0.05$.

APÉNDICE B

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10%

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

PBS 1X

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

Solución stock 20 mM de Erlotinib

Disolver 4.3 mg de erlotinib con 500 µL de DMSO y esterilizar con un filtro de jeringa de 0.22 µm. Almacenar a -20 °C.

Solución stock 2 mM de péptido CTMP4-H

Reconstituir el péptido liofilizado con 135 µL de PBS 1X estéril. Si se requiere, almacenar a -80 °C.

Solución stock 2 mM de péptido KLAK

Reconstituir el péptido liofilizado con 309 μL de PBS 1X estéril. Si se requiere, almacenar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Solución stock 2 mM de péptido NRPD-CTMP4-H

Reconstituir el péptido liofilizado con 95.8 μL de PBS 1X estéril. Si se requiere, almacenar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Solución stock 2 mM de péptido NRPD-H

Reconstituir el péptido liofilizado con 272 μL de PBS 1X estéril. Si se requiere, almacenar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Solución stock 2 mM de péptido NRPD-KLAK

Reconstituir el péptido liofilizado con 236 μL de PBS 1X estéril. Si se requiere, almacenar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Solución stock 2 mM de péptido NRPD-KLAK-H

Reconstituir el péptido liofilizado con 123 μL de PBS 1X estéril. Si se requiere, almacenar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Aldo Omar González Cruz

Candidato para el grado de

Doctorado en Ciencias con Orientación en Farmacia

**Tesis: DISEÑO DE LOS PÉPTIDOS PENETRANTES-PROAPOPTÓTICOS
NRPD-CTMP4-H Y NRPD-KLAK-H: EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO*
DE SU ACTIVIDAD CITOTÓXICA DIRIGIDA A CÁNCER EGFR-
POSITIVO**

Campo de estudio: Biotecnología Farmacéutica

Biografía:

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

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Biotecnología Genómica. Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.