



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN BIOTECNOLOGÍA

**Diseño de péptidos que inhiban o estabilicen interacciones
PM:PM de interés terapéutico implicados en cáncer de mama**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

JOSUÉ MERINO RODRÍGUEZ

CODIRECTORES

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal

Dr. Rachid Charbel Maroun

CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO, 2023

Dedicatoria

Dedicado con mucho cariño a toda mi familia, en especial a mis padres y hermanos, por estar siempre en los buenos momentos, pero también en las circunstancias más difíciles que te da la vida. Por las palabras de apoyo y los empujoncitos que hicieron la diferencia. Todo este trabajo, y el esfuerzo es para ustedes y para ayudar a todas las personas que hoy libran o librarán la batalla contra el cáncer de mama. Para que las familias se mantengan juntas, aunque sea un momento más.

Gracias a Dios por esta gran experiencia de vida.

Agradecimientos

Cuando se concluye un trabajo tan complejo y lleno de obstáculos como el desarrollo de una tesis de maestría, es una necesidad inequívoca agradecer a todas aquellas personas e instituciones que han formado parte de tan ardua labor.

Es mi deseo iniciar agradeciendo al Centro de Investigaciones en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CEIB), al Laboratorio de Actividad Estructural de Biomoléculas Normales y Patológicas, Evry, Francia, al Laboratorio de Biología Celular del Cáncer de la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo institucional y la beca CONACYT con Número 793697.

A la Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal y al Dr. Rachid Charbel Maroun por su guía, enseñanza y buenos consejos para llevar a buen puerto la conclusión del trabajo aquí presentado.

A los revisores de este escrito y miembros del comité tutorial, Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa, Dr. Ramón Suárez Rodríguez y Dr. Adrián Alejandro Schcolnik Cabrera, mi más sincero agradecimiento por su compromiso y apoyo académico.

Al Dr. Napoleón Navarro Tito y a la Dra. Lorena Cayetano Salazar, les agradezco por el apoyo académico en la estancia de investigación realizada en el Laboratorio de Biología Celular del Cáncer.

A la Técnico. Lucero Valladares Cisneros, agradezco por la asesoría prestada y por la gran ayuda que esto significa

Por último, deseo agradecer a mis amigos y compañeros del Laboratorio de Función Estructura e Ingenierías de Proteínas, fue una grata experiencia haber crecido académicamente junto a ustedes.

ÍNDICE GENERAL

I. Introducción	11
II. Antecedentes.....	12
2.1 El cáncer de mama en México y el mundo	12
2.2 El cáncer de mama	12
2.3 Clasificación del cáncer de mama	13
2.4 El cáncer de mama HER2 positivo	14
2.5 El receptor HER2.....	15
2.6 Importancia de la hélice transmembranal de HER2.....	15
2.7 Motivo estructural de interacción de la hélice transmembranal de HER2.....	16
2.8 Complejos de membrana en los que receptor HER2 está implicado	17
2.9 Principales vías catalíticas asociadas a HER2.....	17
2.10 Los tratamientos actuales contra el cáncer de mama.....	19
2.11 Resistencia a los tratamientos	20
2.12 Péptidos anticancerígenos (PAC).....	20
2.13 Mecanismo antitumoral de los PAC	20
2.14 La bioinformática	24
2.15 Diseño <i>in silico</i> o racional	24
2.16 Búsqueda de péptidos anticancerígenos <i>in silico</i>	27

2.17 Base de datos de proteínas y péptidos anticancerígenos (CancerPPD)	28
III. Justificación	28
IV. Hipótesis	28
V. Objetivo general	28
5.1 Objetivos particulares	29
VI. Metodología	29
6.1 Obtención de los motivos estructurales de HER2 y proteínas asociadas.....	29
6.2 Creación de la base de datos de péptidos con actividad en líneas celulares de cáncer de mama	30
6.3 Extracción de péptidos con actividad antimicrobiana-anticancerígena	30
6.4 Desarrollo de péptidos candidatos.....	30
6.5 Predicción de actividad peptídica	30
6.6 Determinación de la interacción péptido-membrana.....	30
6.7 Docking molecular	31
6.7.1 Preparación de los ligandos	31
6.7.2 Preparación del receptor HER2	31
6.8 Acoplamiento molecular de HER2 con las bases de datos	31
VII. Resultados	31
7.1 Obtención de los motivos estructurales de HER2 y proteínas asociadas.....	31
7.2 Extracción de péptidos con actividad antimicrobiana-antibacteriana.....	33

7.3 Diseño de péptidos candidatos.....	35
7.4 Predicción de actividad peptídica	37
7.5 Desarrollo de nuevos péptidos candidatos.....	38
7.6 Determinación de la interacción péptido-membrana.....	38
7.6.1 Determinación de la estabilidad de los péptidos candidatos en agua.....	38
7.6.2 Determinación de la interacción péptido-membrana eucarionte.....	39
7.6.3 Mejores péptidos candidatos.....	40
7.7 Acoplamiento molecular proteína-ligando.....	43
VIII. Discusión	45
IX. Conclusiones.....	54
X. Perspectivas	55

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Gráfico de barras con los valores de la prevalencia y tasa de mortalidad en el Mundo (lado izquierdo) y México (lado derecho) (Ferlay et al., 2023).12
- Figura 2.** Se muestra la anatomía de la glándula mamaria, los tejidos y origen de los tipos de cáncer más comunes (Song et al., 2021).....13
- Figura 3.** Clasificación de los diferentes tipos de cáncer de mama según la expresión de receptores de membrana y correlación con el origen histopatológico. donde RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona y HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Caldarella *et al.*, 2012).....14
- Figura 4.** Conformación estructural de HER2 que se observa también en la familia EGFR (Huang *et al.*, 2021).....15
- Figura 5.** En la parte superior el cambio conformacional que sufre la hélice transmembranal de HER2 al pasar de una forma inactiva a una activa. en la parte de abajo se muestra el receptor completo en la membrana (Bragin *et al.*, 2015).16
- Figura 6.** Se observa el motivo de interacción entre las hélices intracelulares A y B de dos receptores HER2 que forman un homodímero HER2:HER2 (khazen *et al.*, 2021).16
- Figura 7.** Se observa la regulación (activación/ inhibición) de las vías MAP-cinasas y PI₃k-AKT-mTOR en las que el receptor HER2 está implicado. la activación inicia con el reconocimiento del ligando por parte del receptor asociado a HER2, continua con la formación de un dímero que inicia una cascada de fosforilaciones que permite el mantenimiento de la señal proliferativa, así como el aumento de la replicación celular. Por otro lado, la inhibición está siendo efectuada por moléculas como AMPK que inhibe al complejo Raptor necesario en la vía mTOR (Simond et al., 2020).....18
- Figura 8.** Se observan las cuatro vías principales con las que los péptidos anticancerígenos generan muerte celular en las células tumorales (Bhagat *et al.*, 2020).21
- Figura 9.** Mecanismo de acción de los péptidos anticancerígenos por la vía de la apoptosis (Tyagi *et al.*, 2015; Parchebafi *et al.*, 2022)22

Figura 10. Mecanismos de acción de los PAC en membrana (<i>Kumar et al., 2018</i>)	23
Figura 11. Se muestra de forma esquematizada el diseño <i>in silico</i> o racional de péptidos en bioinformática (<i>Liscano et al., 2020</i>).....	25
Figura 12. Se muestra de forma esquemática la metodología seguida en el diseño racional de péptidos candidatos a inhibir el complejo proteico formado por el homodímero del receptor HER2.	29
Figura 13. Se observa el alineamiento del motivo de interacción PPIMem de los 6 receptores que interaccionan con HER2.	33
Figura 16. Correlación determinada por el método de Spearman. a) se muestra la correlación existente entre la actividad antimicrobiana y anticancerígena de todas las variantes agrupadas. b) se puede apreciar el aumento en la correlación entre las actividades anticancerígenas y antimicrobianas de las primeras 18 variantes con respecto de las 11 variantes generadas a partir de los péptidos JMR-3 y JMR-9. En color verde se marcan los péptidos con mayor actividad anticancerígena y menor actividad antimicrobiana.....	42
Figura 17. Representación gráfica de la penetración de los péptidos en membrana eucarionte. en color amarillo se indican a los considerados mejores candidatos a sintetizar.	43
Figura 18. Representación gráfica de la interacción de HER2 con los tres péptidos candidatos a inhibir la interacción homodimérica del mismo.	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de tratamientos anticancerígenos en cáncer de mama y sus reacciones secundarias.....	19
Tabla 2. Servidores y programas utilizados para diseñar péptidos <i>in silico</i>	25
Tabla 3. Se muestran las secuencias completas de los aminoácidos que corresponden a la secuencia regular de las 6 proteínas que cuentan con estructura cristalizada. En color verde se indican a los aminoácidos conservados del sitio de interacción, y en azul a las mutaciones.	32
Tabla 4. Se observan los motivos de interacción predichos por PPIMem para los miembros de la familia EGFR. Los motivos de interacción son diferentes para cada receptor	32
Tabla 5. Se muestran las características fisicoquímicas calculadas de los PAC con actividad en las líneas celulares HER2 positivas. PI: punto isoeléctrico. La hidrofobicidad se muestra en %.	35
Tabla 6. Tabla con múltiples alineamientos entre la secuencia consenso de los péptidos NCR, Cecropin b y el motivo de interacción de los receptores.	36
Tabla 7. Variantes desarrolladas por alineamiento de secuencia y sus características fisicoquímicas. La hidrofobicidad se presenta en %. PI= punto isoeléctrico.	36
Tabla 8. Caracterización de las probables actividades peptídicas. En color naranja se muestran las variantes con índice de actividad anticancerígena por arriba del 0.5 %.	37
Tabla 9. Péptidos generados a partir del servidor AntiCP 2.0. Carga: 1-3. Punto isoeléctrico: 10.4-11.8. Hidrofobicidad: 70-80 %.	38
Tabla 10. Péptidos candidatos con segmentos de la secuencia peptídica con estabilidad en agua, donde se indican los candidatos que no presentaron estabilidad en agua (NP).	39
Tabla 11. Energía de interacción de los péptidos candidatos con membrana eucarionte, así como el ángulo de inclinación y penetración.....	40

Tabla 12. Se observan los péptidos candidatos generados, donde todos los péptidos presentaron las siguientes características: carga: +1-+3; longitud: 20 aminoácidos; índice de gravy: 1.44- 2.09.....**41**

Tabla 13. Valores de la interacción de los péptidos candidatos en la membrana. Se marcan en color gris a los péptidos candidatos. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Tabla 14. Características de la interacción de los complejos proteína-ligando de HER2, y los péptidos JMR-3, JMR-20 y JMR-22.....**43**

Tabla 15. Valores de la minimización de energía de los complejos JMR-3, JMR-20 y JMR-22.**44**

Abreviaturas

AKT: proteína cinasa B.

DM1: empatisina.

GRAVY: suma de los valores de hidropatía de todos los aminoácidos dividida por la longitud de la proteína.

HER1 o EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico humano.

HER2: receptor dos del factor de crecimiento epidérmico humano.

HER3: receptor tres del factor de crecimiento epidérmico humano.

HER4: receptor cuatro del factor de crecimiento epidérmico humano.

JMR: Josué Merino Rodríguez.

MAPK/ERK: vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PAC: péptido anticancerígeno.

PAM: péptido antimicrobiano.

PI3K: fosfoinositol-3-cinasa.

PM1: proteína de membrana uno.

Ras: conjunto de interruptores-reguladores moleculares.

RMN: resonancia magnética nuclear.

RMSD: desviación de la raíz cuadrática media.

RTKs: receptores de tirosina cinasa.

SRC: proteína tirosina proto-oncogénica Src

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3.

T-DX-d: deruxtecan

I. Introducción

Diversos estudios realizados durante las últimas décadas han revelado la existencia e importancia de la expresión de proteínas control durante el desarrollo del cáncer, y en especial las que se sobre expresan en la membrana celular y tienen función de receptor. Considerando que muchos de estos receptores se relacionan con el inicio y mantenimiento de la señal de replicación, se han vuelto tendencia como blanco en el diseño de nuevas terapias anticancerígenas. Tal es el caso, del miembro de la familia de receptores de tirosina cinasa (RTKs), el receptor 2 del factor epidérmico humano (HER2), cuya sobre-expresión se asocia con el desarrollo de cáncer de ovario, glioma, gástrico, pulmón y mama; que tan solo en el año 2020 causaron cerca de 3.5 millones de defunciones a nivel mundial (Ferlay et al.,2023).

Entre los principales tratamientos dirigidos hacia el cáncer de mama positivo al receptor HER2, se encuentran las quimioterapias como, antimetabolitos, agentes alquilantes, inhibidores de tirosina cinasa (lapatinib, neratinib y tucatinib) y agentes biológicos. De estos últimos, los más utilizados son los anticuerpos como trastuzumab, bevacizumab, y pertuzumab que van dirigidos al dominio II de la sección extracelular del receptor HER2 e inhiben la formación de homodímeros y heterodímeros con HER1, HER3 y HER4. Estos anticuerpos normalmente se utilizan en combinación con otro tipo de terapias, por ejemplo; deruxtecan (T-DXd), un inhibidor de topoisomerasa; y emtansina (DM1), inhibidor de la formación de microtúbulos, pero no han demostrado ser 100% eficaces para curar el cáncer metastásico de mama HER2 positivo

Las causas de la falta de eficacia para curar el cáncer de mama es la resistencia a los fármacos antes mencionados, las cuales incluyen mutaciones en la molécula diana, pérdida de los sitios de unión a los receptores, y la incapacidad para penetrar la membrana celular. Ya que, la permeabilidad de la membrana se ve alterada por cambios biofísicos, dados por, cambios en la expresión de algunas biomoléculas como, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol.

Por tanto, este trabajo plantea la posibilidad de desarrollar nuevas alternativas de tratamiento contra el cáncer de mama HER2 positivo, al emplear péptidos catiónicos que posean la capacidad de penetrar diferentes tipos de membrana y de interrumpir las interacciones proteína-proteína de la sección transmembranal del receptor HER2 que están involucradas en cáncer de mama; por ejemplo, la inhibición del acoplamiento de dos proteínas de membrana HER2:HER2, HER2:HER1, HER2:HER3 y HER2:HER4.

II. Antecedentes

2.1 El cáncer de mama en México y el Mundo

Actualmente, el cáncer de mama es la enfermedad neoplásica con mayor incidencia en el mundo, con cerca de 2.26 millones de casos registrados, de los cuales cerca de 685,000 corresponden a pacientes que perdieron la vida por esta enfermedad (Ferlay *et al.*, 2023). En cuanto a México, tan solo en el año 2021, el cáncer de mama causó 7, 973 muertes, de los cuales 99.4 % fueron mujeres y 0.6 % fueron hombres (INEGI, 2022). Esta enfermedad tiene una incidencia reportada de 40 casos por cada 100,000 habitantes y una la tasa de mortalidad de 0.11% (**Figura 1**), que ha ido en aumento desde 1979 (Alejandro *et al.*, 2020). Se estima que, dentro de todas las clasificaciones del cáncer de mama, el porcentaje de los pacientes positivos al cáncer de mama HER2 positivo es cercano al 20%, lo que lo convierte en una de las enfermedades más peligrosas en México y el Mundo (Gámez-Chiachio *et al.*, 2022).

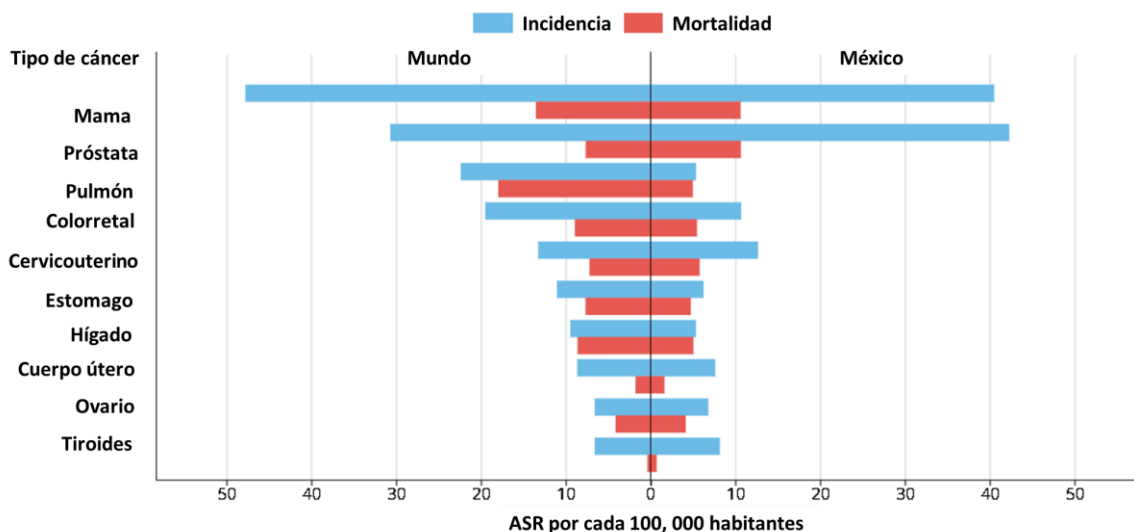


Figura 1. Gráfico de barras con los valores de la prevalencia y tasa de mortalidad en el mundo (lado izquierdo) y México (lado derecho) (Ferlay *et al.*, 2020).

2.2 Características del cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad que se caracteriza por la multiplicación sin control de las células del tejido mamario, en especial las que forman los lobulillos y los conductos. En estas estructuras se pueden generar diferentes tipos de carcinoma, dependiendo de si producen metástasis o no. Los tipos de carcinoma más comunes son: el carcinoma ductal infiltrante, en donde las células cancerosas se multiplican fuera de los conductos e invaden otras partes del tejido; el carcinoma lobulillar infiltrante, en este tipo de cáncer, la metástasis se disemina de los lobulillos a los tejidos cercanos; y el carcinoma ductal *in situ*, donde las células cancerosas se encuentran exclusivamente en la capa que cubre los conductos (**Figura 2**) (Mote et al., 2004).

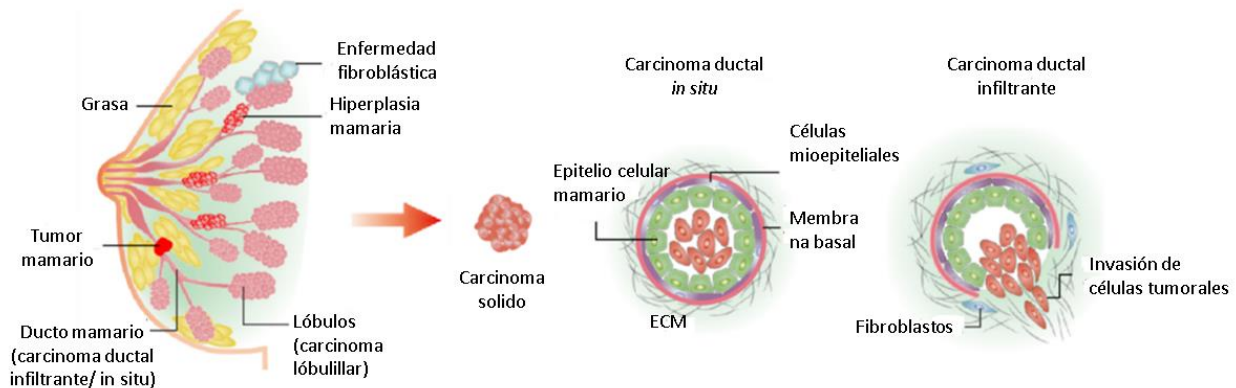


Figura 2. Se muestra la anatomía de la glándula mamaria, los tejidos y origen de los tipos de cáncer más comunes (Song et al., 2021).

Para que el cáncer de mama HER2 positivo y otros tipos de cáncer puedan obtener la multiplicación sin control durante su desarrollo, es necesario que pasen por la etapa conocida como **“mantenimiento de la señalización proliferativa”**, la cual es descrita por Mote y colaboradores como una marca distintiva del desarrollo de todas las enfermedades conocidas como cáncer. En dicha etapa, las células cancerosas adquieren una gran capacidad de replicación por diferentes vías, desde producir ellas mismas por vía autocrina su ligando de factor de crecimiento, al que puede responder mediante la expresión de receptores afines, hasta enviar señales de manera paracrina para estimular las células normales dentro del estroma asociado con el tumor de soporte, que actúan en reciprocidad al suministrar a las células cancerosas varios factores de crecimiento. Adicionalmente, pueden desregular la señalización elevando los niveles de proteínas receptoras. Tal es el caso de los receptores de estrógeno, progesterona y del receptor 2 del factor epidérmico humano (HER2) con actividad tirosina cinasa, cuya expresión caracteriza al cáncer de mama HER2 positivo (Mote et al., 2004).

2.3 Clasificación del cáncer de mama

Los diferentes tipos de cáncer de mama son clasificados dependiendo del tipo de tejido de origen (histopatología), pero también según el subgrupo molecular de receptores de membrana expresados. Esta clasificación consta en cuatro grupos principales, los cuales son: luminal A, positivo a los receptores de progesterona y estrógeno; luminal B, positivo al receptor de estrógeno; triple negativo, negativo a los tres receptores; y HER2 positivo. Ambas clasificaciones se encuentran relacionadas entre sí (**Figura 3**) (Caldarella et al., 2012).

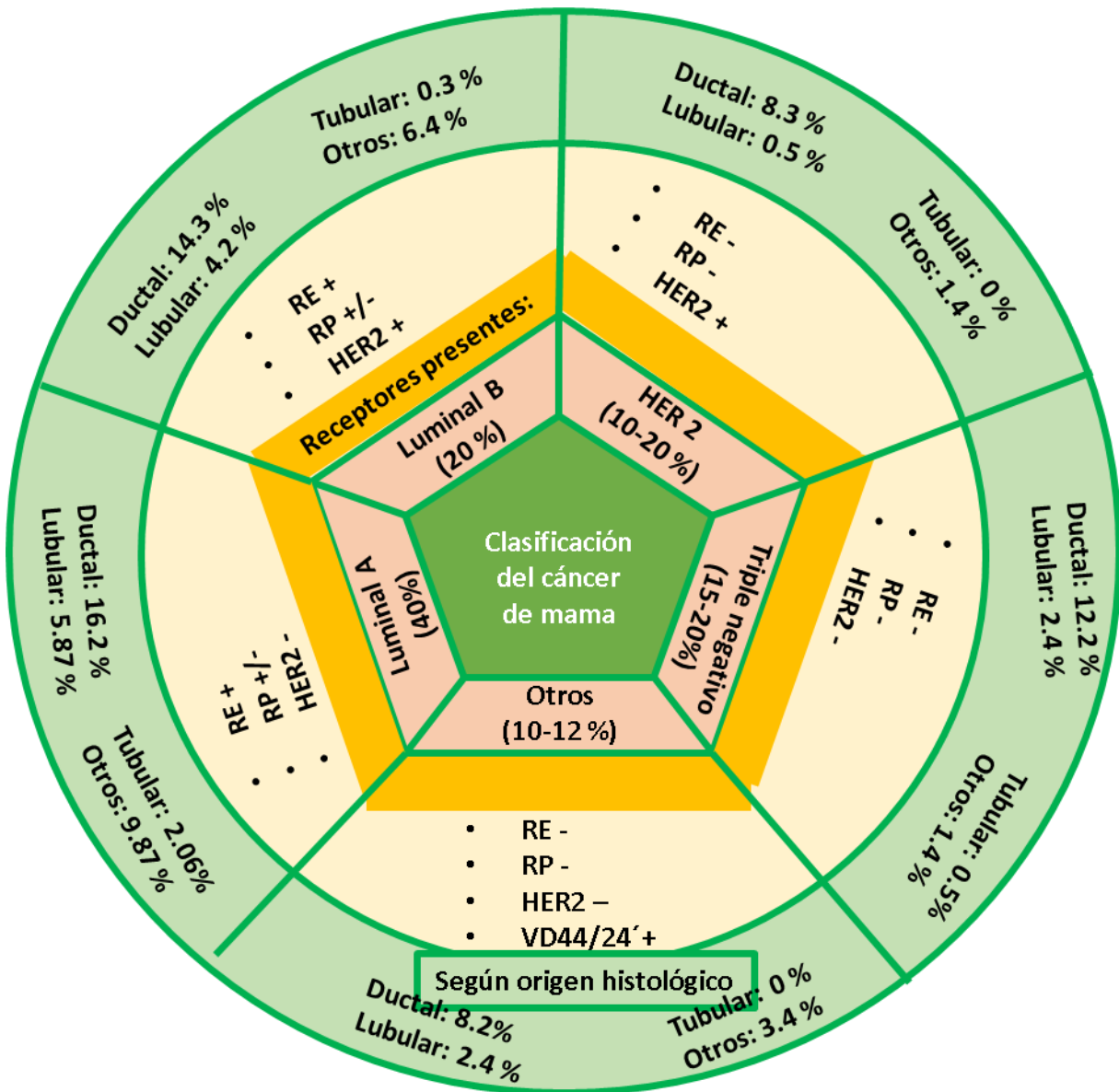


Figura 3. Clasificación de los diferentes tipos de cáncer de mama según la expresión de receptores de membrana y correlación con el origen histopatológico. Donde RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona y HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Caldarella et al., 2012).

2.4 El cáncer de mama HER2 positivo

El cáncer de mama HER2 positivo se caracteriza por la sobre-expresión o amplificación del receptor HER2, que se asocia a una mayor agresividad tumoral, incidencia y mortalidad entre los pacientes. Dicha amplificación del receptor se ve aumentada hasta en un 30% de los pacientes, y por tal razón, es considerada una diana en el desarrollo de nuevos tratamientos (Gaméz-Chiachio et al., 2022).

2.5 El receptor HER2

El receptor HER2 es una proteína de 1,255 aminoácidos, miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR), que se caracteriza estructuralmente por tener un módulo extracelular, un módulo intracelular con actividad cinasa, y una única hélice incrustada en la membrana. El módulo extracelular se encuentra formado por cuatro dominios (I, II, III y IV). Los dominios I y III interaccionan con el ligando, por ejemplo: EGF y juntos con el dominio II que contiene el brazo de dimerización forman una unidad compacta conocida como cabeza, la cual se une a la hélice integral por el dominio IV. La hélice se une a su vez al dominio intracelular, el cual lleva a cabo la actividad cinasa (**Figura 4**). El receptor HER2 permite activar la proliferación, supervivencia, migración y diferenciación celular por las vías celulares fosfoinositol-3-cinasa (PI₃K) /AKT, la vía de Ras/MEK y la vía de MAPK/ERK (Huang *et al.*, 2021).

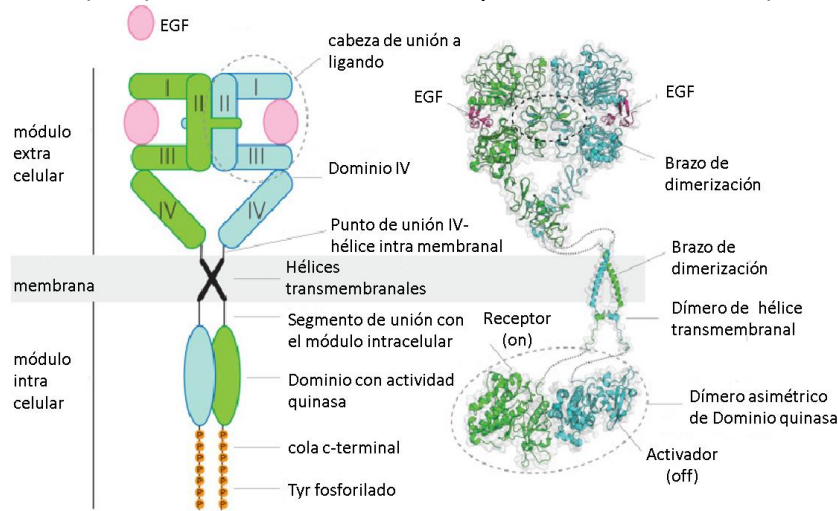


Figura 4. Conformación estructural de HER2 que se observa también en la familia EGFR (Huang *et al.*, 2021).

2.6 Importancia de la hélice transmembranal de HER2

La hélice transmembranal de HER2 es una región altamente conservada, y cuya estructura se encuentra descrita en trabajos como los reportados por Bragin y colaboradores (2015). En ese trabajo, los autores lograron obtener la estructura de la hélice transmembranal de HER2 por resonancia magnética nuclear (RMN) (con código PDB de entrada 2N2A, www.rcsb.org/structure/2N2A). En este estudio ellos observaron con mayor precisión estructural los estados de activación e inactivación de HER2 (**Figura 5**). También demostraron que las hélices transmembranales de los homodímeros de HER2 interactúan a través de un motivo hidrofóbico extendido, y que los dominios intracelulares helicoidales se auto-asocian de forma paralela, con una superficie de contacto hidrofóbica que se incrusta en la membrana y que permite la interacción de la hélice durante la formación del homodímero (Bragin *et al.*, 2015).

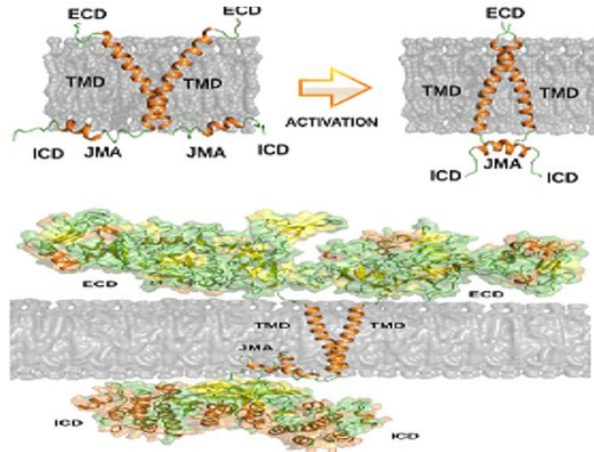


Figura 5. En la parte superior el cambio conformacional que sufre la hélice transmembranal de HER2 al pasar de una forma inactiva a una activa. En la parte de abajo se muestra el receptor completo en la membrana (*Bragin et al., 2015*).

2.7 Motivo estructural de interacción de la hélice transmembranal de HER2

En el año 2021, Khazen y colaboradores lograron definir en su trabajo el motivo estructural de interacción del homodímero formado por HER2 (2N2A) con la expresión regular de I. {3} V. {3} L. {2} V L. {6} L. (I12, V16, L20, V23, L24 y L31) (Figura 6). La expresión dilucidada corresponde a los aminoácidos altamente conservados que interactúan entre la cadena A y la cadena B del homodímero de HER2. Este motivo de interacción es, por tanto, una excelente diana en el desarrollo de moléculas que interrumpan la interacción de HER2 a nivel transmembranal y evadan los principales mecanismos de resistencia descritos, tales como, mutaciones o deleciones en los módulos externo e interno de HER2, cuyo principal tratamiento actual son los anticuerpos monoclonales, tales como trastuzumab (*Khazen et al., 2021*).

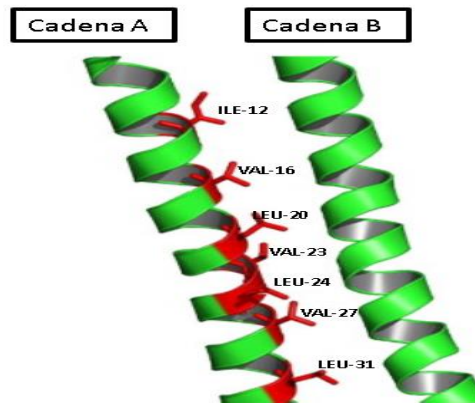


Figura 6. Se observa el motivo de interacción entre las hélices intracelulares A y B de dos receptores HER2 que forman un homodímero HER2:HER2 (*Khazen et al., 2021*).

2.8 Complejos de membrana en los que el receptor Her2 está implicado

El receptor HER2 no puede reconocer por sí solo algún ligando, pero tiene actividad de cinasa. Por esa razón, suele ser un receptor asociado a diferentes complejos de membrana. Algunos de estos complejos pueden ser homodímeros o heterodímeros, con miembros de la misma familia EGFR o algunos otros que se presentan a continuación (Marone *et al.*, 2004):

1. El complejo neurregulina-receptor: Este complejo modula la activación de la vía MEMO1-RHOA-DIAPH1, que regula el crecimiento y la estabilización de los microtúbulos (MT) periféricos (Marone *et al.*, 2004).

2. El complejo PTGS2/COX-2-receptor está implicado en la activación transcripcional de CDKN1A; la función implica STAT3 y SRC. Participa en la transcripción de genes de rRNA por la RNA Pol I e incrementa la síntesis de proteínas implicadas en el crecimiento celular (Olayioye *et al.*, 1999).

3. Complejos con otros miembros de la misma familia de los EGFR: estos complejos están fuertemente relacionados en la proliferación celular, por algunas vías como la MAP-cinasas (MAPK o MAP/ERK) y PI₃K-AKT-mTOR (Wang *et al.*, 2017).

2.9 Principales vías catalíticas asociadas a HER2

Vía MAP-cinasas (MAPK o MAP/ERK): inicia con la activación de la cascada de señalización cuando el dominio tirosina-cinasa de alguno de los receptores efectores de membrana es fosforilado. Tras este proceso, los grupos fosfato incorporados son capaces de atraer los dominios SH2 de algunas de las proteínas activadoras de RAS, que tienen función de GTPasas, y que unen moléculas de guanina trifosforiladas (GTP) y defosforiladas, proceso mediante el cual sufren un cambio en su conformación que les permite interactuar con otras proteínas (Wang *et al.*, 2017). Una vez realizada esta interacción, la proteína RAS recupera su conformación inicial mediante la desfosforilación de la molécula de GTP. A continuación, el complejo activo RAS-GTP se une a una proteína serina-treonina cinasa llamada RAF mediante su fragmento N-terminal. La hidrólisis de RAS-GTP a RAS-GDP hace que RAF sea activado mediante fosforilación y posteriormente liberado. BRAF es un miembro de la familia de proteínas RAF que es la principal efectora de RAS en la vía de las MAPK. Cuando BRAF es activada por RAS, ésta interactúa con CRAF para activar a MEK, que a su vez extiende la señal mitogénica a la activación de ERK, que finalmente se transloca al núcleo celular donde activa los programas genéticos (**Figura 7**) (Gao *et al.*, 2009)

Vía PI₃K-AKT-mTOR: inicia con la estimulación del receptor de membrana, el cual, por resultado de la fosforilación, atrae hacia sí el dominio SH2 de PI₃K. PI₃K que es una cinasa lipídica formada por dos subunidades: p85, que es la parte reguladora, y p110, que es la subunidad catalítica. Cuando la subunidad p85 está unida al grupo fosfato del receptor transmembrana, se produce un cambio conformacional sobre p110 que le posibilita interactuar con las moléculas de fosfoinositol bifosfato (PIP₂), fosforilándolas para producir fosfoinositol trifosfato (PIP₃), mecanismo

que también puede ocurrir por la unión de KRAS directamente a la subunidad p110 (Wang *et al.*, 2017). PIP₃ se puede convertir en PIP₂ mediante la fosfatasa homóloga de tensina (PTEN), que antagoniza la actividad de PI3K al actuar como un represor. PIP₃ es capaz de fosforilar a AKT (proteína cinasa B) y PDK1 (proteína cinasa 1 dependiente de fosfoinositol), dos proteínas situadas por debajo en la vía, que a su vez tienen como funciones más importantes la activación de los complejos mTOR 1 y 2, P70S6 cinasa y también la supresión de FOXO3a, provocando la activación del metabolismo, la adquisición de resistencia a la apoptosis, un incremento de la motilidad celular, un aumento de la angiogénesis y la progresión del ciclo celular (Gao *et al.*, 2009) (Figura 7).

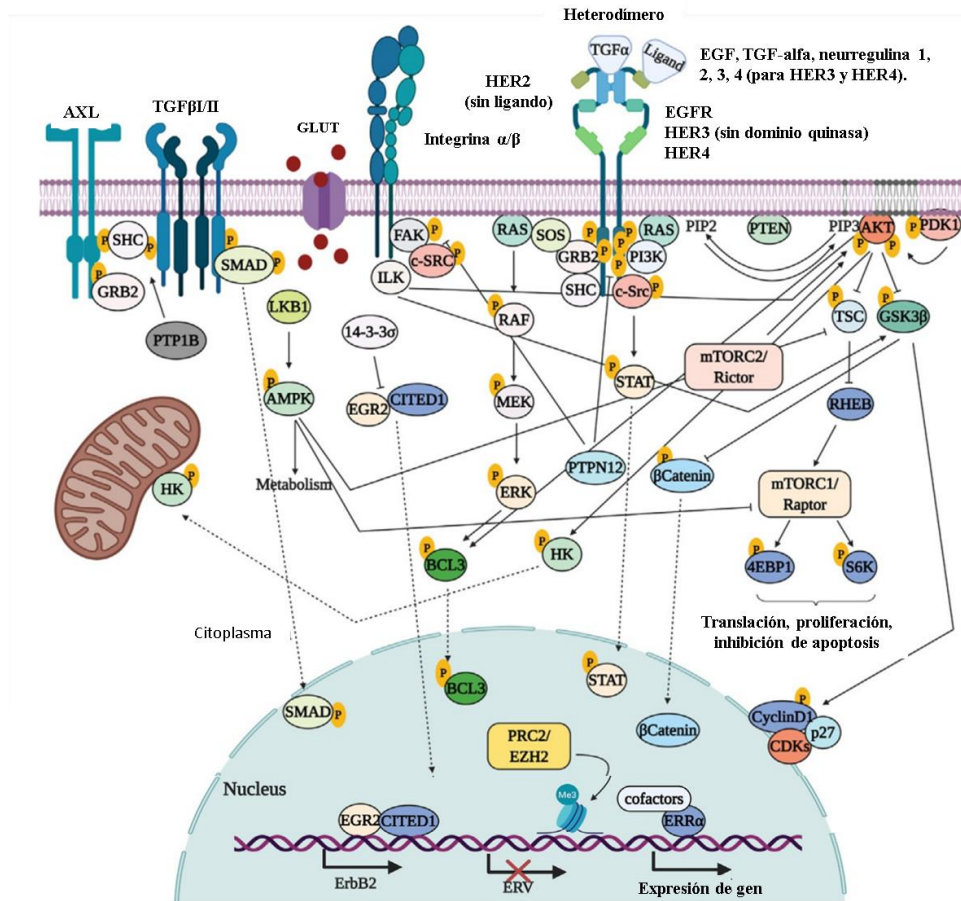


Figura 7. Se observa la regulación (activación/ inhibición) de las vías **MAP-quinasas y PI3K-AKT-mTOR** en las que el receptor HER2 está implicado. La activación inicia con el reconocimiento del ligando por parte del receptor asociado a HER2, continua con la formación de un dímero que inicia una cascada de fosforilaciones que permite el mantenimiento de la señal proliferativa, así como el aumento de la replicación celular. Por otro lado, la inhibición está siendo efectuada por moléculas como AMPK que inhibe al complejo Raptor necesario en la vía mTOR (Simond *et al.*, 2020).

2.10 Los tratamientos actuales contra el cáncer de mama

Actualmente, existe una gran variedad de tratamientos contra el cáncer, según el tipo y la etapa en la que es detectado. Algunas opciones de tratamiento pueden ser quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida, terapia hormonal y cirugía (**Tabla 1**). Por lo general, estos tratamientos suelen ser utilizados en combinación, pero ninguna de estas combinaciones tiene 100% de eficacia para curar el cáncer de mama. Para el cáncer HER2 positivo se han desarrollado anticuerpos como trastuzumab, que tiene la capacidad de evitar la formación del dímero al unirse al dominio II del módulo externo. También se han desarrollado otros medicamentos, como lapatinib, que es un inhibidor dual de cinasa reversible del dominio intracelular tirosina cinasa de EGFR y HER2 (*Habault & Poyet et al., 2019*).

Tabla 1. Ejemplos de tratamientos anticancerígenos en cáncer de mama y sus reacciones secundarias.			
Tratamiento	Ejemplo	Actividad	Reacciones secundarias
Cirugía	Tumorectomía Mastectomía Reconstrucción de la mama	Se retira por cirugía el tejido afectado	Dolor, hipersensibilidad a corto plazo, riesgo de infección, cicatrización deficiente o reacción alérgica a la anestesia, etc.
Radioterapia	Rayos de alta energía Radiación de implante	Reducir y destruir células cancerosas	Astenia, eritema, xerosis, hipersensibilidad cutánea, esclerodermia en región mamaria, incremento en la masa mamaria, y cuando va a terminar el tratamiento formación de edema.
Quimioterapia	Antraciclinas (doxorrubicina y epirrubicina), taxanos (paclitaxel y docetaxel)	Implicados en la inhibición de la topoisomerasa I, radicales libres, microtúbulos, y síntesis de DNA y RNA.	Infección, hemorragia, hematomas, astenia, alopecia, úlceras orales y malestar estomacal
Terapia hormonal	Tamoxifeno, progesterona o estrógeno	Moduladores del receptor de estrógeno (SERM) o inhibidores de aromatasa (AI)	Secreción vaginal, vaginitis, náuseas, cambios de humor y alteraciones en el ciclo menstrual
Biológicos (cáncer de mama HER2 positivo)	Anticuerpos monoclonales Trastuzumab, Pertuzumab y Deruxtecán	Se dirigen al dominio II externo de los receptores HER2 ralentizando o deteniendo el crecimiento celular	Dermatitis o edema

2.11 Resistencia a los tratamientos

Problemas como el aumento de la resistencia de las células cancerosas a la quimioterapia, efectos adversos, incapacidad de los fármacos para penetrar las membranas celulares, efectos estéricos, elevaciones alternativas de otros receptores tirosina cinasa y alteraciones intracelulares en la señalización posterior a HER2, han llevado al desarrollo de nuevas alternativas de administración, como los vectores de base viral, las nanopartículas o los péptidos de penetración celular (CPP), las cuales pueden presentar una actividad dependiente o independientes de energía. En general, los péptidos demostraron una gran actividad contra las células cancerosas por medio de efectos citostáticos y citotóxicos (*Habault & Poyet et al., 2019*).

2.12 Péptidos anticancerígenos (PAC)

Hoy en día en las bases de datos se ha acumulado información referente a estructura y función de péptidos catiónicos de bajo peso molecular con actividad antitumoral, que se clasifican como péptidos anticancerígenos (PAC) (*Qiao et al., 2019*). Debido a su mecanismo de acción único, los PAC tienen muchas ventajas sobre la quimioterapia convencional, como inhibir mejor la proliferación de células tumorales, la migración y la angiogénesis tumoral. Los PAC podrían emplearse como terapia complementaria específicamente para: reducir el tejido afectado, destruir células cancerosas, controlar el cáncer en todo el cuerpo, evitando la metástasis, como moduladores del receptor de estrógeno (SERM), como inhibidores de aromatasa (AI) e inhibidores de receptores de HER2. Los PAC deben tener diferentes características, como: a) alta afinidad hacia la molécula diana; b) capacidad de penetrar diferentes tipos de membranas; y c) interrumpir la interacción proteína-proteína a nivel transmembranal. Así, los PAC podrán desempeñar una actividad importante en diversos procesos y vías celulares. Junto con los méritos de una penetración tisular relativamente alta y una baja aparición de resistencia a los medicamentos, las perspectivas de aplicación clínica de los PAC son prometedoras (*Qiao et al., 2019*).

2.13 Mecanismo antitumoral de los PAC

Los PAC pueden destruir la estructura de la membrana celular de forma directa, igual que los péptidos antimicrobianos, o de forma indirecta al interferir en procesos biológicos esenciales en la célula cancerosa. Es el caso del péptido 11 y 26 reportados por Liscano (*Liscano et al., 2020*). Estos péptidos tienen la capacidad de evitar la formación del complejo AGO2/ MSI1 implicado fuertemente en el desarrollo de cáncer al regular la expresión de ARNm a nivel de traducción, ya que controla la decisión del destino celular, la diferenciación, el mantenimiento de la señal proliferativa de las células madre neurales progenitoras y la tumorigénesis de las células cancerosas (*Yang et al., 2022*). Dichos péptidos también pueden inhibir la angiogénesis al bloquear a proteínas involucradas en el proceso, o producir apoptosis al dañar la membrana de la mitocondria por la vía de las caspasas (**Figura 8**) (*Agrawal et al., 2020*).

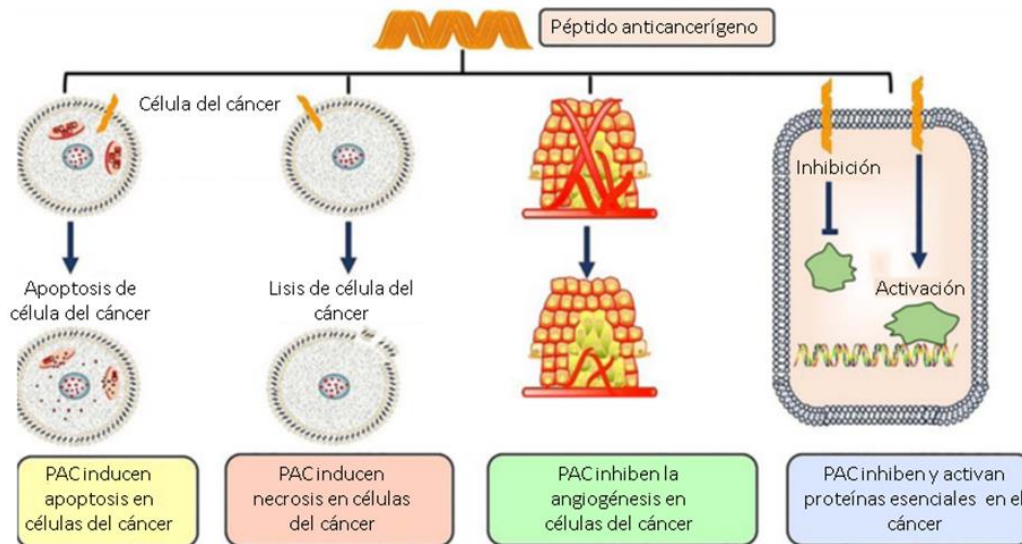


Figura 8. Se observan las cuatro vías principales con las que los péptidos anticancerígenos generan muerte celular en las células tumorales (Agrawal *et al.*, 2020).

En el caso de los PAC, la vía intrínseca inicia cuando los péptidos se unen a la membrana mitocondrial y provocan cambios en el potencial de ésta, dando origen a la fase de decisión, y con esto provocando la liberación de proteínas apoptóticas (Bax, Bak, Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad y Blk), citocromo C, proteína A2 y endonucleasas G. El citocromo C, al ser liberado de la mitocondria, interactúa con Apaf-1, y juntos forman el complejo apoptosoma, el cual activa a la pro-caspasa 9. Después la caspasa 9 activa a la pro-caspasa 3, 6 o 7. La caspasa 3 al estar activada separa diferentes proteínas, incluyendo cinasas, proteínas de control del ADN, proteínas del citoesqueleto o inhibidores de endonucleasas. Las endonucleasas G y la A2 se transportan al núcleo, donde causan la fragmentación del ADN mediado por la caspasa-3 en una fase conocida como fase de ejecución (**Figura 9**) (Kiraz *et al.*, 2016).

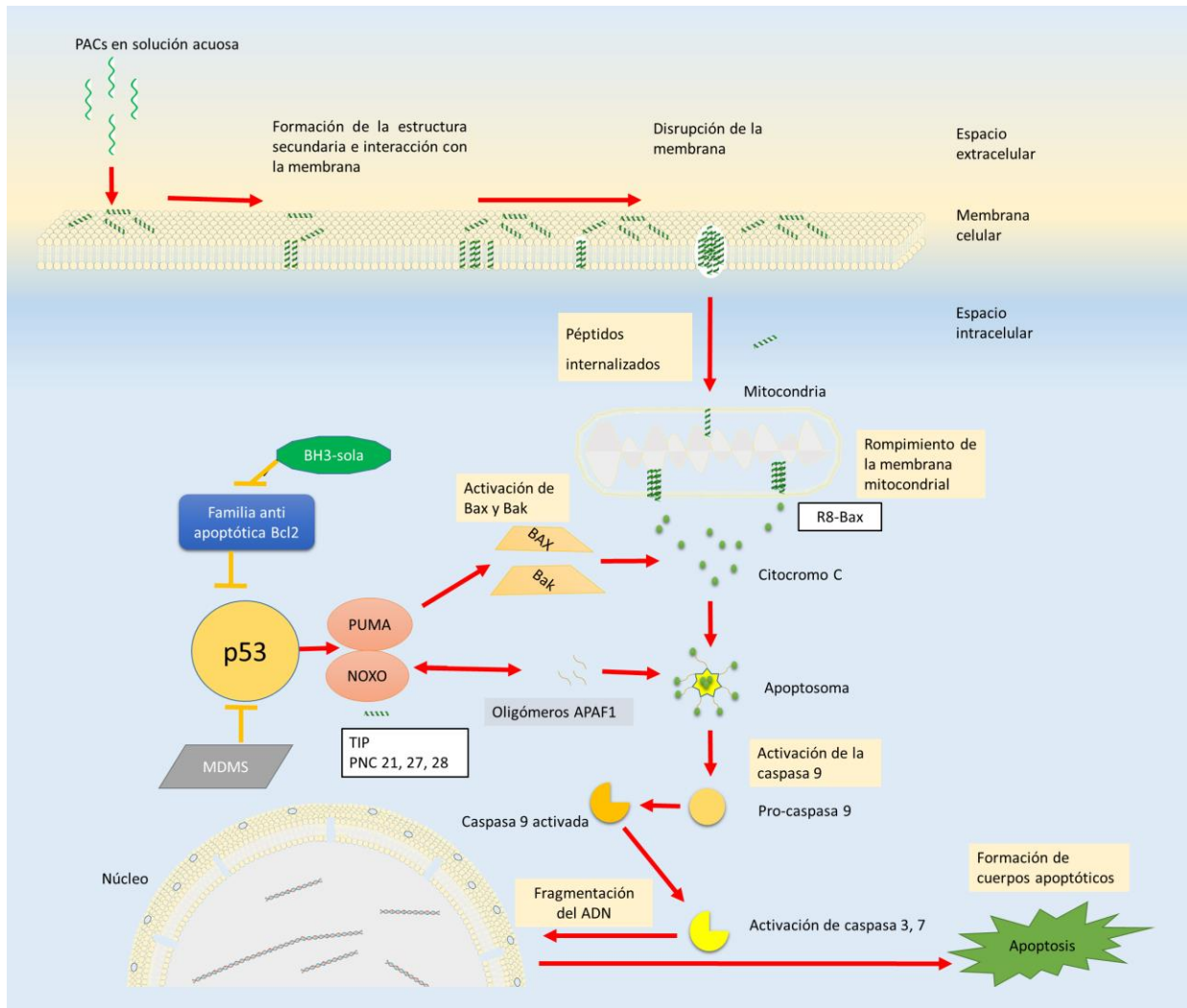


Figura 9. Mecanismo de acción de los péptidos anticancerígenos por la vía de la apoptosis (Tyagi et al., 2015; Parchebafi et al., 2022)

En el caso de los péptidos que interactúan en la membrana celular, la unión péptido-membrana se da por las fuerzas hidrofóbicas, de tal manera que el péptido pasa de una manera desordenada a una estructura anfipática α -helicoidal. En el caso de los péptidos con estructura de β -lámina, estos mantienen su estructura por los enlaces disulfuro de los aminoácidos azufrados al interactuar con la membrana (metionina y cisteína). Posteriormente, el péptido inicia la introducción transversal en la bicapa lipídica por medio de los distintos mecanismos de acción que se mencionan a continuación (Ehrenstein and Lecar et al., 1977).

Barril sin fondo: en 1977, Ehrenstein y Lecar propusieron el modelo 'barril sin fondo'. En este mecanismo se sugieren la formación de una pared alrededor del poro, por los péptidos que se colocan uno al lado de otro; como las hojas o láminas de madera que forman las paredes de un barril que no tiene fondo. En este modelo, los aminoácidos hidrofóbicos se colocan con

dirección a la bicapa lipídica, lo que lleva a que las células tumorales no puedan mantener la presión osmótica normal y se lisen (**Figura 8**) (Ehrenstein and Lecar et al., 1977).

Poro toroidal: este mecanismo se diferencia de la del barril sin fondo, en que los péptidos están intercalados con los fosfolípidos de la bicapa lipídica de la membrana, donde es desplazada la cabeza polar de los fosfolípidos y se induce la deformación de la membrana (**Figura 8**) (Yeaman and Yount, 2003).

Modelo de alfombra: en este mecanismo los péptidos se acumulan de manera horizontal en la superficie de la membrana, en forma de alfombra, y cuando alcanzan la concentración necesaria se rompe la membrana formando micelas. Los péptidos cubren a los fosfolípidos de tal manera que lo forran y producen una fuga masiva de contenido citoplasmático (**Figura 10**) (Yeaman and Yount., 2003).

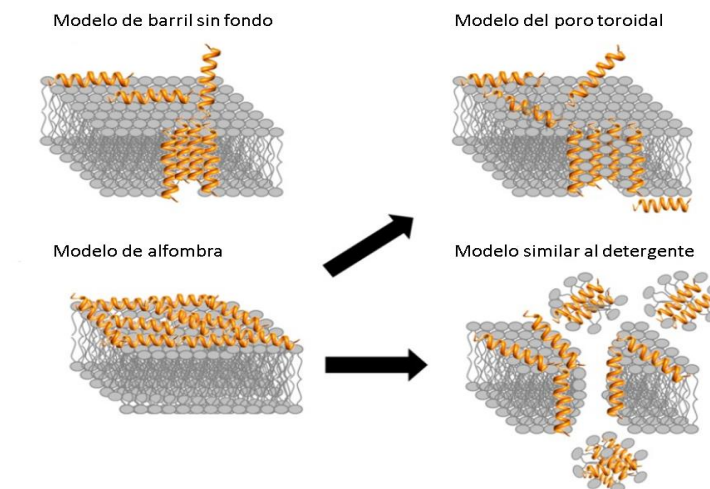


Figura 10. Mecanismos de acción de los PAC en membrana (Kumar et al., 2018)

Cabe mencionarse que las principales diferencias entre un péptido tóxico, y uno no tóxico son primero la dosis en la que se emplea y segundo su afinidad por el sitio blanco. La afinidad se encuentra dada por la secuencia de aminoácidos que los compone, tal es el caso de la cisteína, cuya presencia se asocia a la actividad hemolítica (Li et al., 2005); la estructura secundaria, en el caso los péptidos cíclicos pueden presentar una alta toxicidad, por ejemplo, la α -amanitina, que es un péptido que proviene de los hongos del género amanita y presenta alta afinidad por la enzima RNA polimerasa III (Fiume et al., 1965). En general, los mecanismos de acción de los péptidos tóxicos son muy parecidos a los mecanismos de acción de los PACs (Figura 7). Por tanto, es necesario considerar los parámetros fisicoquímicos y mecanismos de acción de los PAMs y PACs para diseñar con herramientas bioinformáticas nuevos péptidos que tengan la capacidad de internalizar en la membrana de las células eucariontes, como lo hacen los PACs previamente descritos, pero que al mismo tiempo no tengan la capacidad de destruir la membrana, ni de interferir con los procesos metabólicos de las células sanas y asegurar de esta manera que los péptidos sean selectivos a la hélice transmembranal de HER2.

2.14 La bioinformática

Con respecto al diseño de péptidos, la bioinformática ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad para el desarrollo de nuevas secuencias peptídicas con actividad anticancerígena a partir de péptidos antimicrobianos por métodos computacionales o usando diferentes estrategias del diseño racional. Esto se debe a que las herramientas bioinformáticas permiten procesar una gran cantidad de información de una manera rápida y eficiente, que se traduce en la disminución de tiempo y costo de las investigaciones. Tal es el caso de algunos programas y servidores desarrollados que permiten diseñar moléculas y simular interacciones proteína-proteína, proteína-péptido o membrana-péptido.

2.15 Diseño *in silico* o racional

El diseño racional de péptidos busca desarrollar péptidos con una función específica por tres vías diferentes. En el caso de este estudio, se busca evaluar la actividad anticancerígena de péptidos en un modelo de cáncer de mama con el objetivo de inhibir las interacciones de la hélice intramembranal del receptor de membrana HER2 con otras proteínas integrales de la membrana.

Las tres vías o enfoques que buscamos son: **a) Enfoque fisicoquímico**, en el cual se busca modificar un péptido con base en sus características fisicoquímicas para mejorar la selectividad, estabilidad y potenciar su actividad al adicionar o eliminar aminoácidos; **b) uso de platillas**, donde se usan proteínas o péptidos con una actividad deseada y se alinean para poder observar similitud de aminoácidos y de esta manera crear un nuevo péptido o realizar mutaciones sobre un péptido ya conocido; y **c) métodos computacionales**, el cual es el más innovador ya que permite el uso de servidores que se basan en aplicar modelos predictivos utilizando modelos predichos (**Figura 11**)(Liscano *et al.*, 2020).

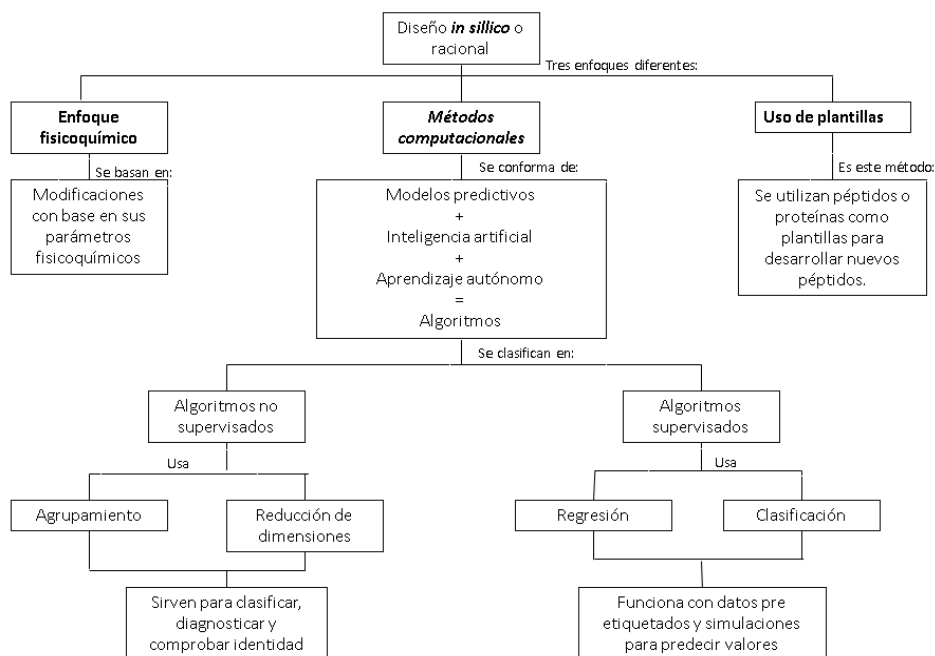


Figura 11. Se muestra de forma esquematizada el diseño *in silico* o racional de péptidos en bioinformática (Liscano *et al.*, 2020).

Para el diseño racional de péptidos se suelen utilizar algunos programas o servidores, como los que se mencionan a continuación en la **Tabla 2**:

Tabla 2. Servidores y programas utilizados para diseñar péptidos <i>in silico</i> .		
Nombre	Descripción	Referencia
UCSF Chimera	Visualizador gráfico interactivo; analiza estructuras moleculares y datos relacionados.	https://www.rbvi.ucsf.edu/chimera
PPIMem	Servidor de uso libre que calcula los motivos estructurales de interacción proteína-proteína a nivel transmembranal, que facilita la búsqueda de la secuencia específica de aminoácidos donde se lleva a cabo la unión.	https://transint.univ-evry.fr
Regex101	Software que agiliza la búsqueda de secuencias específicas de aminoácidos, utilizando una expresión regular o bien la secuencia completa de aminoácidos.	regex101: build, test, and debug regex
Membranome	Servidor y base de datos que proporciona datos estructurales y funcionales sobre proteínas transmembrana de un solo tramo	https://membranome.org/

	(bitópicas).	
AntiCP 2.0	Servidor que calcula mediante SVM la actividad anticancerígena de un péptido.	https://webs.iitd.edu.in/raghava/anticp2
CAMPPr3	Servidor que calcula mediante SVM la actividad antimicrobiana de un péptido.	http://www.camp.bicnirrh.res.in/prediction.php
ToxiPred	Servidor que calcula mediante SVM la toxicidad de un péptido.	Designing of peptides for deisred toxicity a module of ToxinPred (iitd.edu.in)
Allergent	Servidor que calcula mediante SVM la alergenicidad de un péptido.	Bioinformatics tool for allergenicity prediction. (ddg-pharmfac.net)
HemoPI	Servidor que calcula mediante SVM la actividad hemolítica de un péptido.	Hemolytic Peptide Prediction Module of HemoPI (iitd.edu.in)
GRAMM	Servidor de código abierto para hacer acoplamiento molecular.	Vakser Lab - GRAMM Web (ku.edu)

Durante el diseño *in silico* de péptidos con diferentes programas y/o servidores, se pueden manipular algunas características fisicoquímicas inherentes de cada péptido, al modificar la secuencia peptídica que lo compone, estas son:

Carga neta: es la suma de las cargas de los grupos laterales ionizables, más la carga de sus extremos amino (N) y carboxilo (C). Suele representarse con los signos -/+ y un dígito, por ejemplo; +1 o -1.

Longitud: es el número completo de los aminoácidos que componen una secuencia peptídica, pero el número de estos puede variar según el autor. Para este trabajo se define como péptido corto a las cadenas peptídicas que no superan los 35 residuos de aminoácidos. Esto representa una ventaja en el factor costo/beneficio, y se acopla al tamaño aproximado del motivo de interacción reportado para la hélice transmembranal del receptor HER2.

Punto isoeléctrico: es el pH al que una proteína/péptido tiene una carga neta de 0.

Hidrofobicidad: se refiere a la capacidad que presenta el péptido para repeler o aislarse del Agua, es dada por la suma de la hidrofobicidad individual de las cadenas laterales de los aminoácidos que componen al péptido. Al igual que la carga neta, la hidrofobicidad es importante durante la interacción con la membrana celular.

También se predicen probables actividades biológicas de los péptidos diseñados, las cuales pueden ser:

Actividad antimicrobiana: es la capacidad que tiene una molécula o sustancia de matar diferentes microorganismos. En este trabajo lo definiremos como la capacidad bactericida que presentan los péptidos. Para calcular la actividad antimicrobiana se utilizan máquinas de soporte de vectores (SVM) y bases de datos de péptidos con actividad ya probada. Dicha actividad se representa como un score con valores que van de 0 a 1, donde 0 es la menor

probabilidad de que presente actividad antimicrobiana y 1 la mayor probabilidad de que presente dicha actividad.

Actividad anticancerígena: es la capacidad que tiene una molécula o sustancia de inhibir el crecimiento de células tumorales. Para calcular la actividad anticancerígena se utilizan máquinas de soporte de vectores (SVM) y bases de datos de péptidos con actividad ya probada. Dicha actividad se representa como un score obtenido con el programa AntiCP 2.0, con valores que van de 0 a 1, donde 0 es la menor probabilidad de que presente actividad anticancerígena y 1 la mayor probabilidad de que presente dicha actividad.

Toxicidad: se define como la capacidad que tiene una sustancia para producir daño a un organismo vivo. Este parámetro se calcula utilizando el algoritmo desarrollado por Gopta (Gopta *et al.*, 2013), el cual predice si hay toxicidad.

Actividad hemolítica: es la capacidad que tiene una sustancia de lisar eritrocitos, y en este trabajo se representa con un score que va de 0 a 1. Donde 0 es no hemolítico y 1 muy hemolítico.

Índice de GRAVY: es la suma de los valores de hidropatía de todos los aminoácidos divididos por la longitud de la proteína, donde la puntuación de hidrofobicidad (unidad arbitraria) por debajo de 0 es más probable que sea globular (proteína hidrofílica), mientras que las puntuaciones superiores a 0 reflejan una probabilidad más alta ser membranosa (hidrofóbicas).

Por último, se puede predecir la interacción de los péptidos con la membrana y la estabilidad que presentan en un medio determinado. Los valores que nos permiten describir dicha relación son:

Energía de interacción: se refiere a la energía de interacción de biomoléculas, similar a la ΔG de un sistema, en donde un valor negativo representa una interacción termodinámicamente favorable.

ΔG de transferencia: indica que tan factible es la unión de un péptido con la membrana.

Angulo de inclinación en la penetración de la membrana: se ha observado que los péptidos penetran mejor la membrana celular cuando el Angulo de inclinación es mejor.

Penetración: indica la penetración total en la membrana celular en Armstrong.

2.16 Búsqueda de péptidos anticancerígenos *in silico*

Existen bases de datos de péptidos antimicrobianos que permiten usar la información con la que cuentan de manera gratuita o mediante pagos de acuerdo con la forma de uso. Dichos péptidos tienen potencial para ser utilizados contra células cancerosas, y en específico para este trabajo inhibir la actividad de algunos receptores de interés. Tal es el caso del receptor HER2, que se encuentra especialmente relacionado con células del cáncer de mama HER2 positivo.

2.17 Base de datos de proteínas y péptidos anticancerígenos (CancerPPD)

CancerPPD es una base de datos que contiene información de péptidos y proteínas anticancerígenas; por ejemplo, actividad anticancerígena, naturaleza del péptido, origen del péptido, la quiralidad, la secuencia de aminoácidos, las modificaciones de los terminales N y C, la estructura del péptido, la fuente del péptido, líneas celulares objetivo, herramientas de mapeo de péptidos y búsqueda de similitudes. Todo esto facilita la búsqueda de péptidos y motivos similares a una secuencia de consulta. Además, CancerPPD vincula bases de datos importantes como CCLE y COSMIC para proporcionar al usuario información completa sobre varias líneas de células cancerosas.

En este trabajo proponemos un nuevo mecanismo de acción para los PACs, que nombramos como “**modulación de la interacción proteína-proteína a nivel transmembranal**”. Este consiste en inhibir la interacción de los dominios transmembranales de los receptores de membrana, que están implicados en la formación de dímeros o complejos proteicos en el desarrollo del cáncer. Para este trabajo decidimos diseñar péptidos con la capacidad de internalizar en la membrana celular e inhibir las posibles interacciones del receptor HER2.

III. Justificación

El surgimiento de la resistencia a los tratamientos más utilizados contra el cáncer de mama HER2 positivo, tales como las mutaciones o pérdidas de los dominios de interacción de los anticuerpos debido al uso de quimioterapias y tratamientos biológicos (inmunoquímica), hacen necesario el desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento, dirigidas a regiones altamente conservadas, como la hélice transmembranal de HER2 fuertemente implicada en la formación de homodímeros o heterodímeros con actividad cinasa.

IV. Hipótesis

Será posible desarrollar nuevas alternativas de tratamiento contra el cáncer de mama, al generar péptidos a partir del uso de herramientas bioinformáticas que posean la capacidad de penetrar diferentes membranas de células cancerígenas y de interrumpir la interacción proteína-proteína de membrana que estén involucradas en cáncer de mama; por ejemplo, la inhibición del acoplamiento de dos proteínas de membrana HER2:HER2. De ser posible esto representará un nuevo enfoque y alternativa en el tratamiento del cáncer.

V. Objetivo general

Diseñar péptidos cortos que tengan la capacidad de actuar como anticancerígenos al inhibir interacciones transmembranales de las hélices de las proteínas de membrana HER2:HER2 de

interés terapéutico implicadas en el cáncer de mama, destruyendo a las células tumorales o inhibiendo su crecimiento.

5.1 Objetivos particulares

1. Identificar péptidos plantilla candidatos para desestabilizar los complejos de HER2:HER2 en bases de datos de péptidos anticancerígenos.
2. Determinar y analizar las interacciones producidas por los motivos estructurales HER2:HER2.
3. Diseñar péptidos candidatos a inhibir la interacción de la hélice transmembranal de HER2.
4. Caracterizar fisicoquímicamente y predictivamente a los péptidos candidatos.

VI. Metodología

6. Diagrama de flujo

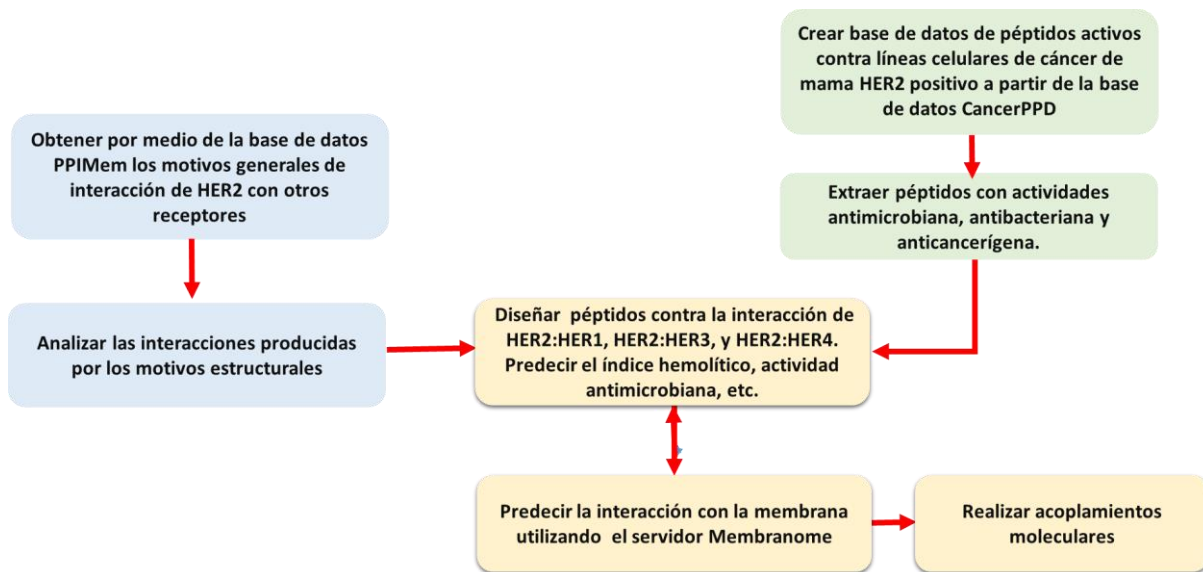


Figura 12. Se muestra de forma esquemática la metodología seguida en el diseño racional de péptidos candidatos a inhibir el complejo proteico formado por el homodímero del receptor HER2.

6.1 Obtención de los motivos estructurales de HER2 y proteínas asociadas

Con ayuda del servidor PPIMem (<https://transint.univ-evry.fr>) se determinó el motivo estructural de interacción de HER2 (en una secuencia de expresión regular) y el motivo estructural de las proteínas con las que HER2 interactúa. A continuación, se realizó una investigación bibliográfica buscando aquellas proteínas de interacción que estuvieran asociadas

a cáncer y contaran con una estructura cristalizada. Posteriormente, se descargaron en formato Fasta las secuencias de HER2 y las proteínas asociadas a cáncer. Con ayuda de la plataforma Regex101, se buscaron las secuencias completas de los motivos estructurales.

6.2 Creación de la base de datos de péptidos con actividad en líneas celulares de cáncer de mama

Se creó una primera base de datos al realizar una búsqueda de péptidos con una longitud igual o menor a 35 aminoácidos y con actividad anticancerígena reportada en líneas celulares de cáncer de mama, en la base de datos de proteínas y péptidos anticancerígenos (CancerPPD). Se definieron sus características, como carga neta, porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos, tipo de aminoácidos presentes en la cadena, tipo de estructura y origen.

6.3 Selección de péptidos con actividad antimicrobiana-anticancerígena

Se seleccionaron los péptidos con actividad en líneas celulares de cáncer de mama HER2 positivo, y se definieron características fisicoquímicas como carga neta, porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos, tipo de aminoácidos presentes en la cadena, tipo de estructura y origen.

6.4 Desarrollo de péptidos candidatos

Se realizaron alineamientos con los motivos estructurales de interacción de los diferentes receptores de membrana y los péptidos con actividad antimicrobiana-anticancerígena seleccionados de la base de datos que se creó. Posteriormente, se realizaron mutaciones puntuales en los péptidos, buscando mantener los aminoácidos que interaccionan con HER2, y se caracterizaron fisicoquímicamente.

6.5 Predicción de actividad peptídica

Fueron evaluados los péptidos candidatos con los siguientes servidores: la actividad anticancerígena se evaluó con **AntiCP 2.0** (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/anticp2>); la actividad antimicrobiana se evaluó con **CAMPR3** (<http://www.camp.bicnirrh.res.in/prediction.php>); la capacidad de producir toxicidad se evaluó con **ToxiPred** ([Designing of peptides for deisred toxicity a module of ToxinPred \(iiitd.edu.in\)](http://designingofpeptidesfordeisredtoxicitya.moduleofToxinPred(iiitd.edu.in))); y la capacidad de producir hemólisis se calculó con **HemoPI** ([Hemolytic Peptide Prediction Module of HemoPI \(iiitd.edu.in\)](http://hemolyticpeptidepredictionmoduleofHemoPI(iiitd.edu.in))) y **AllerTop** ([Bioinformatics tool for allergenicity prediction. \(ddg-pharmfac.net\)](http://ddg-pharmfac.net)).

6.6 Determinación de la interacción péptido-membrana

Se evaluó la interacción péptido-membrana en el servidor FMAP de Membranome para predecir los dominios de TM de los péptidos y generar sus modelos 3D en la bicapa lipídica. El software primero calculó las diferencias de energía libre de los segmentos helicoidales no unidos a la membrana y helicoidales unidos a la membrana. Posteriormente, se calculó la partición de energía más baja de la cadena polipeptídica en segmentos α -helicoidales mediante el algoritmo de programación dinámica o promediando diferentes particiones helicoidales-helicoidales. Por último, generaron los modelos 3D y el posicionamiento de la α -hélices predichas en membrana DOPC, eucarionte y solución acuosa. Además, se realizó una simulación de la penetración e interacción del péptido en las membranas antes mencionadas (<https://membranome.org/fmap>).

6.7 Docking molecular

6.7.1 Preparación de los ligandos

Se modelaron los péptidos en el servidor Membranome, para membrana de célula eucarionte, a pH 7 y una temperatura estándar de 25 °C (<https://membranome.org/fmap>).

6.7.2 Preparación del receptor HER2

Se descargó de la base de datos Protein Data Bank (PDB) la estructura cristalina con código de identificación 2N2A, correspondiente a la hélice transmembranal del receptor HER2. Se utilizó Pymol para limpiar el cristal, y sólo se conservó la hélice A que corresponde al motivo intramembranal de interacción de HER2.

6.8 Acoplamiento molecular de HER2 con las bases de datos

Se utilizó GRAMM, un servidor de código abierto para realizar un acoplamiento molecular, ya que se pueden realizar acoplamientos tanto proteína-proteína como proteína-ligando. GRAMM mapea sistemáticamente el panorama de la energía intermolecular prediciendo un espectro de poses de acoplamiento correspondiente a interacciones de proteínas estables (mínimos de energía profunda) y transitorias (mínimos superficiales). Posteriormente se minimizó la estructura con ayuda del programa Chimera USF ([Vakser Lab - GRAMM Web \(ku.edu\)](http://vakserlab.org/GRAMMWeb)).

VII. Resultados

7.1 Obtención de los motivos estructurales de HER2 y proteínas asociadas

Con ayuda de PPIMem se determinó el motivo estructural de interacción de la hélice transmembranal de HER2 con los receptores de membrana a los que se asocia. PPIMem señaló el siguiente motivo de interacción: “I. {3} V. {3} L. {2} VL. {6} L.” (presentado en su denominada “nomenclatura regular”) como el motivo estructural de interacción de HER2. La secuencia regular corresponde a los aminoácidos I12, V16, L20, V23, L24, V27 y L31 (2N2A). PPIMem también se calculó posibles interacciones con 87 proteínas de membrana diferentes, de las cuales sólo 6 cuentan con estructura cristalizada y sólo 1 está relacionada con el desarrollo del cáncer. Las secuencias completas de los motivos de interacción de aminoácidos de HER2 y los 6 receptores se observaron con regex101. Para HER2, la secuencia completa es “I12, S13, A14, V15, V16, G17, I18, L19, L20, V21, V22, V23, L24, G25, V26, V27, F28, G28, I29, L30” (**Tabla 3**).

Tabla 3. Se muestran las secuencias completas de los aminoácidos que corresponden a la secuencia regular de las 6 proteínas que cuentan con estructura cristalizada.

Código Uniprot	Nombre	Posición de los aminoácidos en la secuencia completa
P04626	HER2	I SAVV G I L L V V V L G V V F G I L (654-674)
Q14573	ITPR3	F L Y H V G Y I L T S V L G L F A H E L (2319-2339)
O15118	NPC1	I F V G V L S F S I A V L N K V D I G L (840-850)
P25024	CXCR1	I F A V V L I F L L C W L P Y N L V L L (243-263)
Q25103	NK1R	I Y E K V Y H I C V T V L I Y F L P L L (190-210)
P29274	AA2AR	L A I A V L A I L G N V L V C W A V W L (13-33)
P11229	ACM1	I S F K V N T E L K T V N N Y F L L S L (47-67)

En color verde se indican a los aminoácidos conservados del sitio de interacción, y en azul a las mutaciones.

Dada la gran información bibliográfica de la interacción de HER2 con los otros miembros de la familia EGFR (HER1, HER3 y HER4), se agregaron estos a la lista de proteínas que interaccionan con HER2 y se estudió su motivo de interacción, sumando en total 91 receptores de membrana. Se observó para HER3 el motivo de interacción “I.{2}LV.IF. {2}L.{3}F”, para HER1 el motivo “M.{3}L.{2}LL.{2}AL.{2}GL”, y para HER4 “PL.{2}AG.{3}G.{2}IL.{2}V” (**Tabla 4**).

Tabla 4. Se observan los motivos de interacción predichos por PPIMem para los miembros de la familia EGFR. Los motivos de interacción son diferentes para cada receptor.

Código Uniprot	Nombre	Posición de los aminoácidos en la secuencia completa
P00533	HER1	M V G A L L L L L V V A L G I G L (649-666)
P21860	HER3	I A G L V V I F M M I G G T F (648-663)
Q15303	HER4	P L I A A G V I G G L F I L V I V (650-667)

En el alineamiento de las secuencias completas de los motivos estructurales de los receptores se puede observar la siguiente secuencia consenso “I+VLVVCFLLCVLSLLR++LL”, en donde se presenta una fuerte preservación (igual o superior al 50 %) en los aminoácidos: I1, V5, V6, L9, L10, L13y L20 (**Figura 13**).



Figura 13. Se observa el alineamiento del motivo de interacción PPIMem de los 6 receptores que interaccionan con HER2.

7.2 Selección de péptidos con actividad antimicrobiana-antibacteriana

Para junio del 2023, la base de datos CancerPPD cuenta con 3,491 entradas de péptidos anticancerígenos. Los tres tipos de cáncer que cuentan con más registros en la base de datos son: colon, con 541 entradas; piel, con 509; y mama, con 438 (**Figura 14**). De las aproximadamente 438 entradas de los péptidos que presentaron actividad contra cáncer de mama, se encontró que el 99.5% corresponde a 436 péptidos pequeños iguales o menores a 38 aminoácidos de longitud.

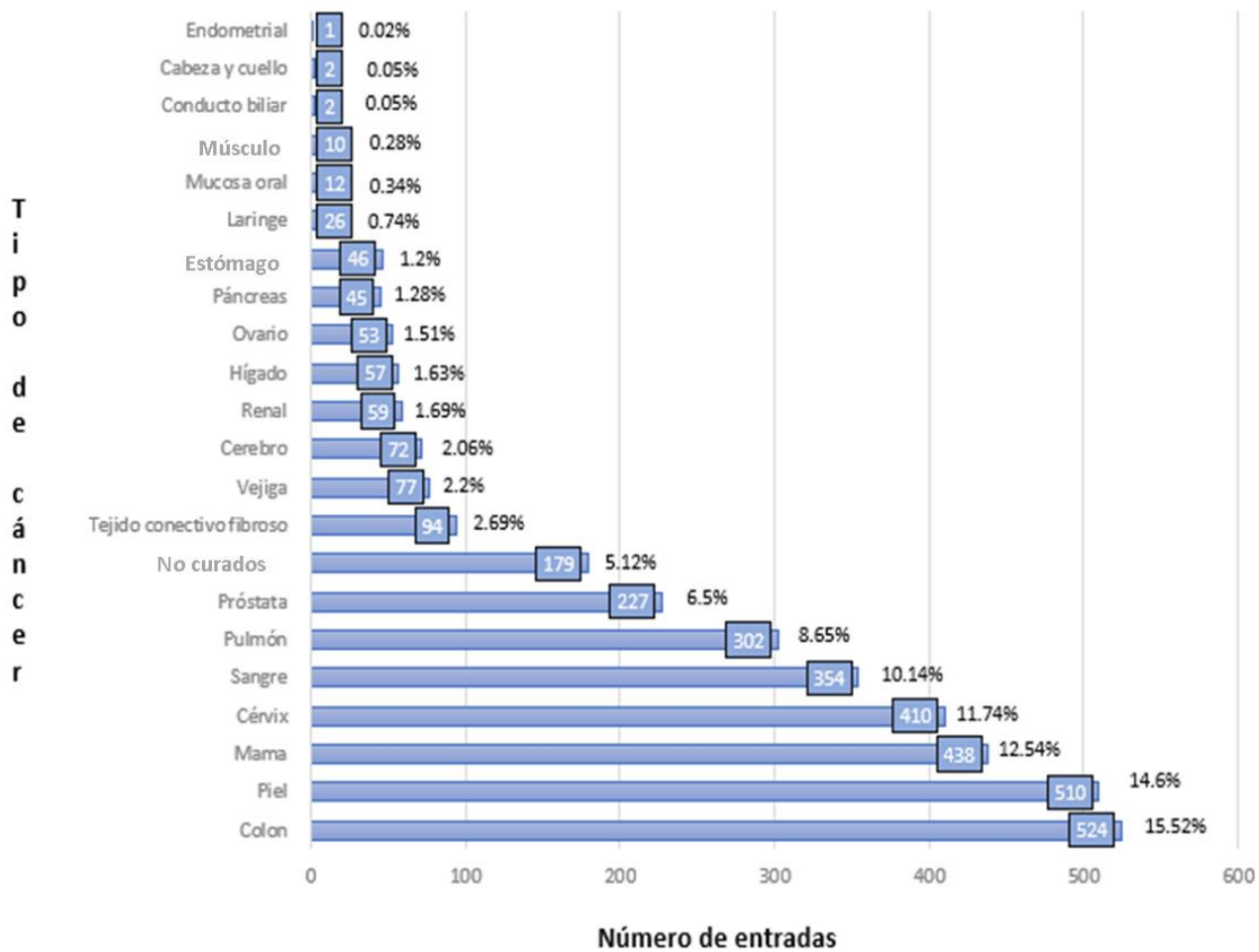


Figura 14. Número total y porcentajes de entradas de péptidos por tipo de cáncer.

De las 436 entradas de los péptidos que presentaron actividad contra cáncer de mama, se encontraron un total de 3 entradas para líneas celulares de cáncer de mama HER2 positiva: BT-474, SKBR-3 y MCF7 (**Figura 11**). En la línea celular SKBR-3, los péptidos NRC-03, NCR-07 y NCR-13 presentaron actividad anticancerígena. En las líneas celulares BT-474 y SKBR-3, los péptidos que presentaron actividad anticancerígena son Lytik y el péptido lítico híbrido del receptor de transferrina (TfR). Por último, en la línea celular MCF7 sólo se cuenta con reporte del péptido cecropina-B aislado de la hemolinfa de la polilla de seda gigante (*Hyalophora cecropia*) (**Tabla 5**). Para este trabajo no se consideraron a los péptidos Lytik y TfR, ya que son péptidos quiméricos diseñados específicamente para el receptor transferril 1.

Tabla 5. Se muestran las características fisicoquímicas calculadas de los PAC con actividad en las líneas celulares HER2 positivo. PI: punto isoeléctrico. La hidrofobicidad se muestra en %.

Línea celular	Nombre	Secuencia	Carga	PI	Hidrofobicidad	Índice de GRAVY
SK-BR-3 y BT-474	Lytik	KLLKLLKkLLKLLKkK	8	11.7	53	0.176
SK-BR-3 y BT-474	TfR	THRPPMWSFVWPGGKLLKLLkKLLKLLKkK	9	12.2	39	-0.231
SKBR-3	NRC-03	GRRKRKWLRRIGKGVKIIGGAALDHL	8	12.7	38.47	-0.576
SKBR-3	NRC-07	RWGKWFKKATHVGVKAVGKAALTAYL	6	11.4	44	-0.404
SKBR-3	NRC-13	GWRTLLKKAIEVKTGVKLLALKHYL	5	11	43.48	-0.178
MCF-7R	Cecropin B	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAL	7	11.5	48.57	-0.071

Se realizó un alineamiento entre las secuencias de los péptidos de la familia NRC y se encontró la secuencia consenso siguiente: **GRRWRKWLKKA+++VK+VGKAAL+HYL (Figura 15).**

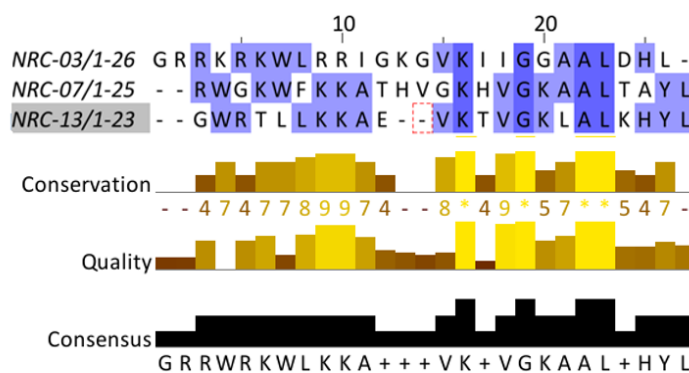


Figura 15. Imagen ilustrativa generada en Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y visualizada en Jalview (Waterhouse et al.,2009) del alineamiento de los péptidos de la familia NCR. Se muestran en la parte superior de la figura en color azul a los aminoácidos que presentaron más del 50 % de conservación y en la parte inferior la secuencia consenso de los péptidos NCR.

7.3 Diseño de péptidos candidatos

Debido a las mutaciones observadas en los motivos de interacción transmembranal de los receptores asociados a HER2, se decidió diseñar las variantes a partir del péptido cecropin B, la secuencia consenso de los péptidos de la familia NRC y el motivo de interacción del receptor HER2. Se seleccionaron como plantillas al péptido Cecropin B y a la secuencia consenso de los péptidos miembros de la familia NRC. Dichas secuencias peptídicas se seccionaron en tres segmentos con longitud de 20 aminoácidos cada uno. Posteriormente se alinearon con el motivo de interacción de los receptores y se generaron las variantes al insertar los residuos de aminoácidos del motivo de interacción del receptor HER2 en los péptidos plantilla, respetando las posiciones: "11, V15, L9, V12, L13 y L20". En las posiciones 6-8 y 10-11 las mutaciones realizadas buscaban mantener una zona hidrofóbica. En cuanto a las mutaciones en las posiciones 1-4 y 14-19, se buscó mantener a los aminoácidos cargados positivamente para

mejorar la interacción de los extremos de los péptidos con la parte de la membrana celular que contiene los grupos fosfatos de los fosfolípidos cargados positivamente, y producir así un efecto de anclaje (Tabla 6).

Tabla 6. Tabla con múltiples alineamientos entre la secuencia consenso de los péptidos NRC, Cecropin B y el motivo de interacción de los receptores.

Nombre	Secuencia	Alineamientos									
Motivo HER2	I.{3}V.{3}L.{2}VL.{6}L	Segmento	I	{3}	V	{3}	L	{2}	VL	{6}	L
Secuencia consenso NRC	GRRWRKWLKKA+++VK+VGKAAL+HYL	1	G	RRW	R	KWL	K	KA	++	+VK+VG	K
	GRRWRKWLKKA+++VK+VGKAAL+HYL	2	R	KWL	K	KA+	+	+V	K+	VGKAAL	+
	GRRWRKW LKKA+++VK+VGKAAL+HYL	3	L	KKA	+	++V	K	+V	GK	AAL+HY	L
Cecropin B	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAL	1	K	WKV	F	KKI	E	KM	GR	NIRNGI	V
	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAL	2	I	EKM	G	RNI	R	NG	IV	KAGPAI	A
	KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAL	3	R	NGI	V	KAG	P	AI	AV	LGEAKA	L

Se generaron 18 péptidos candidatos, los cuales presentaron un punto isoeléctrico que va de 10.4 a 12.8, un porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos de 75 a 80%, y un índice de GRAVY positivo de 1.75 a 2.33. Brevemente, el punto isoeléctrico indica el pH en el que los péptidos mantienen su actividad; la hidrofobicidad nos indica qué tan fácil es la internalización de los péptidos en la membrana; y un índice de GRAVY positivo representa una probabilidad alta de que el péptido o proteína sea membranosa (Tabla 7).

Tabla 7. Variantes desarrolladas por alineamiento de secuencia y sus características fisicoquímicas. La hidrofobicidad se presenta en %. PI= punto isoeléctrico.

Nombre	Secuencia	PI	Hidrofobicidad	Índice de GRAVY
JMR-1	<u>I</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>W</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>W</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>L</u>	12.8	80	1.735
JMR-2	<u>I</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>W</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>L</u>	12	80	1.85
JMR-3	<u>I</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>W</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>W</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>L</u>	11.8	80	1.735
JMR-4	<u>I</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>L</u>	12.8	75	1.885
JMR-5	<u>I</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>L</u>	12.6	75	1.955
JMR-6	<u>I</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>L</u>	10.9	75	1.97
JMR-7	<u>I</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>H</u> <u>L</u>	11	75	1.995
JMR-8	<u>I</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>H</u> <u>L</u>	10.7	75	1.89
JMR-9	<u>I</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>Y</u> <u>H</u> <u>L</u>	10.4	75	1.84
JMR-10	<u>I</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>L</u>	12.6	80	2.02
JMR-11	<u>I</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>L</u>	12.6	75	1.75
JMR-12	<u>I</u> <u>K</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>K</u> <u>L</u>	12	80	1.98
JMR-13	<u>I</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>L</u>	10.9	80	2.335

JMR-14	<u>I</u> KV <u>K</u> V <u>L</u> VILVIV <u>L</u> VALRL <u>K</u> <u>L</u>	12	80	2.335
JMR-15	<u>I</u> KIR <u>V</u> ALILIA <u>V</u> LALVK <u>L</u> <u>K</u> <u>L</u>	12	80	2.13
JMR-16	<u>I</u> RKIV <u>A</u> VALIA <u>V</u> LALAL <u>K</u> <u>R</u> <u>L</u>	12.6	80	1.865
JMR-17	<u>I</u> RKIV <u>A</u> VILAI <u>V</u> LALV <u>A</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>L</u>	12.6	80	2.02
JMR-18	<u>I</u> RKIV <u>A</u> VFLIV <u>V</u> L <u>L</u> VI <u>A</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>L</u>	12.6	80	2.19

Se muestra subrayado al motivo de interacción del receptor HER2, el cual se mantiene en los péptidos diseñados.

7.4 Predicción de actividad peptídica

Los péptidos candidatos mostraron no ser probablemente tóxicos, al tener un índice hemolítico por debajo de 0.5, lo que indica una baja probabilidad de producir hemólisis. La mitad de los candidatos presentaron una probable actividad antimicrobiana, y sólo 9 presentaron un índice de probable actividad anticancerígena por encima del score de 0.5 (**Tabla 8**).

Tabla 8. Caracterización de las probables actividades peptídicas. En color naranja se muestran las variantes con índice de actividad anticancerígena por arriba del 0.5%.

Nombre	Índice hemolítico	Actividad antimicrobiana	Actividad anticancerígena	Toxicidad
JMR-1	0.49	0.482	0.37	No tóxico
JMR-2	0.49	0.412	0.41	No tóxico
JMR-3	0.49	0.423	0.65	No tóxico
JMR-4	0.48	0.971	0.52	No tóxico
JMR-5	0.48	0.959	0.39	No tóxico
JMR-6	0.47	0.928	0.64	No tóxico
JMR-7	0.48	0.916	0.46	No tóxico
JMR-8	0.48	0.972	0.45	No tóxico
JMR-9	0.48	0.963	0.70	No tóxico
JMR-10	0.49	0.246	0.45	No tóxico
JMR-11	0.49	0.801	0.47	No tóxico
JMR-12	0.51	0.329	0.51	No tóxico
JMR-13	0.49	0.830	0.55	No tóxico
JMR-14	0.48	0.318	0.45	No tóxico
JMR-15	0.47	0.553	0.51	No tóxico
JMR-16	0.49	0.884	0.51	No tóxico
JMR-17	0.49	0.793	0.50	No tóxico
JMR-18	0.49	0.637	0.32	No tóxico

7.5 Desarrollo de nuevos péptidos candidatos

Con el servidor AntiCP 2.0, que permite por identificación virtual definir las mutaciones mínimas necesarias para aumentar el potencial anticancerígeno (cambio de un aminoácido), se diseñaron 11 nuevos péptidos candidatos a partir de las variantes JMR-3 y JMR-9 (**Tabla 9**), las cuales presentaron los scores más altos de probabilidad anticancerígena, con 0.65 y 0.70, respectivamente (**Tabla 8**).

Tabla 9. Péptidos generados a partir del servidor AntiCP 2.0.				
Nombre	Secuencia	Índice de GRAVY	Actividad antimicrobiana	Actividad anticancerígena
JMR-19	<u>I</u> RHWV <u>S</u> WV <u>L</u> I <u>A</u> V <u>L</u> AVAHV <u>K</u> <u>L</u>	1.470	0.576	0.77
JMR-20	<u>I</u> AHWV <u>I</u> WV <u>L</u> I <u>A</u> V <u>L</u> AVAHV <u>K</u> <u>L</u>	2.050	0.490	0.75
JMR-21	<u>I</u> QHWV <u>I</u> WV <u>L</u> I <u>A</u> V <u>L</u> AVAHV <u>K</u> <u>L</u>	1.785	0.611	0.75
JMR-22	<u>I</u> RHWV <u>Y</u> WV <u>L</u> I <u>A</u> V <u>L</u> AVAHV <u>K</u> <u>L</u>	1.445	0.392	0.75
JMR-23	<u>I</u> KKAV <u>A</u> IV <u>L</u> AIV <u>L</u> LALHL <u>H</u> <u>L</u>	2.095	0.961	0.84
JMR-24	<u>I</u> KKAV <u>A</u> IV <u>L</u> AIV <u>L</u> LHLHY <u>H</u> <u>L</u>	1.590	0.970	0.83
JMR-25	<u>F</u> KKAV <u>A</u> IV <u>L</u> AIV <u>L</u> LALHY <u>H</u> <u>L</u>	1.755	0.965	0.78
JMR-26	<u>I</u> KKAV <u>A</u> IV <u>L</u> AIV <u>L</u> LALAY <u>H</u> <u>L</u>	2.090	0.946	0.78
JMR-27	<u>I</u> KKAK <u>A</u> IV <u>L</u> AIV <u>L</u> LALHL <u>H</u> <u>L</u>	1.690	0.984	0.90
JMR-28	<u>F</u> KKAV <u>A</u> IV <u>L</u> AIV <u>L</u> LALHL <u>H</u> <u>L</u>	2.010	0.973	0.89
JMR-29	<u>I</u> KKAK <u>A</u> IV <u>L</u> AIV <u>L</u> LMLHL <u>H</u> <u>L</u>	1.695	0.963	0.94

Las características fisicoquímicas que presentaron fueron: Carga: 1-3. Punto isoeléctrico: 10.4-11.8. Hidrofobicidad: 70-80%. Scores cercanos a cero implican una menor actividad antimicrobiana/ anticancerígena y cercanos a uno una alta actividad antimicrobiana/ anticancerígena.

7.6 Determinación de la interacción péptido-membrana

7.6.1 Determinación de la estabilidad de los péptidos candidatos en agua

Con el servidor Membranome se determinó la estabilidad de los péptidos candidatos en agua, de las 29 variantes evaluadas solo 13 (**Tablas 9 y 10**) presentaron una probable estabilidad en un solo segmento, que por lo general se encontró entre los residuos 3 al 17, pero con valores positivos (**Tabla 10**). Dicha estabilidad puede estar siendo dada por la hidrofobicidad de los péptidos que va del 70 al 80 % y nos indica que las variantes no se van a ver afectadas estructuralmente por la presencia de agua.

Tabla 10. Péptidos candidatos con segmentos de la secuencia peptídica con estabilidad en agua, donde se indican los candidatos que no presentaron estabilidad en agua (NP).

Nombre	N	Segmento	Secuencia	Estabilidad relativa en agua (kcal/mol)
JMR-1	NP	NP	NP	NP
JMR-2	1	3-16	KWVLWVLI AVLVLV	2
JMR-3	1	3-15	HWVIWVLI AVLAV	2
JMR-4	NP	NP	NP	NP
JMR-5	NP	NP	NP	NP
JMR-6	NP	NP	NP	NP
JMR-7	1	12-16	VLLAL	2.5
JMR-8	1	9-17	LVAVLLALK	1.9
JMR-9	1	9-17	LVAVLLALK	1.9
JMR-10	1	3-15	WKVFLILVAVLVI	2.8
JMR-11	1	3-16	WKVFLILV LVLASL	0.5
JMR-12	1	7-16	AILVIVLAIL	3
JMR-13	NP	NP	NP	NP
JMR-14	NP	NP	NP	NP
JMR-15	NP	NP	NP	NP
JMR-16	1	12-17	VLALAL	2.9
JMR-17	NP	NP	NP	NP
JMR-18	NP	NP	NP	NP
JMR-19	1	4-.14	WVSWVLI AVLVA	1.4
JMR-20	1	3-.15	HWVIWVLI AVLAV	2.1
JMR-21	1	3-.15	HWVIWVLI AVLAV	2.4
JMR-22	1	4-.16	WVYWVLI AVLAVA	0.6
JMR-23	N/A	N/A	N/A	N/A
JMR-24	N/A	N/A	N/A	N/A
JMR-25	N/A	N/A	N/A	N/A
JMR-26	N/A	N/A	N/A	N/A
JMR-27	N/A	N/A	N/A	N/A
JMR-28	N/A	N/A	N/A	N/A
JMR-29	1	12-.15	VLLM	3.4

7.6.2 Determinación de la interacción péptido-membrana eucarionte

Los péptidos candidatos mostraron una energía de interacción que va de -10.7 a -15.4 kcal/mol, un ángulo de inclinación que va de 2 a 7, y una penetración que va de 6.2 a 30.8 Å. El primer valor nos indica una buena interacción con la membrana; y el ángulo de inclinación y

penetración identificados nos sugiere la probabilidad de interacción con el receptor HER2, ya que pueden ser internalizados en la membrana y ser perpendiculares a ella (**Tabla 11**).

Tabla 11. Energía de interacción de los péptidos candidatos con membrana eucarionte, así como el ángulo de inclinación y penetración.

Nombre	Energía de interacción kcal/mol	Segmento	ΔG de transferencia (kcal/mol)	Ángulo (°)	Penetración (Å)
JMR-1	-11.1	4-19	-12.0	4	30.4
JMR-2	-11.7	2-19	-12.3	11	30.5
JMR-3	-13.2	2-19	-14.6	7	30.8
JMR-4	-11.6	2-19	-14.2	9	30.0
JMR-5	-11.5	4-19	-6.6	74	6.2
JMR-6	-13.0	2-19	-16.7	10	29.6
JMR-7	-14.8	3-19	-14.7	5	28.8
JMR-8	-12.3	2-19	-15.6	4	30.3
JMR-9	-12.3	2-19	-15.6	4	30.3
JMR-10	-13.8	4-19	-13.4	6	28.7
JMR-11	-12.1	4-19	-11.7	3	29.4
JMR-12	-13.0	4-19	-12.7	2	28.8
JMR-13	-13.4	1-19	-19.6	2	30.8
JMR-14	-13.5	2-19	-16.4	6	30.3
JMR-15	-10.7	1-19	-14.9	8	30.3
JMR-16	-11.7	4-19	-7.9	4	29.3
JMR-17	-12.8	4-19	-10.7	8	29.5
JMR-18	-15.4	4-19	-17.0	6	29.4
JMR-22	-8.7	4-19	-8.2	3	28.2
JMR-23	-13.2	4-19	-17.1	6	30.7
JMR-24	-10.7	4-19	-15.5	9	28.7
JMR-25	-13.5	4-19	-17.0	4	29.1
JMR-26	-14.1	4-19	-17.9	14	30.3
JMR-27	-9.0	4-19	-12.7	7	30.7
JMR-28	-13.5	4-19	-8.7	5	29.7
JMR-29	-10.6	4-19	-14	6	30.7

7.6.3 Mejores péptidos candidatos

Se seleccionaron los péptidos candidatos con menor actividad antimicrobiana para evita la lisis de la membrana celular y con una mejor actividad anticancerígena para elevar la probabilidad de obtener candidatos más a fines células tumorales de cáncer de mama. Los mejores candidatos fueron las variantes JMR-3, JMR-20 y JMR-22 (**Tabla 12**).

Tabla 12. Se observan los péptidos candidatos generados, que presentaron las siguientes características: carga: +1-+3; longitud: 20 aminoácidos; índice de GRAVY: 1.44- 2.09.

Nombre	Energía de unión (kcal/mol)	ΔG de transferencia (kcal/mol)	Angulo de inclinación (°)	Penetración en membrana (Å)
JMR-29	-11.5	-14.1	6	30.
JMR-27	-9.9	-12.7	7	30.7
JMR-28	-14.3	-9	5	29.7
JMR-23	-14	-17.1	6	30.7
JMR-24	-11.6	-15.5	9	28.7
JMR-20	-15.9	-16.9	4	28.9
JMR-22	-9.5	-8.2	3	28.2
JMR-9	-12.3	-15.6	4	30.3
JMR-3	-13.2	-14.6	7	30.8
JMR-6	-13	-16.7	10	29.6

En cuanto a la interacción en la membrana, se observó que las variantes JMR- 3, JMR-20 y JMR-22 mantienen una buena penetración de membrana y una buena interacción, que va de -9.5 a -15.9 kcal/mol (**Tabla 13**).

Tabla 13. Valores de la interacción de los péptidos candidatos en la membrana. Se marcan en color gris a los péptidos candidatos.

Nombre	Energía de unión (kcal/mol)	ΔG de transferencia (kcal/mol)	Angulo de inclinación (°)	Penetración en membrana (Å)
JMR-29	-11.5	-14.1	6	30.7
JMR-27	-9.9	-12.7	7	30.7
JMR-28	-14.3	-9	5	29.7
JMR-23	-14	-17.1	6	30.7
JMR-24	-11.6	-15.5	9	28.7
JMR-20	-15.9	-16.9	4	28.9
JMR-22	-9.5	-8.2	3	28.2
JMR-9	-12.3	-15.6	4	30.3
JMR-3	-13.2	-14.6	7	30.8
JMR-6	-13	-16.7	10	29.6

Adicionalmente, se observó una correlación positiva entre el índice de actividades antimicrobiana y anticancerígena. Ciertamente, mientras más alto sea el índice de actividad antimicrobiana, más alto el índice de actividad anticancerígena, excepto por los candidatos JMR-3, JMR-20 y JMR-22 (**Figura 16**).

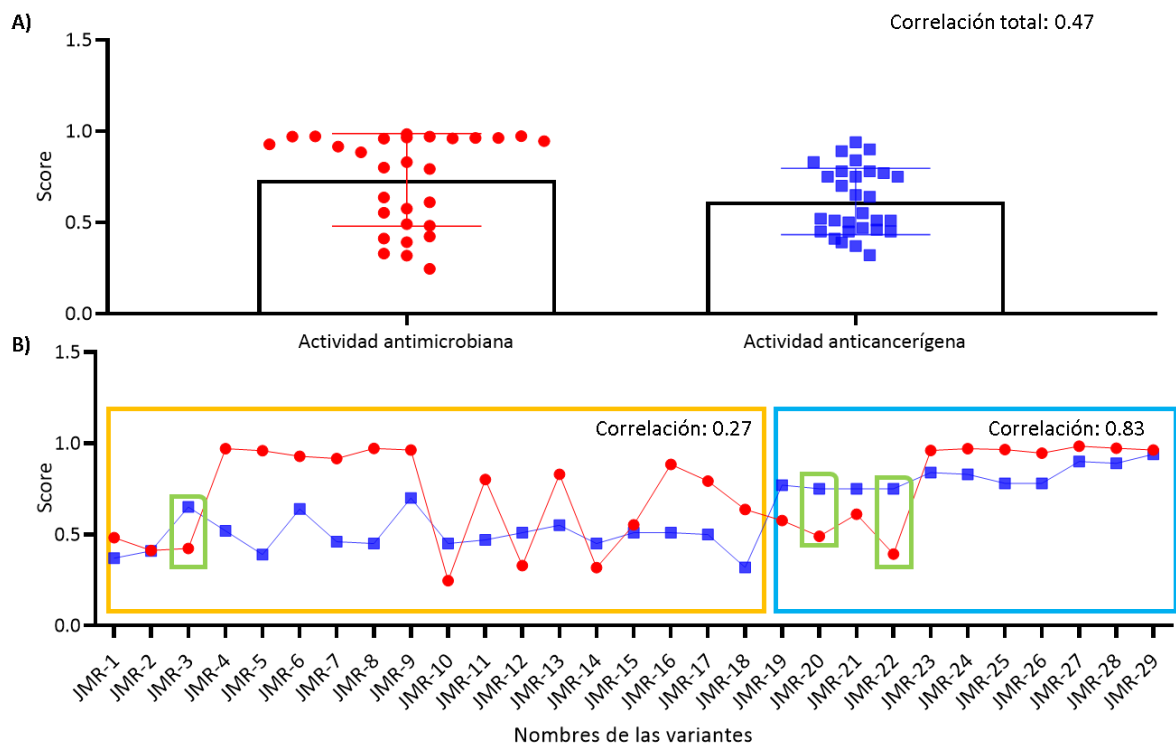


Figura 16. Correlación determinada por el método de Spearman. A) Se muestra la correlación existente entre la actividad antimicrobiana y anticancerígena de todas las variantes agrupadas. B) Se puede apreciar el aumento en la correlación entre las actividades anticancerígenas y antimicrobianas de las primeras 18 variantes con respecto de las 11 variantes generadas a partir de los péptidos JMR-3 y JMR-9. En color verde se marcan los péptidos con mayor actividad anticancerígena y menor actividad antimicrobiana.

Todos los péptidos candidatos mostraron una penetración de 28.2 a 30.7 Å, lo que indica una probabilidad más alta de interactuar con la hélice transmembranal de HER2 (**Figura 17**).

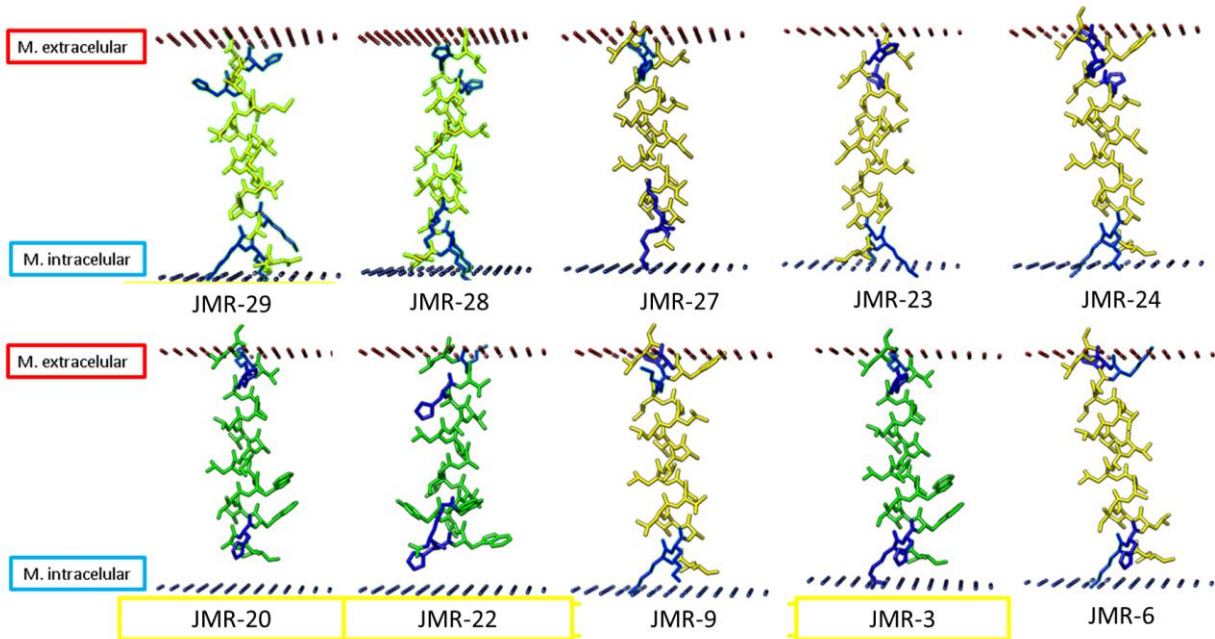


Figura 17. Representación gráfica de la penetración de los péptidos en membrana eucarionte. En color amarillo se indican a los considerados mejores candidatos a sintetizar.

7.7 Acoplamiento molecular proteína-ligando

Los complejos proteína-ligando de la hélice transmembranal de HER2, y los péptidos candidatos JMR-3, JMR-20 y JMR-22, presentaron una energía de interacción que favorece la formación del complejo proteína-péptido, esta energía va de los -186 a -179 kcal/mol lo que inhibiría la formación no solo del homodímero HER2:HER2, sino que también de los heterodímeros HER2:HER1, HER2:HER3, HER2:HER4, inhibiendo así la proliferación de las células cáncer de mama y deteniendo la formación de tumores malignos. Aquí se observan las energías de interacción entre la hélice transmembranal de HER2 y 3 de los péptidos obtenidos además de los ángulos en que ambas moléculas se giran para interactuar (**Tabla 14**).

Tabla 14. Características de la interacción de los complejos proteína-ligando de HER2, y los péptidos JMR-3, JMR-20 y JMR-22.

Nombre de la variante	Energía de interacción (kcal/mol).	Rotación (grados)			Traslación (Å°)		
		301	127	278	25.88	-3.73	30.13
JMR-3	-186	301	127	278	25.88	-3.73	30.13
JMR-20	-179	304	117	285	25.71	-3.69	28.57
JMR-22	-185	123	18	295	19.19	-710	30.19

También se muestran valores de la rotación y translación de los modelos de acoplamiento que nos indican las coordenadas espaciales de los mejores acoplamiento del complejo proteína-ligando

Dichas energías muestran que los péptidos diseñados cuentan con la capacidad de inhibir la formación el homodímero de HER2, los heterodímeros HER2:HER1, HER2:HER3, HER2:HER4 y por tanto las cascadas catalíticas derivadas de su activación (**Figura 18**).

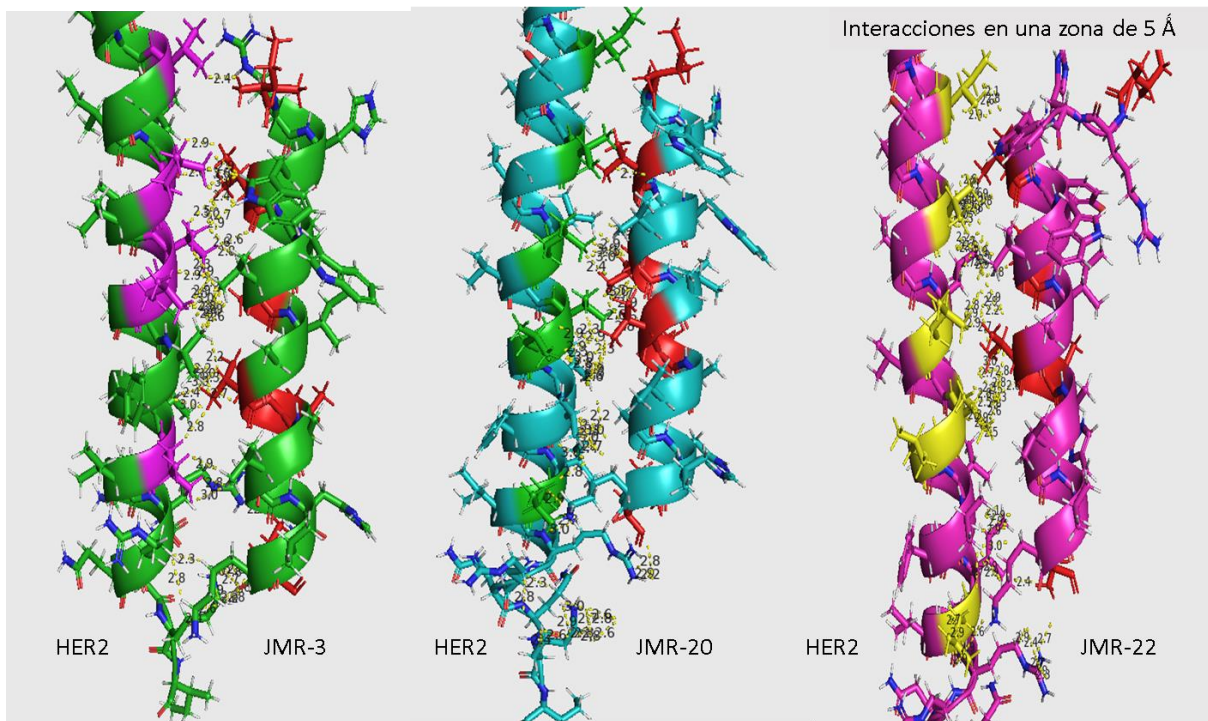


Figura 18. Representación gráfica de la interacción de HER2 con los tres péptidos candidatos a inhibir la interacción homodimérica del mismo. Del lado izquierdo la hélice transmembranal del receptor HER2 y de lado derecho los péptidos candidatos.

En cuanto a la energía de minimización de los complejos proteína-ligando, se observaron valores semejantes en cuanto a la normal de gradiente de aproximadamente 92 y una RMSD de 0.15 Å°. Por otro lado, el potencial de energía fue menor para el complejo JMR-20, con -630 (**Tabla 15**). Todos estos datos nos indican que los complejos proteína-ligando se minimizaron correctamente y que los modelos obtenidos no son tan diferentes en su distribución espacial con respecto a los modelos previos a la minimización de energía.

Tabla 15. Valores de la minimización de energía de los complejos JMR-3, JMR-20 y JMR-22. RMDS: raíz del error cuadrático medio.			
Nombre	Potencial de energía	Normal de gradiente	RMSD
JMR-3	-335.617805	92.745235	0.152797
JMR-20	-630.839223	91.998215	0.157158
JMR-22	-565.382316	91.216159	0.158773

VIII. Discusión

El receptor HER2 es como una molécula diana por excelencia en el diseño de nuevos tratamientos contra el cáncer de mama HER2 positivo (Díaz *et al.*, 2021); sin embargo, el surgimiento de mutaciones o deleciones en los dominios extra e intracelulares del receptor dificultan el desarrollo fármacos a eficaces a largo plazo para inhibir la formación del homodímero HER2 y sus heterodímeros. Debido a que a largo plazo dichos fármacos ejercen presión selectiva en las células cancerígenas provocando mutaciones tanto en la parte extracelular como intracelular del receptor HER2 generando resistencia a los fármacos (Derakhshani *et al.*, 2020). Circunstancia nos llevó a seleccionar a la α -hélice del dominio transmembranal del receptor HER2, como blanco de inhibición de los péptidos diseñados en este trabajo, ya que su secuencia peptídica se encuentra altamente conservada e implicada en el proceso de dimerización y activación de la función cinasa de HER2 (Khazen *et al.*, 2021).

A pesar de que existen trabajos como los presentados por Albrecht en el 2020, en donde se concluye que los péptidos utilizados para inhibir la interacción transmembranal de los receptores carecen de especificidad, en este trabajo se usó una combinación de los diferentes enfoques del diseño racional, logrando diseñar péptidos afines al receptor HER2 combinando la información de la secuencia peptídica del motivo de interacción transmembranal de HER2 descrito por Khazen y su grupo de trabajo en el 2021, de los péptidos antimicrobianos con actividad anticancerígena reportada en células de mama HER2 positivo y de las características fisicoquímicas de la membrana de las células tumorales, para asegurarnos que haya una selectividad dirigida hacia las células cancerígenas que presenten el receptor HER2 en sus membranas. Para asegurarnos que las variantes diseñadas mantuvieran el mecanismo de inhibición a nivel transmembranal y no destruyera la membrana celular como lo hacen los péptidos descritos por Yeaman y Yountet en el 2003, optamos por seleccionar las variantes con menor actividad antimicrobianas y mayor actividad anticancerígena. Por tal razón, los mejores péptidos candidatos a sintetizar son las variantes JMR-3, JMR-20 y JMR-22.

Pese a que este trabajo es teórico, el aumento de información científica apunta a que es una buena vía de tratamiento proponer la inhibición del dominio transmembranal del receptor HER2. Trabajos como los presentados por Duneau (2006), Bublil (2016) y Kunzent (2023) apoyan esta afirmación (Duneau *et al.*, 2006; Bublil *et al.*, 2016; Kunzent *et al.*, 2023).

Además, es necesario considerar y resaltar que, si bien, en este trabajo nos enfocamos en el cáncer de mama HER2 positivo, los péptidos aquí diseñados cuentan con el potencial para inhibir selectivamente a las interacciones transmembranales proteína-proteína implicadas en cáncer en las que HER2 se vea sobre expresado. Por tanto, es necesaria probar la actividad *in vivo* de las variantes descritas en este trabajo en diferentes líneas celulares que sobre expresen el receptor HER2.

IX. Conclusiones

Los péptidos antimicrobianos utilizados en el tratamiento contra bacterias patógenas multirresistentes y los péptidos con actividad anticancerígena son una fuente de información valiosa que nos permitió junto con la información del motivo de interacción del receptor HER2, diseñar péptidos con la capacidad de inhibir la interacción de la proteína a nivel transmembranal. Esto se logró al mejorar la selectividad específica y la capacidad de penetración en la membrana de células de cáncer de mama, usando un diseño racional

Además, se observó que las características fisicoquímicas de los péptidos candidatos, tales como la carga neta y la hidrofobicidad, son de gran importancia durante la deseada interacción de los péptidos candidatos en la membrana de células del cáncer. Los principales aminoácidos asociados a dichas características son la fenilalanina, leucina, alanina y lisina, que se encontraron con gran prevalencia en las diferentes secuencias de los péptidos con una longitud menor a 20 residuos en la región transmembranal.

En cuanto a las características peptídicas predichas, tales como el índice hemolítico, la toxicidad, la probable actividad alérgica, las actividades antimicrobiana y anticancerígena, se mantuvieron dentro de los valores deseados, lo que teóricamente vuelve seguro el uso de los péptidos candidatos y proporcionan seguridad en la efectividad de los tratamientos.

Tomando en cuenta las características fisicoquímicas predichas, e interacciones con la membrana, los mejores péptidos candidatos a sintetizar son las variantes JMR-3, JMR-20 y JMR-22, ya que presentaron una relación inversamente proporcional en la probabilidad de ser antimicrobiano y anticancerígeno, donde la segunda característica representa un mejor factor de selección.

Por otro lado, se descartaron los péptidos candidatos con una alta probabilidad de actividad antimicrobiana, dado que se busca que el mecanismo de interacción con la membrana no sea el mismo que el reportado por Ehrenstein y colaboradores en 1977, que se enfocan en la destrucción de la membrana.

En conclusión, diseñar péptidos con la capacidad de inhibir la activación del receptor HER2 a nivel transmembranal, es una nueva alternativa de tratamiento contra el cáncer de mama HER2 positivo, tanto para el cáncer metastásico, como el no metastásico.

X. Perspectivas del trabajo

En este trabajo se determinó que algunos de los péptidos antimicrobianos/anticancerígenos cortos seleccionados de la base de datos CancerPPD pueden ser modificados de tal manera que se mejore la capacidad de penetrar la membrana eucariota y la afinidad hacia un receptor específico. Por tanto, para trabajos futuros, es necesaria la evaluación de la interacción de los péptidos candidatos con HER2, utilizando dinámica molecular con interacción proteína-ligando. También es factible el uso de algunas modificaciones químicas, como, por ejemplo, el uso de D-aminoácidos, glicosilaciones, metilaciones, etc., con el fin de disminuir la degradación endógena de los péptidos diseñados.

Además, se plantea la necesidad de evaluar la actividad anticancerígena de los péptidos candidatos en algunas pruebas como las que se mencionan a continuación:

Ensayo de Bromuro 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazo (MTT): esta prueba se basa en el cálculo del porcentaje de viabilidad a partir de la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm con un espectrofotómetro analizador de Elisa, usando líneas celulares de cáncer de mama, tales como SKBR-3, MCF7 y MDA-MB-231. El grado de absorción de luz depende de la concentración de formazán acumulado dentro de la célula y en la superficie celular. Cuanto mayor sea la concentración de formazán, más intenso será el color y, por lo tanto, mayor será la absorbancia.

Expresión del receptor HER2 en *Pichia pastoris*: se basa en la expresión de forma heteróloga del receptor HER2 y una posterior evaluación de la inhibición por técnicas de colorimetría, como FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Ya que esta técnica nos permite marcar al receptor con un cromóforo excitado que trasmite energía a uno no excitado que marca a la molécula B, en este caso los péptidos candidatos, de esta forma se puede evaluar cualitativamente la interacción del complejo proteína-ligando formado por la inhibición de la interacción de la hélice transmembranal del receptor HER2 y los péptidos.

XI. Referencias

- Agrawal P., Bhagat D., Mahalwal M., Sharma N. and Raghava G. (2021) AntiCP 2.0: an updated model for predicting anticancer peptides. *Briefings in Bioinformatics*, 22(3), 2021, 1–12. DOI:10.1093/bib/bbaa153
- Alejandro, J., Reynoso-noverón, N., Torres-domínguez, J. A. (2020). *Epidemiology of cancer in México: global burden and projections 2000-2020*. Barcelona, Departamento de Biología Guía de Estudio “Ciclo Celular.”. 1–6. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=283059952003>
- Anunziato, G., Costantino, G. (2020). *Antimicrobial peptides (AMPs): a patent review (2015-2020)*. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. doi:10.1080/13543776.2020.1851679
- Apostolopoulos, V.; Bojarska, J.; Chai, T.-T.; Elnagdy, S.; Kaczmarek, K.; Matsoukas, J.; New, R.; Parang, K.; Lopez, O.P.; Parhiz, H. (2021). A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives. *Molecules*, 26, 430. Doi:10.3390/molecules26020430
- Artac, M., & Altundag, K. (2012). *Leptin and breast cancer: an overview*. *Med Oncol*, 29:1510–1514. Doi:10.1007/s12032-011-0056-0
- Bragin P., Mineev K., Bocharova O., Volynsky P., Bocharov E., Arseniev A. (2015). HER2 Transmembrane Domain Dimerization Coupled with Self-Association of Membrane-Embedded Cytoplasmic Juxtamembrane Regions. *Journal of Molecular Biology*, S0022-2836(15)00650. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.11.007
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria, *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250. Doi:10.1038/nrmicro1098
- Bublil E., Cohen T., Arnusch C., Peleg A., Pines G., Lavi S., Yarden Y., Shai Y. Interfering with the Dimerization of the ErbB Receptors by Transmembrane Domain-Derived Peptides Inhibits Tumorigenic Growth in Vitro and in Vivo. *ACS Publications*, 55 (39), 5520–5530. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00450
- Caldarella A., Buzzoni C., Crocetti E., Bianchi S., Vezzosi V., Apicella P., Biancalani M., Giannini A., Urso C., Zolfanelli F. and Paci E. (2012). Invasive breast cancer: a significant correlation between histological types and molecular subgroups. *J Cancer Res Clin Oncol* 139:617–623. DOI 10.1007/s00432-012-1365-1
- Carmona, G., Rodriguez, A., Juarez, D., Corzo, G., Villegas, E. (2013). Improved Protease Stability of the Antimicrobial Peptide Pin2 Substituted with D-Amino Acids. *Protein Journal*, 32 (6), 456-466. Doi:10.1007/s10930-013-9505-2
- Carratalá, J. V., Serna, N., Villaverde, A., & Vázquez, E. (2020). Nanostructured antimicrobial peptides: The last push towards clinics. *Biotechnology Advances*, 44(July), 107603. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107603
- Chwiłkowska, A., Kulbacka, J., Baczy, D., Choroma, A., Szewczyk, A., Michel, O., & Gajewska-naryniecka, A. (2021). *Modifications of Plasma Membrane Organization in Cancer Cells for Targeted Therapy*. Doi: 10.3390/molecules26071850
- Corzo G. Villegas y T Nakajima. (2001). Antimicrobial peptides from venom of scorpions. Japan Patent Office.

Diao Y et al., (2012). Designed synthetic analogs of the alpha-helical peptide temporin-La with improved antitumor efficacies via charge modification and incorporation of the integrin alpha beta3 homing domain. *J. Pept. Sci.* 18, 476-486. Doi:10.1002/psc.2420.

Duneau J., Vegh A., Sturgis J. A dimerization hierarchy in the transmembrane domains of the HER receptor family. *Journal Biochemistry*, 46 (7). DOI:10.1021/bi061436f

Ehrenstein G. and Lecar H. (1977). Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q Rev Biophys*, 10(1):1-34. DOI: 10.1017/s0033583500000123

Ferlay J., Ervik M., Lam F., Colombet M., Mery L., Piñeros M. (febrero de 2023). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; <https://gco.iarc.fr/today>

Fiume L. and Laschi R. (1965). Lesioni ultrastrutturali prodotte nelle cellule parenchimali epatiche dalla falloidina e dalla alpha-amanitina [Ultrastructural lesions produced in hepatic parenchymal cells by phalloidin and alpha-amanitin]. *Sperimentale*. 115(5):288-97. PMID: 5894582.

Gámez-Chiachio M., Sarrió D. and Moreno-Bueno G. (2022). Novel Therapies and Strategies to Overcome Resistance to Anti-HER2-Targeted Drugs. *Cancers*, 14, 4543. DOI:10.3390/cancers14184543

González Sánchez, N., Armada Esmores, Z., & Llópiz Casanova, L. (2017). Propiedades de los interferones y su acción antitumoral. *Medicentro (Villa Clara)*, 21(3), 192–198.

Habault, J., & Poyet, J. L. (2019). Recent advances in cell penetrating peptide-based anticancer therapies. *Molecules*, 24(5), 1–17. Doi.org/10.3390/molecules24050927.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. Doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013

Hilchie AL, Hoskin DW, Coombs MRP. (2019). Anticancer activities of natural and synthetic peptides. *Antimicrob. Pept.* 1117, 131-147. Doi:10.1007/978-981-13-3588-4_9

Huang Y., Ognjenovic J., KarandurKate D., Miller K., Merk A., Subramaniam S., and Kuriyan J. (2021). A molecular mechanism for the generation of ligand-dependent differential outputs by the epidermal growth factor receptor. *Biochemistry and Chemical BiologyStructural Biology and Molecular Biophysics*, eLife. DOI: 10.7554/eLife.73218

Khazen G., Gyulkhandanian A. Issa,T. Maroun R. C. (2021). Getting to know each other: PPIMem, a novel approach for predicting transmembrane protein-protein complexes. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. Volume 19, Pages 5184-5197. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.09.013>

Kiisholts, K., Langel, Ü., & Kurrikoff, K. (2019). *Tumor gene therapy by systemic delivery of plasmid DNA with cell - penetrating peptides*. August 2018, 105–114. <https://doi.org/10.1096/fba.1026>

Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., & Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology*, 37(7), 8471–8486. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5035-9>

Kitagaki J, Shi G, Miyauchi S, Murakami S, Yang Y. (2015). Cyclic depsipeptides as potential cancer therapeutics. *Anticancer Drugs*. 26, 259-271. doi:10.1097/cad.000000000000183

Kollár P, Rajchard J, Balounová Z, Pazourek J. (2014) Marine natural products: bryostatins in preclinical and clinical studies. *Pharm. Biol.* 52, 237-242. doi:10.3109/13880209.2013.804100

Kumar P., Kizhakkedathu J. and Straus S. (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomeolecules*,4, 8. DOI:10.3390/biom8010004

Kuntzel T., Spenlé C., Pham-Van L., Birmpili D., Riou A., Loeuillet A., Charmarke-Askar I., Bagnard D. Implication of the Transmembrane Domain in the Interleukin 10 Receptor Platform Oligomerisation. *Cells Journal*, 12(10), 1361. DOI:10.3390/cells12101361.

Lagunas, C., Mendiola, A. V., & Cruz, I. S. (2014). Ciclo Celular: Ciencias de La Salud, 17(2), 98–107. <http://revistas.unam.mx/index.php/vertientes/article/viewFile/51694/4616>

Li GN, Xia XJ, Long YH, Li JR, Wu JJ, Zhu Y. (2014) Research progresses and applications of antimicrobial peptides. *Chin. J. Anim. Nutr.* 26, 17-25. doi:10.3969/j.issn.1006-267x.2014.01.003

Liscano Y., Oñate-Garzón J. and Delgado J. (2020). Peptides with Dual Antimicrobial-Anticancer Activity: Strategies to Overcome Peptide Limitations and Rational Design of Anticancer Peptides. *Molecules*, 16;25(18):4245. DOI: 10.3390/molecules25184245

Marcus D Hanwell, Donald E Curtis, David C Lonie, Tim Vandermeersch, Eva Zurek y Geoffrey R Hutchison; (2020) " Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *Journal of Cheminformatics* 2012, 4:17 DOI: 10.1186/1758-2946-4-17

Marone R., Hess D., Dankort D., Muller W., Hynes N. and Badachel M. (2004). Memo mediates ErbB2-driven cell motility. *nature cell biology*, 6 (6), 515-522. DOI: 10.1038/ncb1134

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 1(3), 222–231. <https://doi.org/10.1038/35106065>

Matus-Santos, J. A., Arce-Salinas, C., Flores-Díaz, D., Reynoso-Noverón, N., Villarreal-Garza, C., Alvarado-Miranda, A., & Mohar-Betancourt, A. (2015). Actualidades del tratamiento del cáncer de mama metastásico HER2-positivo. *Revista Mexicana de Mastología*, 5(1), 18-22.

Mote, P. A., Leary, J. A., Avery, K. A., Sandelin, K., Chenevix-Trench, G., Kirk, J. A., & Clarke, C. L. (2004). Germ-Line Mutations in BRCA1 or BRCA2 in the Normal Breast Are Associated with Altered Expression of Estrogen-Responsive Proteins and the Predominance of Progesterone Receptor A. *Genes Chromosomes and Cancer*, 39(3), 236–248. <https://doi.org/10.1002/gcc.10321>

Nawrot, R., J. Barylski, G. Nowicki, J. Broniarczyk, W. Buchwald & A. Goździcka-Józefiak (2014) Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiol.* 59:181-96. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.06.043

Nelson, D. L., Cuchillo Foix, C. M., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger: Principios de Bioquímica* (4a. ed.). Barcelona: Omega

Olayioye M., Beuvink I., Horsch K., Daly J. and Hynes N. (1999). CELL BIOLOGY AND METABOLISM: ErbB Receptor-induced Activation of Stat Transcription Factors Is Mediated by Src Tyrosine Kinases. *J. Biol. Chem*, 274:17209-17218. DOI: 10.1074/jbc.274.24.17209

Parchebafi A., Tamanaee F., Ehteram H., Ahmad E., Nikzad H. and Haddad H. (2022). The dual interaction of antimicrobial peptides on bacteria and cancer cells; mechanism of action and therapeutic strategies of nanostructures. *Microb Cell Fact.* 21: 118. DOI:10.1186/s12934-022-01848-8

Pirtskhalava M., Amstrong A, Grigolava M., Chubinidze M., Alimbarashvili E., Vishnepolsky B., Gabrielian A., Rosenthal A., Hurt D., Tartakovsky M. (2021) DBAASP v3: base de datos de actividad antimicrobiana / citotóxica y

estructura de péptidos como recurso para el desarrollo de nuevas terapias, *Nucleic Acids Research*, Volumen 49, Número D1, Páginas D288 – D297, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa991>.

Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P, Shai Y. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 31, 12 416-12 42. Doi:10.1021/bi00164a017

Qiao X, Wang Y, Yu H. (2019) Progress in the mechanisms of anticancer peptides. *Chin. J. Biotechnol.* 35, 1391-1400. doi:10.13345/j.cjb.190033

Simond A., Muller W. In vivo modeling of the EGFR family in breast cancer progression and therapeutic approaches. *Advances in Cancer Research*, capítulo 5, Volume 147, 189-227. DOI: 10.1016/bs.acr.2020.04.004

Song K., Zu X., Du Z., Hu Z., Wang J. and Li L. (2021). Diversity Models and Applications of 3D Breast Tumor-on-a-Chip. *Micromachines*, 12, 814. DOI:10.3390/mi12070814

Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>

Tyagi A., Tuknait A., Anand P., Gupta S., Sharma M., Mathur D., Joshi A., Singh S., Gautam A. and Raghava G. (2015). CancerPPD: a database of anticancer peptides and proteins. *Nucleic Acids Research*, 43, Database issue D837–D843. DOI:10.1093/nar/gku892

Vanhee, P., van der Sloot, A. M., Verschueren, E., Serrano, L., Rousseau, F., & Schymkowitz, J. (2011). Computational design of peptide ligands. *Trends in Biotechnology*, 29(5), 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.01.004>

Vishnepolsky B, Gabrielian A, Rosenthal A, Darrell EH, Tartakovsky M, Managadze G, Grigolava M, Makhatadze GI, and Pirtskhalava M. (2018). Predictive Model of Linear Antimicrobial Peptides Active against Gram-Negative Bacteria. *J. Chem. Inf. Model.* 2018, 58, 1141-1151.

Vishnepolsky B and Pirtskhalava M. (2014). Prediction of Linear Cationic Antimicrobial Peptides Based on Characteristics Responsible for Their Interaction with the Membranes *J. Chem. Inf. Model.* 2014, 54, 1512–1523.

Wang, G., Li, X., y Zasloff, M. (2010). A Database View of Naturally Occurring Antimicrobial Peptides: Nomenclature, Classification and Amino Acid Sequence Analysis, pp. 1–21. CABI.

Wang Z. (2017). ErbB Receptors and Cancer. *ErbB Receptor Signaling: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1652, 3-35. DOI:10.1007/978-1-4939-7219-7_1

Wali AF et al. (2019) Natural products against cancer: review on phytochemicals from marine sources in preventing cancer. *Saudi Pharm. J.* 27, 767-777. doi:10.1016/j.jsps.2019.04.013

Waterhouse A.M., Procter J.B., Martin D.M.A., Clamp M., Barton G.J. (2009) Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25: 1189-1191. DOI: doi:10.1093/bioinformatics/btp033

Xie, M., Liu, D., & Yang, Y. (2020). Anti-cancer peptides: classification, mechanism of action, reconstruction and modification. *Open Biology*, 10(7), 200004. DOI: 10.1098/rsob.200004

Yang Y., Lee A., Lin L., Chen Y., Huang P., Ma H., and Wang M. (2022). Strategic Decoy Peptides Interfere with MSI1/AGO2 Interaction to Elicit Tumor Suppression Effects. *Cancers*, 14, 505. DOI:10.3390/cancers14030505

Yeaman, M. R. and Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1): 27–55. DOI: 10.1124/pr.55.1.2

Zaidman, D., & Wolfson, H. J. (2017). Protein-peptide interaction design: Pepcrawler and pinacolada. *Methods in Molecular Biology*, 1561, 279–290. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6798-8_16



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 29 de mayo del 2023.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: **"Diseño de péptidos que inhiban o estabilicen interacciones PM:PM de interés terapéutico implicados en cáncer de mama"**, que presenta el **C. Josué Merino Rodríguez**, del Programa de Posgrado Maestría en Biotecnología, bajo la dirección de la DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL y codirección del DR. RACHID CHARBEL MAROUN, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

- DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL (CEIB UAEM)
- DR. RACHID CHARBEL MAROUN (D'EVRY-VAL-D'ESSONNE/UNIVERSITÉ PARIS)
- DR. ALEXANDRE TOSHIRICO CARDOSO TAKETA (CEIB UAEM)
- DR. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ (CEIB UAEM)
- DR. ADRIÁN ALEJANDRO SCHCOLNIK CABRERA (HMR CANADÁ)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ADRIAN ALEJANDRO TEJEDA ALCANTARA | Fecha:2023-06-05 11:22:13 | Firmante

jqhNXqmze4MWcRE2cu3g9SOJpj8/z1zgEzUnQFZ1aclmXWd5ZVqYoM4CLoUbhVbdkkQCiqF7GGIXzEDpmxsDEI5+H+z+VwclNQjvZaty/yOXUfi/W9L222jE3Z3pdHOkb2nLQXKv5M8Ik+TYWeJhLRUz+E5AZgE/vJtjwxueSxe6DfOMNs5DoerMWZbeHGvAMOpHVIW/tdxJu0ZIFRCfhtC+Fyh/sAgu0sdAcMp0WSv9k1lpFW9XOpGdN0gc3FIRhy42ZBEND+VUFsmrR/NmGBbKZ5XYQYpPW7FtDwByn70nog1vkPRiDVEkn1i89N2yJARxIjOwxrvmgFf2uhg==

ALEXANDRE TOSHIRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2023-06-06 09:49:28 | Firmante

bxkiKG48JwUfql3CcgDU2ONdfZR+wjQvsg3wSi+NtVb3mQAj6MJUB+Yg13Tj9RkXdeAhbMZJv5JHsVzMKhU+E1KIAqXtGhJo/d3amd6BzXp7iu1tNvbbBgf3hv7b4a5ASKCwaG1sAe4xW40IP/7p+F/maogRYEOqk/FO/r73gptJv8tgLEPLQmQcLdrogUuB1T49D2eDiZa3k6DGIoJMWMLsZFSYBGMJ5rhodBMDr/XuvsC9Jl3plqGyf8ybMdoLfyfT1gx1YnFe6zDXbUFOTDghdPWnqqX0E4gXqbKs3t8qSgbYUvm0dlgKuejTPhIEl+maKtTnTEzh+zBQdkwg==

RACHID CHARBEL MAROUN . | Fecha:2023-06-09 01:59:00 | Firmante

uCYbvjOEBv7UIV+SiLo7TYvzVXSiGCh7QJYnff1yro5WZQqwnRdFvLANSgIPewhUk86ENDg5dBIP/1w6B5uapQ9LdcaQyxZGN7aIOU46djrK2lvr9ByZnz7y8KFfPZAvM12r5ugGEfB1oyRpppegFlvFLmy4falw2ZjiriMxB8CeA0TzMiDDURwUwWki2Za5RRdbRQ0+7K92sphWwHDJW0JtmML4UUFwe2Rb7XclU926wjjPBcZ9Uc3MgeQiUGimBPRoKy477Y7Crgq4wL1sq6ufiUo2VOFlwKfVgg1B/F/BlkuZay0zETyfxZQu2r7wRfJNpVYYGbCC6LcU+Yz4ZA==

ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL | Fecha:2023-06-09 14:00:51 | Firmante

qCYiNfqbcnz+aBvpO992a1ovDV5Kf0SPPVpwpvkFyR2+nH2SmvK7Hb21gEnyr7JT1WwUzXUiv0r+b/5m/f4T4afzHo/6KoGT3ylma7iUMTWQ9uHOJm/tjO9SLn9LykVX/IKG0T1UfOWA+BSSHSti0UOgVquOH7WQ8w79tHqsSrR9/sKjC59rC/yj5ahYf01TDIA+CZ/OuMVhZhrk2Po4Eu0n3UQ9XeCCz6aSPopJ7eNcG+5mnXl3Kvgafo+q0xGbfrHkasaPtiPfpqJgiw+Q5l+sTTURsH6sPitOlywqqK5LIUp4j3GBYHd6+82ZhXP8T0PMT0V9uv0Ok2finAz8Ow==

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2023-07-12 11:49:37 | Firmante

KJPLkNwKZZh5vS24LHPwS0F+OHsLe8pjqa+09mjIJKFfNwSEXw7ibiazr9Hxt3jy5C80gNC+LqisGI/TQwXGVfRAZwsjAXfxz7eRksBhbQs4U+EKPAUAJiL3yFQK2cMBRDyubZAZ3XWKLfeXfiDibEY1GA7ND2il/RewE/82Oa/zf9PGZ9uJZBEYmXGuOOdB+YulNgG83+njIRK8Vgo+EkzNVHhZkbgRXm/WFzIXEvyQrUo0T09jzccrKtoWhA47zITXHipTo6zoA/0eiVnTXLdqZgosZCNZUNkx3uclXJuijnGol2owcW6SRV76CaBW7C9Q+9GPDIP1r/WPwsA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



N1DniRUBo

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/CAXleFAjyHay4dP67ZX3dp3e30z8Jlp>

