



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

“Evaluación de la regulación de la expresión de la enzima glutamato-cisteína ligasa mediante el uso del mir-433-3p transportado por el péptido ss-IL-8α en líneas celulares no tumorales y tumorales de mama”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Mario Espinoza Gatica

Director de Tesis: Dra. Paula Santana S.

Codirector de Tesis: Dr. Carlos Jara G.

Dr. Mario Párraga S.

Agosto / 2023



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

“Evaluación de la regulación de la expresión de la enzima glutamato-cisteína ligasa mediante el uso del mir-433-3p transportado por el péptido ss-IL-8α en líneas celulares no tumorales y tumorales de mama”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Mario Espinoza Gatica

Director de Tesis: Dra. Paula Santana S.

Codirector de Tesis: Dr. Carlos Jara G.

Dr. Mario Párraga S.

Agosto / 2023



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“Evaluación de la regulación de la expresión de la enzima glutamato-cisteína ligasa mediante el uso del mir-433-3p transportado por el péptido ss-IL-8α en líneas celulares no tumorales y tumorales de mama”

Mario Ignacio Espinoza Gatica

Este trabajo se realizó bajo la supervisión de Dra. Paula Santana en el laboratorio de Bioensayos de la Universidad de Valparaíso y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Msc. Marilyn Paz

Presidente Comisión

Dr. Juan Villena

Profesor Informante

Dr. Luis Gonzales

Profesor Informante

Dra. Paula Santana

Director de Tesis

Valparaíso, Chile

2023

DEDICATORIA/AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo de investigación se la dedico a mi madre, quien nunca dudo un segundo de mí.

Quiero agradecer a mis profesores guías, Dra. Paula Santana, Dr. Carlos Jara y Dr. Mario Párraga por enseñarme, apoyarme y corregirme cuando fue necesario. Agradecer por todo el cariño brindado, porque han pasado a formar parte importante de mi vida y me siento en profunda deuda con ellos.

Agradecer también al Dr. Manuel Ahumada de la Universidad Mayor, por la buena voluntad y buena onda al momento de prestar apoyo en el área de nano partículas.

Por ultimo agradecer a todo el equipo del CIB, quien ha permitido que gran parte de este trabajo se pudiera realizar. A todos ustedes muchas gracias.

"No hay lugar tan estrecho donde no se puede elevar el pensamiento al cielo." Seneca.

ABREVIATURAS

(RL) Radicales libres

(ROS) Especies reactivas de oxígeno

(DNA) Ácido desoxirribonucleico

(SOD) Superóxido dismutasa

(GPX) Glutación peroxidasa

(CAT) Catalasa

(GSH) Glutación

(GCL) Ligasa de glutamato cisteína

(GCLC) Subunidad catalítica de la ligasa de glutamato cisteína

(GCLM) Subunidad modificadora de la ligasa de glutamato cisteína

(GS) Glutación sintasa

(H₂O₂) Peróxido de hidrógeno

(·OH) Radical hidroxilo

(ONOO⁻) Peroxi nitrito

(O₂·⁻) Superóxido

(miRNA) microRNA

(AGO) Argonauta

(RISC) Complejo de silenciamiento inducido por RNA

(mRNA) RNA mensajero

(UTR) Región no traducida

(ONs) Oligonucleótidos

(siRNA) RNA interferente pequeño

(pDNA) DNA plasmídico

(CPP) Péptido penetrante celular

(ASO) Oligonucleótidos anti sentido

(PBN) Nanopartículas basadas en péptidos

(PMAPs) Péptidos activos de membrana dependientes del pH

(T°A) Temperatura Ambiente

(SBF) Suero bovino Fetal

(SRB) Sulforodamina B

(snRNA) RNA pequeño nucleolar

(qPCR) Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

(cDNA) DNA complementario

(CTCF) Fluorescencia celular total corregida

(DLS) Dispersión de luz dinámica

(ZP) Zeta potential

(n.d) No determinado

(RT) Retro-transcripción

(ANs) Ácidos nucleicos

ÍNDICE

RESUMEN	Pág. 1
INTRODUCCIÓN	Pág.2-18
1.Cancer y estrés oxidativo	Pág. 2-5
2.Regulación génica mediante RNA no codificante	Pág. 6-11
2.1 Rol de los redoximir en cáncer y su participación en el estrés oxidativo	Pág.9-10
2.2 Estrategias para el estudio de los miRNAs en líneas celulares	Pág.10-11
3. Péptidos penetrantes celulares y nanopartículas basadas en péptidos	Pág.11-16
3.1 Péptidos	Pág. 11-13
3.2 Nanopartículas basadas en péptidos	Pág. 13-15
3.3 Uso de un péptido derivado de IL-8 de salmones como potencial CPP para el transporte de miRNAs	Pág.15-16
4. ¿Es posible modular la acción de GSH al aplicar el complejo ss-IL-8a/mir-433-3p?	Pág.16-18
HIPÓTESIS	Pág. 19
OBJETIVO GENERAL	Pág. 19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	Pág. 19
1. Objetivo Específico 1 (OE1)	Pág. 19
2. Objetivo Específico 2 (OE2)	Pág. 19
3. Objetivo Específico 3 (OE3)	Pág. 19
METODOLOGÍA	Pág.20
Actividad 1. Cultivo celular	Pág. 20-21
Actividad 2. Evaluación de la citotoxicidad del péptido ss-IL-8a	Pág. 21
Actividad 3. Evaluación de la penetración del péptido ss-IL-8a mediante microscopía de fluorescencia	Pág. 21-22
Actividad 4. Formación del complejo péptido ss-IL-8a/microRNA mir -433-3	Pág. 22-23
Actividad 5. Medición del tamaño del complejo péptido ss-IL-8a/microRNA mir -433-3p	Pág. 23
Actividad 6. Evaluación de la citotoxicidad del complejo	Pág. 24
Actividad 7. Evaluación de la penetración del complejo péptido ss-IL-8a/microRNA mir -433-3p mediante microscopía de fluorescencia	Pág. 24-25
Actividad 8. Evaluación del ingreso del complejo ss-IL-8a/mir-433-3p mediante PCR	Pág. 25
Actividad 9. Siembra y tratamiento del cultivo celular	Pág. 25-26
Actividad 10. Extracción de RNA	Pág. 26
Actividad 11. Transcripción reversa y qPCR	Pág. 26-27

Actividad 12 Tratamiento en las líneas de cultivo celular	Pág. 27-28
Actividad 13. Extracción y cuantificación de proteínas	Pág. 28
Actividad 14. Inmunoensayo ELISA	Pág. 29
Actividad 15. Medición de los niveles de GSH, GSSG y la razón GSH/GSS	Pág. 29-30
Actividad 16. Análisis estadístico de los ensayos realizados	Pág. 31
RESULTADOS	Pág. 32-45
Objetivo Específico 1	Pág. 33-34
Objetivo Específico 2	Pág. 34-43
Objetivo Específico 3	Pág. 43-45
DISCUSIÓN	Pág. 46-53
CONCLUSIONES	Pág. 54
BIBLIOGRAFÍA	Pág. 55-63

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad que posee múltiples procesos patológicos característicos que están relacionados con el estrés oxidativo. Se ha observado que las células tumorales de mama tienen una defensa antioxidante mejorada en comparación con las células normales, esto les proporciona resistencia contra los tratamientos tradicionales. Un posible mecanismo de regulación de estas defensas antioxidantes de las células cancerosas es mediante RNAs no codificantes pequeños, en específico los microRNAs. Uno de estos es el mir-433-3p el cual es un potencial candidato debido a su capacidad de regular la biosíntesis del antioxidante glutatión. Por otra parte, el ingreso del mir-433-3p al interior de las células tumorales de mama requiere el uso de transportadores como los péptidos penetrantes entre ellos el péptido ss-IL-8 α , péptido con capacidad antimicrobiana derivado de la IL8 de salmónidos. Esta investigación se centró en la caracterización y evaluación de los efectos producidos sobre la viabilidad celular y los niveles de la enzima glutamato-cisteína ligasa por el complejo péptido ss-IL-8 α /redoximiR mir-433-3p en líneas celulares de tumorales y no tumorales de mama.

La citotoxicidad se evaluó utilizando el ensayo de sulforodamina B (SRB) y se observó la capacidad de penetración del péptido ss-IL-8 α en tres líneas celulares de mama (MCF-10, MDA-MB-231 y MCF-7) mediante microscopía de fluorescencia (FM). Además, el complejo ss-IL-8 α / mir-433-3p se caracterizó mediante electroforesis en gel (EG), dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial zeta (ZP). También se evaluó la capacidad de penetración (FM), capacidad de carga (qPCR) y el efecto sobre la expresión de la enzima GCL (ELISA) y GSH del complejo en las tres líneas celulares de mama en estudio. Los resultados demostraron que el péptido ss-IL-8 α no es citotóxico (0.625-50 μ M) y es capaz de translocar al interior de las células estudiadas. Además, se demostró que es capaz de unirse al mir-433-3p (40:1) y transportarlo al interior de las células. Sin embargo, una vez que ingresa el mir-433-3p a las células tumorales de mama este no produce variación en la concentración de GCL, pero si un aumento de la concentración de GSH en la línea MCF-10A y MDA-MB-231. Concluyendo así que el péptido ss-IL-8 α funciona como vector de transporte, pero aún faltan datos para evaluar su funcionalidad.

Palabras clave: Estrés oxidativo, Péptidos penetrantes celulares, microRNA mir- 433-3p, ss-IL-8 α y Glutatión.

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer y estrés oxidativo

El Cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial, y se espera que en los próximos años los casos y las muertes aumenten por el rápido crecimiento de la población, el envejecimiento y la adopción de estilos de vida que aumentan el riesgo de padecer la enfermedad (1). Con más de 2,2 millones de casos anuales, el cáncer de mama es el tipo principal diagnosticado en mujeres de todo el mundo. Además, este tipo de cáncer es la principal causa de muerte relacionada con la enfermedad en mujeres, generando el fallecimiento de 685.000 por año (2,3). En Chile, según datos entregados por el Departamento de epidemiología, entre los años 2007 y 2018, fallecieron un total de 10.890 mujeres como consecuencia del cáncer de mama (4).

Esta patología es un proceso multietapas, en el cual se han definido por lo menos tres principales: iniciación, promoción y progresión. Si bien hay múltiples factores que afectan a cada una de estas etapas por separado, el estrés oxidativo es transversal a todas ellas (fig.1.) , siendo uno de los principales factores a considerar en el estudio de posibles tratamientos (5). En este sentido, el estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la producción de radicales libres (RL) y/o especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*), y su estabilización y posterior eliminación mediante mecanismos protectores denominados sistemas antioxidantes (6). La producción de RL y/o ROS (H_2O_2 , O_2^- , OH^- , etc.) se dan de manera natural bajo procesos fisiológicos, como por ejemplo durante la respiración celular por parte de la mitocondria. Sin embargo, la producción de ROS se ve aumentada en las células cancerígenas debido a que durante el desarrollo de la enfermedad las células van adquiriendo propiedades características del cáncer, en específico la proliferación celular descontrolada (7). Para que la célula cancerígena pueda mantener ese nivel de crecimiento celular y división continua, se requiere que el metabolismo energético sea alterado con el fin de suplir la alta demanda (7). Estos cambios en la energética celular conlleva a diversos procesos como una mayor captación de glucosa por parte de los tumores para luego fermentarla y generar lactato, incluso en presencia de oxígeno evitando la respiración celular normal en un fenómeno conocido como el “efecto Warburg”, además de disfunción mitocondrial y la alteración en las reacciones redox, las

cuales en conjunto generan sobreproducción de especies radicalarias (8,9). Estas especies radicalarias cuando se acumulan dañan a las proteínas, los lípidos y al DNA, generando inestabilidad genómica (9,10)

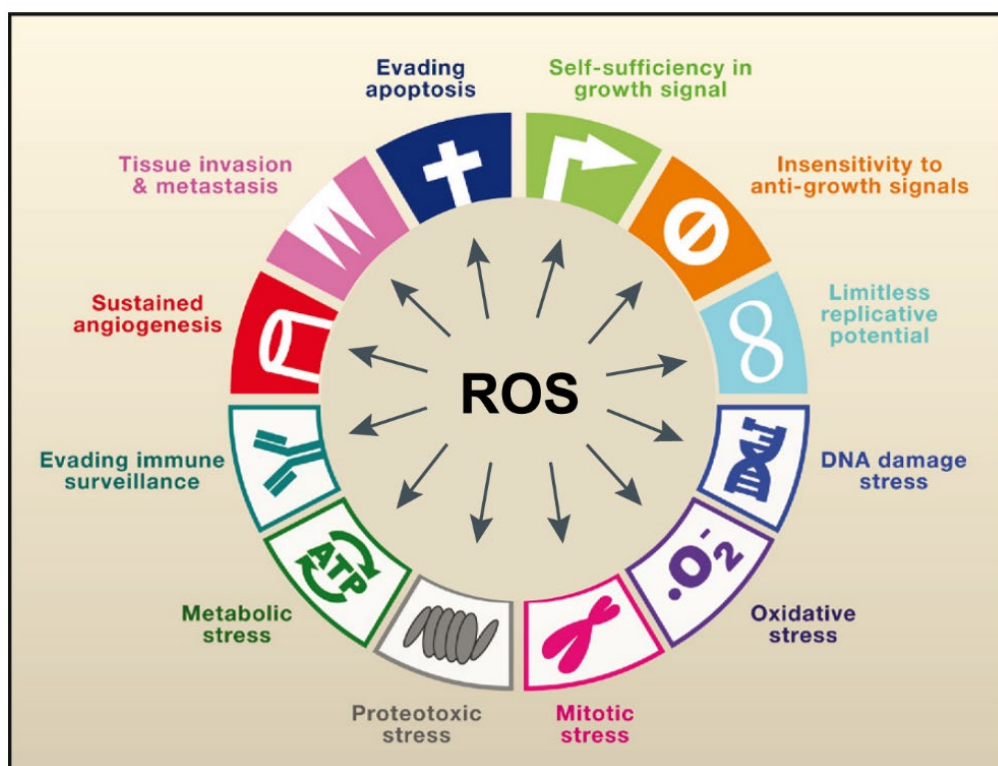
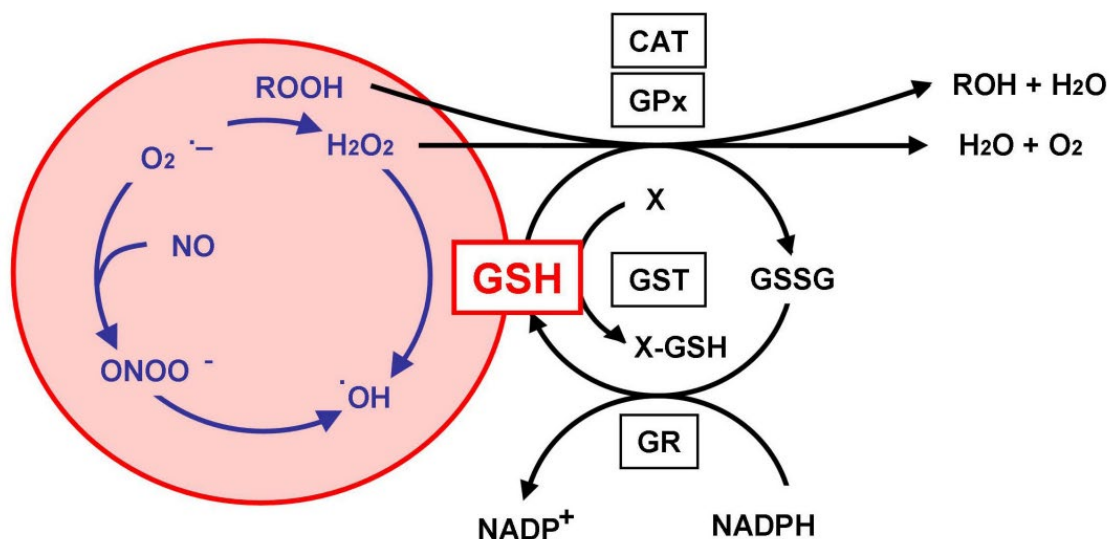


Fig. 1. Participación de las especies reactivas de oxígeno en los procesos cancerígenos. (Modificado a partir de Luo y colaboradores. (11))

Para evitar los efectos citotóxicos generados por los ROS, la célula ha desarrollado una amplia gama de defensas antioxidantes, estas se dividen en dos grandes grupos, defensas antioxidantes enzimáticas y las defensas no enzimáticas. En el primer grupo encontramos a la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), la catalasa (CAT), glutatión reductasa y la glutatión-S- transferasa, y en el segundo grupo encontramos a las vitaminas y provitaminas incluidas por la dieta tales como, vitamina E, C, β -caroteno, flavonoides, polifenoles, y moléculas pequeñas como el glutatión (GSH) (12). Es en esta última molécula de interés para esta investigación.

El GSH es un tripéptido, γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina, el cual es clave en la regulación del estrés oxidativo, y se encuentra presente de manera ubicua en todos los tejidos de

los mamíferos en concentraciones desde 1 hasta 10mM (la concentración mayor está en el hígado). La síntesis del GSH es catalizada por la glutamato-cisteína ligasa (GCL), la cual es una enzima heterodimérica compuesta por una subunidad catalítica (GCLC) de 73 kDa y por una subunidad modificadora (GCLM) de 31 kDa. La GCL genera la formación del dipéptido glutamil-cisteína en una reacción dependiente de ATP. El segundo paso en la formación del GSH es la adición del aminoácido lisina por la GSH sintetasa (GS) (13,14). El GSH es el tiol no proteico más abundante de la célula a la hora de defenderla contra el estrés oxidativo, participando como cofactor en procesos enzimáticos, evitando el daño generado tanto por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como por peróxidos lipídicos, y mediante la eliminación no enzimática de radicales libres (fig. 2). Sumado a esto, el GSH también desempeña funciones clave en la señalización redox, desintoxicación de xenobióticos, modula la proliferación celular, la apoptosis, la función inmune y la fibrogénesis (15,16).



I

Fig.2. Rol del GSH como antioxidante (17): El GSH actúa como cofactor de la glutatión peroxidasa (GPx), puede participar de manera no enzimática en la reducción de varios compuestos reactivos ($\cdot\text{OH}$, ONOO^- y $\text{O}_2^{\cdot-}$), y puede volver a su forma reducida gracias a la glutatión reductasa (GR)

Sin embargo, el problema principal presentado por el GSH, es que este se encuentra elevado en células tumorales, particularmente las que poseen niveles extremos de reacciones redox, como es el caso de cánceres de cerebro, específicamente meningiomas, así como también en cánceres de mama, pulmón y cabeza-cuello (18). Adicionalmente, se ha observado que el exceso de GSH termina por conferir a los tumores resistencia contra las drogas quimioterapéuticas (10,19). En estudios actuales, se ha visto que el exceso de GSH proviene de una red de regulación alterada, en la cual se encuentra elevada la síntesis de este antioxidante, permitiendo a la célula resistir a la quimioterapia (20,21). Es por lo dicho anteriormente, que no resulta extraño ver que en los últimos años se ha vuelto la mirada hacia la regulación del GSH, como un enfoque potencial para el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer (22).

En el caso del GSH, la regulación de su producción está directamente relacionada con dos procesos: 1) la cantidad de cisteína que entra a la célula por medio del transportador Xc- y 2) la actividad de la enzima glutamato-cisteína ligasa (GCL). Por lo tanto, la manera de regular la producción de GSH es controlando uno de estos dos ejes (23). Basándose en este enfoque, estudios como el realizado por Yang et al. (24) lograron inducir en células cancerígenas de mama un tipo de muerte celular programada en la que está implicada la oxidación de lípidos y disfunción en el metabolismo del hierro conocida como ferroptosis. Esto se logró mediante el uso de metformina, fármaco utilizado para el tratamiento de la diabetes, junto con sulfasalazina, medicamento antiinflamatorio, inhibidor del sistema transportador Xc-(24). También bajo ese mismo enfoque es que Andringa y colaboradores (25), utilizaron el fármaco L-butionina-(S,R)-sulfoximina (L-butionina sulfoximina) o también conocido como BSO, un inhibidor reversible de la enzima GCL, para disminuir los niveles de GSH y sensibilizar a la célula frente a una depleción de glucosa.

Teniendo presente estos antecedentes, en este proyecto se propuso

regular a nivel celular el antioxidante GSH, utilizando como estrategia el potencial uso de RNAs no codificantes, los cuales regulan múltiples procesos, incluyendo las defensas antioxidantes (26).

2. Regulación génica mediante RNA no codificante.

En la actualidad ha existido una creciente reevaluación de cómo ocurre la regulación y la expresión de los genes. Esto se basa en el descubrimiento de los RNAs no codificantes, en particular aquellos conocidos por su rol en las vías de interferencia y silenciamiento de genes mediadas por RNA (27).

En el año 2012 el proyecto ENCODE se encargó de estudiar la porción de DNA no codificante de nuestro genoma, para darse cuenta de que alrededor del 80 % de esta región era biológicamente activa (28). Dentro de esta gran región genómica se encuentran distintos elementos tales como transposones, telómeros, secuencias repetidas, RNAs no codificantes largos y RNAs no codificantes pequeños, entre otros (29). Es en un subgrupo de los RNAs no codificantes pequeños en los que recae el principal interés, los llamados microRNAs (miRNAs).

Los miRNAs son RNAs no codificantes endógenos altamente conservados de 20-24 nucleótidos que cumplen un importante rol en la regulación genética. Su biogénesis que se representada en la figura 3.

El mecanismo comienza en el núcleo mediante su transcripción por parte de la RNA polimerasa II en un transcrito inicial mucho más largo llamado Pri-miRNA. El pri-miRNA posee por lo menos una región que lo hace plegarse sobre sí mismo formando una horquilla que servirá como sustrato para el microprocesador. Este microprocesador es un complejo heterotrimérico compuesto por una molécula de DROSHA y dos moléculas de su cofactor DGCR8. Por su parte, DROSHA posee dos dominios de RNasa tipo III, los cuales cortan los extremos de la horquilla generando una estructura de tipo tallo-bucle llamada pre-miRNA. El pre-miRNA será transportado hasta el citoplasma por la molécula Exportina 5 y RAN-GTP, para continuar con su procesamiento. Una vez en el citoplasma, otra molécula con actividad RNasa llamada DICER corta al pre-miRNA a la altura del bucle para generar una nueva estructura llamada miRNA dúplex, la cual contiene tanto la hebra pasajera como la hebra guía del miRNA. Posteriormente el miRNA

dúplex irá a unirse a la proteína argonauta (AGO), mediante la ayuda de dos proteínas chaperonas (HSC70/HSP90) en un proceso dependiente de ATP. Este proceso facilita que AGO altere su conformación y se una al rígido miRNA dúplex. En este mismo proceso es seleccionada la hebra guía, la cual puede variar entre la selección de la hebra 5p como la 3p, incluso cada una de estas hebras puede unirse a una proteína AGO distinta. Sea cual sea el proceso de selección de la hebra guía, este termina con la formación del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) (30,31).

El mecanismo de acción de los miRNAs ocurre mediante su unión por complementariedad de bases a sus RNAs mensajeros (mRNA) blanco en sitios concretos llamados elementos de respuesta a miRNA (miRNA Response Elements o MREs, por su sigla en inglés) que preferentemente se ubican en la región 3' no traducida (UTR) de los mRNA. De esta manera se produce la inhabilitación de la traducción del mRNA en proteína a través de dos posibles mecanismos: por bloqueo de la traducción del mRNA o por la degradación de este, dependiendo si la unión del miRNA al mRNA se da con menor o mayor porcentaje de homología respectivamente (32). Como consecuencia de su capacidad regulatoria sobre múltiples RNAs mensajeros (mRNAs) y su evidente rol crítico en varios procesos biológicos como la diferenciación (33), la proliferación (34), el metabolismo (35), el desarrollo (36), el equilibrio redox (37), la muerte celular y la tumorigenicidad (38); es que los miRNAs se han vuelto posibles candidatos a la hora de desarrollar nuevas terapias basadas en ácidos nucleicos.

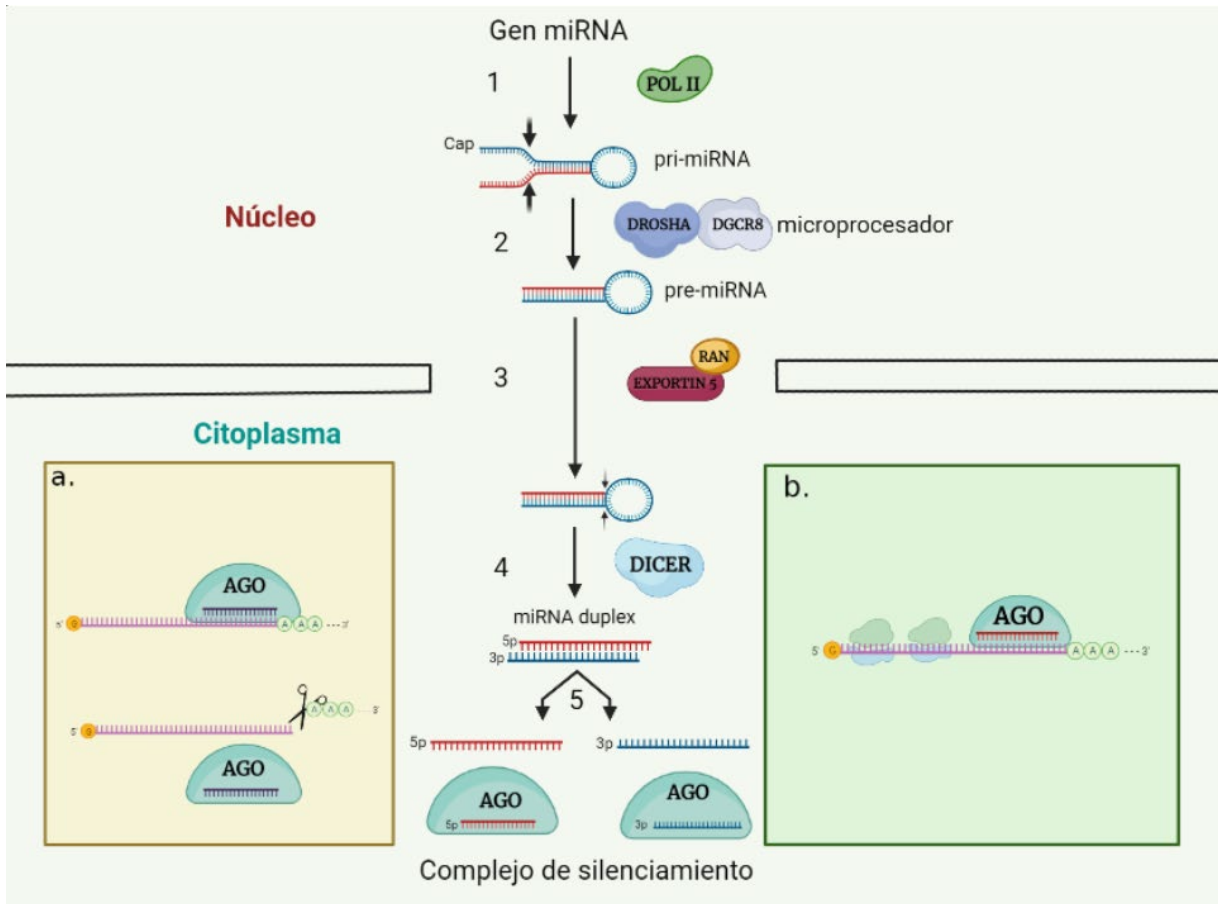


Fig. 3. Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs (30,31) (1) Transcripción del pri-miRNA por parte de la RNA polimerasa II; (2) procesamiento del transcrito por el microprocesador; (3) transporte hasta el citoplasma por Exportina5; (4) procesamiento y formación del miRNA dúplex por DICER; (5) selección de hebra guía y unión a proteína AGO para formar complejo de silenciamiento; (a) degradación del mRNA diana; (b) bloqueo de la traducción del mRNA diana. (modificado a partir de Bartel (30)).

2.1 Rol de los redoximirs en cáncer y su participación en el estrés oxidativo.

Como ya se ha mencionado, los miRNAs están presentes en múltiples procesos fisiológicos, incluyendo la regulación del metabolismo redox de la célula, ya que una gran cantidad de miRNAs presentan sensibilidad al estrés oxidativo, participando en procesos como la regulación de la expresión de generadores de ROS, sensores redox y componentes de la maquinaria celular antioxidante (39). Esta interacción de miRNAs con el estrés oxidativo, se da en ambas direcciones, los miRNAs afectan los procesos relacionados con el estrés oxidativo, y este a su vez genera cambios en la expresión, función y estabilidad de los miRNAs, influyendo sobre sus factores de transcripción, biogénesis y generando modificaciones epigenéticas en las secuencias que los codifican (39,40). A estos miRNAs se les conoce con el nombre de redoximiRs y varios ejemplos se encuentran representados en la figura 4 (41).

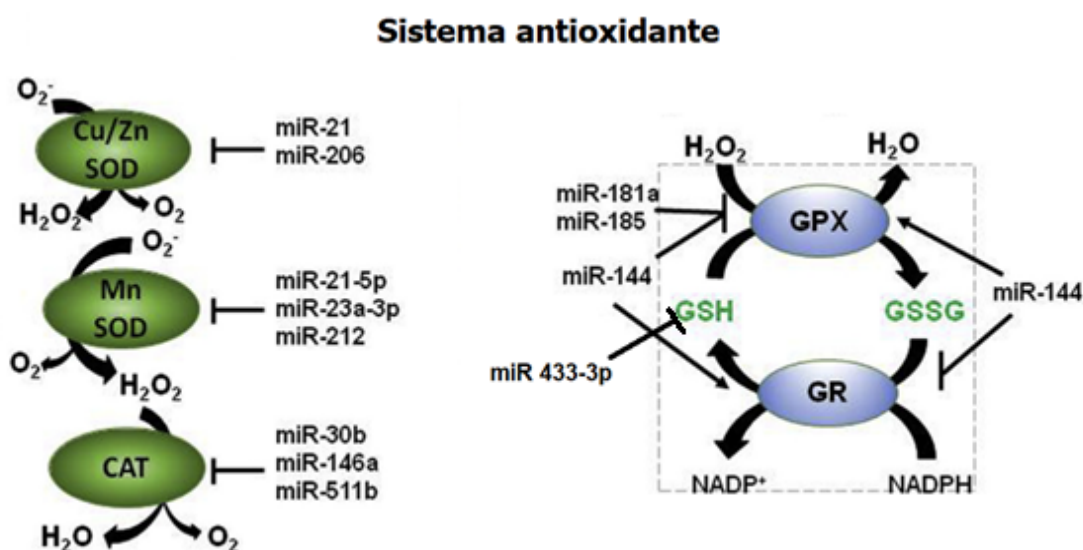


Fig. 4. Sistema antioxidante y redoximiRs. (modificado de Leisang et al.(39). Se representa la acción inhibitoria o activadora de los redoximiRs sobre moléculas antioxidantes tales como la SOD, CAT, GPX y GR. La línea truncada representa inhibición y la punta de flecha indica activación.

Adicional a los ejemplos mostrados en la figura 4 existen otros redoximiRs que participan en procesos de proliferación celular y ferroptosis en cáncer, algunos ejemplos de ellos son el mir-509-5p, el cual dependiendo de si esta disminuido o aumentado,

afecta directamente en procesos como la viabilidad, proliferación e invasión tumoral en el cáncer de mama (42). Otro redoximiR que participa en la progresión del cáncer es el mir-137, el cual, al estar sobre expresado, impide la muerte de las células cancerígenas del melanoma, evadiendo la vía de muerte celular conocida como ferroptosis (37). Un último ejemplo es el mir-433-3p, el cual es un miRNA que puede reducir los niveles de GSH al interior de células de tipo HUVEC (fig. 4.), a través de la modulación de la ligasa de glutamato-cisteína, disminuyendo en específico esta defensa antioxidante de la célula tumoral, se traduce en una respuesta disminuida de la célula a la exposición a un agente oxidante como es el H_2O_2 , demostrando que sus defensas decaen en contraste a las células que no fueron tratadas con el redoximir (43). Por lo anterior dicho, los redoximiRs parecen ser una estrategia bastante prometedora contra el cáncer, ya que pueden ser ocupados en conjunto con agentes pro-oxidante como la quimioterapia, facilitando la inducción de estrés oxidativo en células tumorales, pudiendo ser parte de nuevos tratamientos en el futuro.

2.2 Estrategias para el estudio de los miRNAs en líneas celulares

Debido a su participación en gran parte de los procesos celulares, el uso de miRNAs y otros oligonucleótidos sintéticos (ONs), se han convertido en parte importante en el análisis de las funciones celulares, esto en gran medida porque pueden ser transfectados de manera relativamente sencilla en la gran mayoría de las líneas celulares que se utilizan hoy en investigación. Para esto existe una amplia oferta comercial de reactivos como formulaciones catiónicas de naturaleza lipídica que permiten llevar a cabo la transfección (44). Sin embargo, el problema surge en el momento de usar estos ONs en sistemas vivos. Obstáculos tales como la degradación de estos en los fluidos biológicos, el traspaso a través de barreras celulares e incluso el mismo tráfico intracelular, son puntos factores que se deben tomar en cuenta cuando se desarrollan nuevas estrategias respecto a las terapias basadas en ácidos nucleicos (45). Por otra parte, y no menos importante, los reactivos basados en lípidos catiónicos, que son utilizados tradicionalmente, presentan un nivel de citotoxicidad considerable, además de distintos porcentajes de eficiencia de transfección (Tabla 1). Por lo anterior, es que se propone el uso de nuevas estrategias para el ingreso de ONs bioactivos al interior de la célula. Entre estas estrategias se encuentran el uso de péptidos como vectores de transporte, los

cuales poseen un metabolismo predecible y, por lo tanto, también poseen una baja incidencia de efectos secundarios. Adicionalmente, los metabolitos generados por estos péptidos normalmente no son tóxicos a diferencia de la mayoría de otras drogas (46).

Tabla 1. Reactivos comerciales de transfección (47).

Reactivo de transfección.	Línea MCF-7		Línea HEK-293	
	Porcentaje de eficiencia relativa de transfección.	Porcentaje de viabilidad celular.	Porcentaje de eficiencia relativa de transfección.	Porcentaje de viabilidad celular
Lipofectamina 3000	58.13%	62%	42.52%	61.70%
Lipofectin	6.62%	92.49%	~ 19%	87.29%
RNAiMax	31.92%	> ~80%	25.60%	89.30%
Fugene	27.80%	> ~80%	40.51%	68.83%
Lipofectamina 2000	33.29%	> ~80%	~ 35%-37%	~ 45%-55%

Nota: Las líneas celulares MCF-7 y HEK-293 corresponden a línea tumoral de mama y a línea embrionaria epitelial de riñón respectivamente.

3. Péptidos penetrantes celulares y nano partículas basadas en péptidos.

3.1 Péptidos

Los péptidos están involucrados en una gran variedad de procesos bioquímicos y fisiológicos. Estos pueden estar formados hasta por 50 aminoácidos y no cuentan con estructura tridimensional terciaria, a diferencia de las proteínas (48). Entre algunas de las funciones que cumplen los péptidos dentro de los sistemas vivos, destacan su actividad como moléculas de señalización, hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, neuropéptidos y antibióticos. Además, la diversidad estructural y el alto nivel de selectividad que poseen los péptidos, los hacen excelentes candidatos en el desarrollo de nuevas terapias (49,50). Esta diversidad estructural, hace que los

peptidostengan múltiples actividades, tales como antimicrobianas (51), inmunomoduladoras (52), reguladores hormonales (53) y penetrantes celulares (54).

Debido a sus propiedades para translocar al interior de la célula y asociarse a otras moléculas de tipo ácidos nucleicos, como los miRNAs, los RNAs interferentes pequeños (siRNAs) y plásmidos (pDNA), facilitando su ingreso y permitiendo que actúen de forma intracelular(55), la actividad penetrante es la de mayor interés para este estudio.

Ryser y colaboradores (1978) intentaron por primera vez aprovechar la habilidad de los péptidos catiónicos para administrar fármacos a través de membranas biológicas (56). Con esto surgió un nuevo enfoque en el uso de péptidos, esta vez con los llamados péptidos penetrantes celulares (CPPs, por su sigla en inglés de *Cell penetrating peptides*), los cuales se caracterizan por ser cadenas cortas de no más de 30 aminoácidos de naturaleza catiónica y/o anfipáticas. Pueden presentar diversos orígenes, como por ejemplo humano, murino, microbiano o puramente sintético. Hoy por hoy constituyen una de las estrategias no virales más prometedoras a la hora de mejorar la administración de ácidos nucleicos (NAs, por sus siglas en inglés), al interior de la célula, siendo una gran alternativa respecto a las ya existentes como lo son métodos basados en lípidos, polímeros y virus (57).

Gracias al trabajo de Ryser y colaboradores (56), la investigación de los CPPs ha crecido y se han identificado múltiples secuencias peptídicas. Estas estructuras derivan de elementos que componen proteínas y los que presentan de forma natural, la capacidad de translocarse al interior de la célula (55). Algunos de los CPPs más destacables son el péptido derivado del transactivador de transcripción del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-TAT), el péptido Penetratina-1 el cual deriva del homeodominio de la antenapedia de la Drosophila, el péptido quimérico Transportan el cual deriva de la galanina y por último el péptido Mastoporan derivado del veneno de avispa (55). En la tabla 2 se muestran algunos de estos CPPs junto con otros de gran importancia en la literatura. Además se proporciona información relevante respecto a su secuencia aminoacídica, su clase, carga eléctrica y mecanismo de acción. De tal manera que se observa en esta tabla la gran variedad de posibilidades de uso.

Tabla 2. Tipos de CPP y sus principales características. Obtenida de Rádis-Baptista (58)y Ruseska y Zimmer (59).

Nombre	Secuencia	Clase	Carga	Mecanismo de internalización
TAT	YGRKKRRQRRR	Catiónico	8	Endocitosis
Penetratina	RQIKIWFQNRRMK WKK	Catiónico	7	Endocitosis
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	Anfipática	4	Múltiple (EN,TD y FP)
Mastoporan	INLKALAALAKKIL-NH2	Anfipática	3	TD/FP
Arg 8	RRRRRRRR	Catiónico	8	Endocitosis

Abreviaciones: EN: Endocitosis; TD: Translocación directa; FP: Formación de poro.

3.2 Nano partículas basadas en péptidos

Otra gran ventaja de los CPPs es su capacidad de interaccionar con una gran variedad de moléculas, entre las cuales están pDNA, siRNAs, los oligonucleótidos antisentido (ASOs), mRNAs y los miRNAs (44). La manera en que interaccionan y se asocian los CPPs con los NAs, puede ocurrir de dos maneras, a través de unión covalente o no covalente, siendo la segunda la estrategia más utilizada debido a sus interacciones iónicas e hidrofóbicas. Sea cual sea la forma en que se asocien los CPPs con los NAs dan como resultado las llamadas nano partículas basadas en péptidos (PBN) (42). Algunos ejemplos del uso de PBNs es el péptido LK junto con el mir 2861, aumentando la osteogénesis en células madre mesenquimales (60). Otro ejemplo es el complejo formado por el péptido TATbim junto con el miR-34a, ambas moléculas tienen la capacidad de inducir apoptosis en células de tipo HeLa, por lo que una vez unidas formando esta PBN, obtienen un efecto sinérgico más potente que si se utilizaran cada molécula por separado (61). La Tabla 3 muestra más ejemplos de la utilización de PBNs formados por péptidos y miRNAs.

Tabla 3. Complejos CPP-miRNA

CPP	miRNA	Función
PepFect-6	AntimiR-21	PBN con propiedades anticancerígenas (62)
R9-LK15	miRNA-29b	Promoción de la diferenciación osteogénica en células madres mesenquimales(63).
PAS-pHK	miRNA-126	PBN con propiedades anticancerígenas(64)
NF71	miRNA-146a	Supresión de genes proinflamatorios.(65)

Abreviaciones :PBN :Nano partículas basadas en péptidos.

Las PBNs para poder ingresar al interior de la célula deberán en primer lugar interactuar con la membrana celular, aquí la internalización del complejo puede ocurrir bajo dos posibles mecanismos descritos no excluyentes. El primer mecanismo de internalización es por la vía de la endocitosis, mientras que el segundo ocurre mediante una translocación directa independiente de energía. El balance entre ambas vías está influenciado directamente por distintos factores, tales como la secuencia y la concentración de los CPPs, así como la temperatura en la que se realiza la incubación de los PBNs con la célula (54,66,67). Un punto importante a considerar es que en el caso en que el PBN ingrese a través de la vía endocítica, este debe escapar del interior del endosoma para poder realizar su función al interior de la célula (54). Respecto a lo anterior, los péptidos con la capacidad de generar lisis del endosoma, como lo son los péptidos activos de membrana dependientes del pH (PMAPs), presentan un mejor desempeño al interior de la célula respecto de los péptidos que no tienen esta característica. Es debido a esta ventaja que muchas veces estos péptidos son unidos a un péptido base con el fin de mejorar su eficiencia (68). Algunos ejemplos de esto son el péptido de fusión HA2, el péptido GALA y KALA (69–71)

3.3 Uso de un péptido derivado de IL-8 de salmones como potencial CPP para el transporte de miRNAs

Nuestro grupo de investigación ha realizado estudios de un péptido derivado de salmón que posee actividad antimicrobiana y que además se ha evidenciado que es capaz de translocar al interior de líneas celulares del tipo monocito/macrófago de bazo y riñón, epitelial de branquia y epitelial de intestino de salmónidos (72,73). Este péptido ha recibido el nombre de ss-IL-8 α , el cual está compuesto por 17 aminoácidos (SAPWVKRVIKKMLANNK), es catiónico y posee una propensión estructural tipo α -hélice, como se representa en la figura 3. Además su estructura como péptido antimicrobiano (AMP por sus siglas en inglés) le da una ventaja ya que puede asociarse con otras moléculas para funcionar a modo de vector de transporte (73). Debido a las características anteriormente es que resulta un péptido prometedor para asociarlo a un miRNA, y translocarlo al interior de la célula.

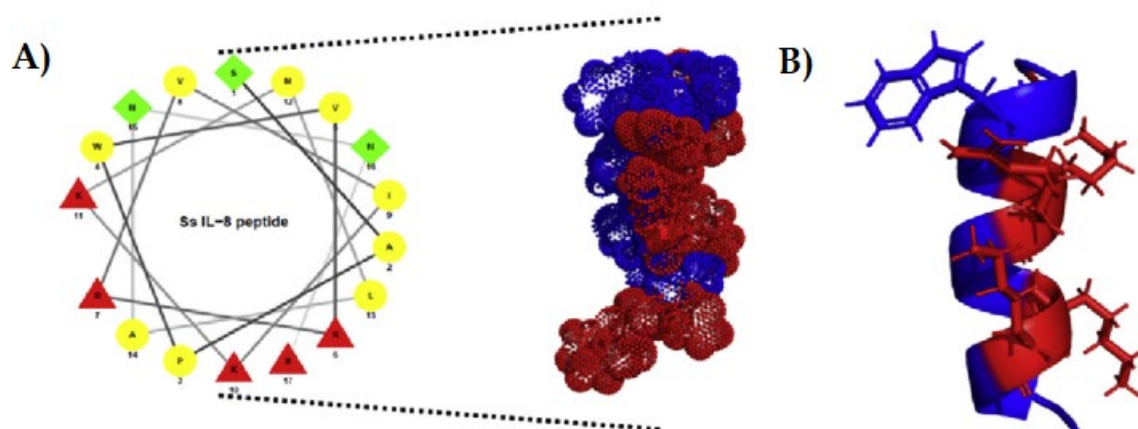


Fig. 5. Representación del péptido ss-IL-8 α . extraído de Santana y colaboradores. (72)

(A) Proyección de rueda helicoidal del péptido ss-IL-8 α , los círculos amarillos representan los residuos hidrofóbicos presentes en la estructura del péptido, los diamantes verdes representan los residuos hidrófilos, mientras que los triángulos rojos representan los residuos con potencial carga positiva. (B) Representación en 3D de la estructura α -hélice del péptido ss-IL-8 α , con azul se representa el aminoácido triptófano, mientras que con rojo los residuos positivos ubicados en la cara polar de la hélice.

4. ¿Es posible modular la acción de GSH al aplicar el complejo ss-IL-8 α -mir-433p?

En el cáncer el GSH tiene un rol dual, por una parte, previene la acumulación de moléculas oxidantes y por consecuencia la producción de metabolitos citotóxicos así como mutagénicos, y por otra parte se ha demostrado que el incremento en niveles de GSH debido a la sobre-expresión a nivel transcripcional de las enzimas GCL y de GS en diversos cánceres como el de médula ósea, mama, colon, laringe, ovario, próstata y pulmón, le confieren al tumor resistencia contra la quimio y la radioterapia (10,16,19). Debido a este rol dual es que se elige al GSH como una diana terapéutica de estudio.

Debido a lo anterior, los miRNAs son moléculas con altas posibilidades de generar cambios en los niveles de glutatión al interior de la célula, ya que regulan a las enzimas que participan en su síntesis. De este modo, se ha decidido utilizar el miRNA 433-3p, donde su mecanismo de acción se encuentra representado en la figura 6. En ella se muestra que su diana se encuentra en la región 3' UTR del mRNA que traduce para la enzima GCL. Se ha demostrado de manera *in vitro* que regula la expresión tanto de la unidad catalítica de la enzima GCL como la unidad modificadora de esta (43).

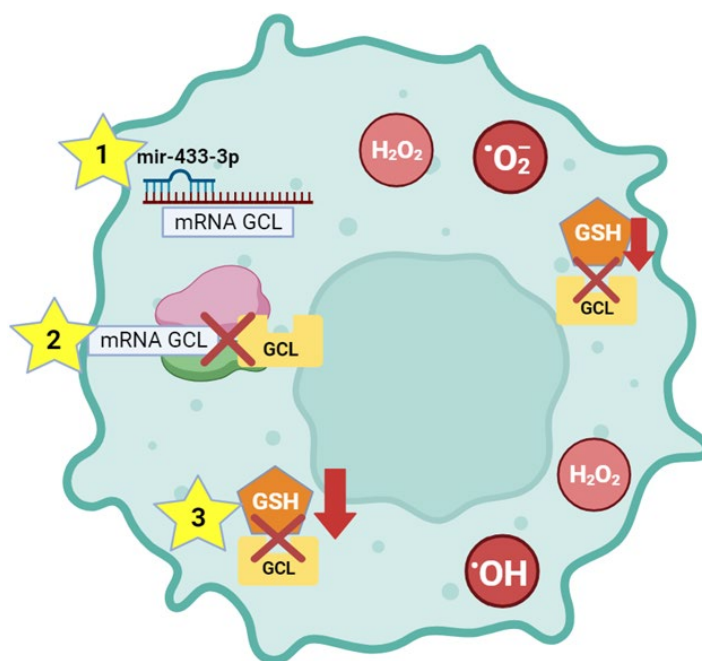


Fig.6. Acción del mir-433-3p sobre la GCL. Modificado de Bansal y Simon (10)).

1) El mir-433-3p se une al mRNA de la enzima GCL. 2) La unión del mir-433-3p impide la traducción de la enzima GCL por la maquinaria ribosomal. 3) Al disminuir la expresión de enzima GCL, se impide la síntesis del GSH, por consecuencia disminuye su biodisponibilidad.

El mecanismo por el cual se genera el GSH comienza por la unión de los aminoácidos glutamato y cisteína por parte de la GCL. Es en esta etapa de la síntesis en donde el mir-433-3p realiza su acción reguladora, disminuyendo la expresión de GCL representado por la estrella nº3 en la figura 6, afectando en última instancia la síntesis de GSH.

Dado los antecedentes presentados, en este proyecto se propone utilizar un potencial péptido penetrante ss-IL-8a para transportar el mir 433-3p al interior de líneas celulares no tumorales y tumorales de mama, con el fin de inducir una disminución de la expresión de la enzima GCL, generando como consecuencia la disminución del antioxidante GSH y con ello lograr la inducción de muerte celular por acumulación de ROS.

HIPÓTESIS

El complejo conformado por el péptido ss-IL-8α y el microRNA mir -433-3p es capaz de translocar al interior de la célula de líneas celulares tumorales y no tumorales de mama y generar una reducción de la actividad de la enzima GSH mediante la disminución de la expresión de la proteína cisteína-glutamato Ligasa.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que el péptido ss-IL-8α es capaz de transportar el mir-433-3p en líneas celulares tumorales y no tumorales de mama para modular la expresión de la proteína GCL.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Validar la actividad penetrante del péptido ss-IL-8α en líneas celulares normales y tumorales de mama.
2. Evaluar el ingreso del complejo ss-IL-8α/mir-433-3p en las líneas celulares normales y tumorales de mama, mediante la unión al péptido ss-IL8α
3. Medir el efecto del mir-433-3p sobre la expresión de la proteína GCL y los niveles de GSH en líneas celulares normales y tumorales de mama.

METODOLOGÍA

Materiales:

Líneas celulares: Para realizar el estudio se utilizaron las líneas celulares establecidas MCF-7 (HTB-22™) derivada de células epiteliales de adenocarcinoma de glándula mamaria, la línea MDA-MB-231 (HTB-26™) también derivada de células epiteliales de adenocarcinoma de glándula mamaria y la línea MCF-10A (CRL-10317™) derivada de células epiteliales de glándula mamaria como control normal.

Péptido sintético: se contó con el péptido sintético SAPWVKRVIKKMLANNK denominado ss-IL-8α el cual fue caracterizado por HPLC, ESI-MS y dicroísmo circular. Posterior a la síntesis del péptido con resina, se eliminaron los grupos de bloqueo y el péptido se separó de la resina mediante el uso ácido trifluoroacético (TFA)/ Trisopropilsilano (TIS)/ agua (95/2.5/2.5). Para luego ser liofilizado y purificado por RP-HPLC (72).

Metodología:

OE1: Validar la actividad penetrante del péptido ss-IL-8α en líneas celulares normales y tumorales de mama.

Actividad 1. Cultivo celular:

Las tres líneas celulares mencionadas con anterioridad fueron descongeladas para su utilización, estas se encontraban en un stock almacenado y conservado a -80°C. Mediante un protocolo de descongelación, se sembraron en placas de 100 mm de diámetro. Con ello, se mantuvieron y posteriormente se pasaron a placas de 6 pocillos

en donde se llevaron a cabo los experimentos. El cultivo de las células se realizó en un incubador a 37°C en una atmósfera con CO₂ al 5%. El medio de cultivo que se utilizó fue DMEM Low Glucose (Mediatech Inc, Corning, USA.) este fue suplementado con suero bovino fetal al 10% (Mediatech Inc, Corning, USA). Las células se mantuvieron cultivadas hasta que llegaron a una confluencia del 70-80% para luego ser divididas en líneas de mantención y experimentación.

Actividad 2. Evaluación de la citotoxicidad del péptido ss-IL-8α

Para este experimento se utilizaron tres placas de 96 pocillos, en donde cada placa contenía una de las tres líneas celulares de mama, dos líneas celulares tumorales (MCF-7 y MDA) y la línea celular no tumoral MCF-10A. Se realizaron tratamientos por sextuplicado con las siguientes concentraciones del péptido ss-IL-8α para cada placa de cultivo, 10, 5, 1, 0,5, 0,25, 0,125 y 0,0625 μM durante 24 horas. Después se evaluó la citotoxicidad mediante el ensayo de sulforodamina B (SRB) descrito por Vichai y Kirtikara (74). Las células post tratamiento fueron fijadas con 25 μl de TCA al 50% para luego tñirlas con SRB, colorante que se une a las proteínas presentes en las células fijadas y entrega una relación directa de la masa celular total, las muestras fueron analizadas por espectrofotometría a 540 nm.

Actividad 3. Evaluación de la penetración del péptido ss-IL-8α mediante microscopía de fluorescencia.

Para analizar la penetración del péptido ss-IL-8α al interior de la célula se realizó microscopía de fluorescencia utilizando el péptido marcado con rodamina B. El núcleo se marcó con Hoechst 33342.

Los tratamientos realizados fueron:

- Control negativo: Solo se tñieron los núcleos celulares con Hoescht.
- Tratamiento solo con el péptido ss-IL-8α marcado con rodamina y los núcleos tñidos con Hoescht

Para la visualización de las tinciones fluorescentes se utilizó el microscopio de fluorescencia de campo oscuro Olympus BX53.

El protocolo para llevar a cabo este procedimiento requirió colocar cubreobjetos de vidrio al interior de los pocillos de placas de 4 pocillos, para que las células crecieran sobre estos. Luego se realizó el cultivo de las líneas celulares tumorales y no tumorales en placas diferentes, una vez lograda la confluencia requerida (60-70%) se continuó con el proceso.

En primer lugar, se eliminó el medio de cultivo con suero y se realizaron lavados con buffer fosfato-salino (PBS) 1X estéril. Posterior al lavado, se realizaron los tratamientos, previamente indicados, en medio de cultivo sin SBF durante una hora en oscuridad. Luego se eliminó el medio de cultivo, posteriormente se lavó dos veces con PBS 1X, y por último se realizó un lavado de PBS1x + suero bovino fetal 10% (SBF) esto con el fin de eliminar el péptido en la superficie celular. Finalmente, se sacaron los cubre objetos del interior de los pocillos, y se colocaron en un portaobjetos para posteriormente sellarlos con medio de montaje para su posterior visualización por microscopía de fluorescencia.

OE2: Evaluar el ingreso del complejo ss-IL-8 α /mir-433-3p en las líneas celulares normales y tumorales de mama, mediante la unión al péptido ss-IL8 α

Actividad 4. Formación del complejo péptido ss-IL-8 α /microRNA mir -433-3p

Para generar la formación del complejo péptido-miRNA se utilizó el protocolo de Lockhart y colaboradores (75). Para ello se diluyeron por separado una concentración de 50 ng/ μ l de miRNA y 400mM de péptido en agua libre de DNAsas y RNAsas. El miRNA junto con el péptido fueron combinados en agua libre de DNAsas y RNAsas e incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente. La incubación se realizó en las siguientes proporciones en relación a su masa: 1:1, 1:5 ,1:10, 1:20, 1:40, 1:60 y 1:80 de

miRNA:Péptido respectivamente. Para poder visualizar la unión del péptido con el miRNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% cargado con 5 μ l de GelRed (marcador para electroforesis de ácidos nucleicos) a 50V y amperaje constante durante 1 hora para posteriormente visualizar el producto en un transiluminador.

Actividad 5. Medición del tamaño del complejo péptido ss-IL-8 α /microRNA mir -433-3p

Una vez generados los complejos péptido ss-IL-8 α /microRNA mir -433-3p y demostrada su unión mediante electroforesis, se analizó el tamaño de las nano partículas generadas a través de la técnica de dynamic light scattering (DLS) como lo describen Kim y colaboradores (61). Para ello a 50 ng de miRNA se les agregó las cantidades correspondientes de péptido para formar las distintas proporciones (1:1-80:1) de complejo, en un volumen inicial de 50 μ L de agua Milli-Q al que luego se le agregó 950 μ L de agua Milli-Q, para llegar a un volumen final de 1 mL que posteriormente fue colocado en una cubeta plástica para su análisis, utilizando para esto el equipo Zetasizer Lab de Malvern Panalitical.

Para la medición del potencial Z (ZP), que nos entregó los valores de las cargas presentes en los nano-complejos, también se utilizó el protocolo de Rádis-Baptista (58), así como el equipo Zetasizer Lab de Malvern Panalitical. Para esta medición se utilizó una cubeta DTS 1070 que posee capilares y electrodos para el paso de la corriente a través del agua Milli-Q en donde se encontraba inmersa nuestra muestra.

Tanto la mediciones de DLS como del PZ, se llevaron a cabo en todas las proporciones 1:1, 1:5 ,1:10, 1:20, 1:40, 1:60 y 1:80 de miRNA:Péptido , además de mediciones del péptido y el miRNA por separados.

Actividad 6. Evaluación de la citotoxicidad del complejo

Para este experimento se utilizaron tres placas de 96 pocillos, en donde cada placa contenía una de las tres líneas celulares de mama, dos líneas celulares tumorales (MCF-7 y MDA) y la línea celular no tumoral MCF-10A, estas fueron sembradas, y mantenidas en medio DMEM bajo en glucosa suplementado con SBF 10%, en incubador a 37°C con atmosfera de CO₂ al 5%. Se realizaron tratamientos por sextuplicado, en todos los pocillos se eliminó el antiguo medio y se agregó medio DMEM incompleto sin SBF, luego se incubó la misma cantidad del complejo péptido ss-IL-8α/microRNA mir -433-3p en relación 40:1 (16μM del péptido ss-IL-8α y 400 nM de mir-433-3p), durante 24, 48 y 72 horas para posteriormente evaluar citotoxicidad mediante el ensayo de sulforodamina B descrito por Vichai y Kirtikara (74), donde las células post tratamiento fueron fijadas con 25 μl de TCA al 50% para luego teñirlas con SRB, colorante que se une a las proteínas presentes en las células fijadas y entrega una relación directa de la masa celular total, las muestras fueron analizadas por espectrofotometría a 540 nm.

Actividad 7. Evaluación de la penetración del complejo péptido ss-IL-8α/microRNA mir -433-3p mediante microscopía de fluorescencia.

Para analizar la penetración del complejo péptido ss-IL-8α/microRNA mir -433-3p al interior de la célula se utilizó el mismo protocolo de la actividad 3. Adicionalmente, se ocupó el microRNA sin marcar, pero previamente incubado con el péptido marcado de la misma manera que se menciona en la actividad 4.

Los tratamientos a realizar fueron:

- Control negativo: Solo se tiñeron los núcleos celulares con Hoescht.
- Tratamiento solo con el péptido marcado con rodamina
- Tratamiento del péptido marcado con rodamina junto con el microRNA previa formación del nanocomplejo.

El protocolo para llevar a cabo este procedimiento requirió colocar cubreobjetos de vidrio al interior de los pocillos de placas de 4 pocillos, para que las células crecieran sobre

estos. Luego se realizó el cultivo de las líneas celulares tumorales y no tumorales de mama en placas diferentes, una vez lograda la confluencia requerida (60-70%) se continuó con el proceso.

En primer lugar, se eliminó el medio de cultivo con suero y se realizaron lavados con PBS 1x estéril. Posterior a el lavado, se incuban los tratamientos en medio de cultivo sin SBF durante una hora en oscuridad, para luego ser eliminado el medio de cultivo, posteriormente se lava dos veces con PBS 1x, y por último se realiza un lavado de PBS1x + suero bovino fetal (SBF) 10% que busca eliminar el péptido en la superficie celular. Finalmente, se sacan los cubre objetos del interior de los pocillos, son colocados en un portaobjetos y son sellados con medio de montaje para su posterior visualización en el microscopio de fluorescencia.

Evaluación del ingreso del complejo ss-IL-8α/mir-433-3p

mediante PCR

Actividad 8. Siembra y tratamiento del cultivo celular:

Se sembraron cultivos celulares de las líneas normales y tumorales de mama en placas de 6 pocillos, una vez que llegaron a una confluencia de entre el 60-70%, se realizaron los siguientes tratamientos durante 1 hora. Con medio de cultivo libre de SBF.

Tabla 4. Tratamientos.

Tratamiento	Descripción
Control negativo	Solo se cambió el medio de cultivo del pocillo tratado.
Solo péptido	Células incubadas junto con el péptido ss-IL-8α
Solo miRNA	Células incubadas junto con el mimic de mir-433-3p
Complejo péptido + mimic	Células incubadas con el complejo ss-IL-

	8a: mimic/mir-433-3p
Complejo péptido + antimir	Células incubadas con el complejo ss-IL-8a: antimir/mir-433-3p

Actividad 9. Extracción de RNA:

Pasada la hora, fue eliminado todo el medio de cultivo presente y se extrajo el RNA mediante el método TRIzol (76). A cada placa de 6 pocillos se le agregó 500 µL de Trizol y el lisado fue pasado a un tubo eppendorf de 1,5 ml. Al Tubo se le agregó una cantidad de 100 µL de cloroformo y se dejó incubar a temperatura ambiente (T°A) durante 2-3 minutos, posterior a la incubación se centrifugó a 10.000 X *g* durante 10 min a T°A, se extrajo el sobrenadante y se pasó a un nuevo tubo. Al nuevo tubo se le agregó 250 µL de isopropanol y se agitó vigorosamente, posterior a eso se centrifugo a 10.000 X *g* por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y colocó en etanol, centrifugando a 10.000 X *g* por 10 minutos a 4°C. El sobrenadete fue eliminado y se dejó secar el pellet al aire. Una vez seco se re suspendio en H₂O Milli-Q.

Una vez obtenido el RNA, este se cuantificó mediante fluorimetría con el equipo Quantus™ de Promega.

Actividad 10. Transcripción reversa y qPCR:

Una vez se extrajeron todos los RNAs se realizó una transcripción reversa, para eso se utilizó un mastermix universal junto con un primer RT específico del mir-433-3p, además de otro para el RNA nuclear pequeño humano U6 (snRNA U6), que sirvió como normalizador. Dar un poco más de detalle

El perfil térmico que se utilizó en el termociclador está señalado en la tabla 5:

Tabla 5. Perfil térmico termociclador retro transcripción.

Temperatura	Tiempo
16°C	30 min

42°C	30 min
85° C	5 min
4° C	∞

Para medir las variaciones en el número de transcritos de microRNA en cada uno de los tratamientos se utilizó la técnica qPCR con sondas de hidrólisis TaqMan®. Para esto se utilizó el cDNA obtenido del paso anterior, el cual se mezclará en proporciones específicas junto a un mastermix universal (1,33 µL de cDNA y 18,67 µL) , además de las sondas de hidrólisis TaqMan® específicas para el cDNA del mir-433-3p así como para el cDNA de U6 como normalizador.

El perfil térmico que se utilizó se muestra en la tabla 6.:

Tabla 6. Perfil térmico termociclador PCR

		PCR	
Etapa	Activación enzima	Ciclos 39 X	
		Denaturación	Anneal/Extension
Tº	95° C	95° C	60° C
Tiempo	20 segundos	3 segundos	30 segundos

OE3: Medir el efecto del mir-433-3p sobre la expresión de la proteína GCL en líneas celulares normales y tumorales de mama.

Actividad 11. Tratamiento en las líneas celulares

Para este experimento se utilizó un n=3, para cada una de las líneas celulares normales y tumorales. Las líneas celulares fueron sembradas en placas de 6 pocillos, una vez que

se logró la confluencia del 60-70% a cada n se le eliminó el medio de cultivo y se le realizó uno de los 5 tratamientos durante 48 horas de la tabla 7.

Tabla 7. Tratamientos

Tratamiento	Descripción
Control negativo	Solo se cambió el medio de cultivo del pocillo tratado.
Solo péptido	Células incubadas junto con el péptido ss-IL-8α
Solo miRNA	Células incubadas junto con el mimic de mir-433-3p
Complejo péptido + mimic	Células incubadas con el complejo ss-IL-8α: mimic/mir-433-3p
Complejo péptido + antimir	Células incubadas con el complejo ss-IL-8α: antimir/mir-433-3p

Actividad 12. Extracción y cuantificación de proteínas

Posterior a 48 horas desde la incubación de las células con el complejo péptido-miRNA 40:1, las células fueron lavadas con PBS y lisadas con 30 µl de buffer de lisis RIPA (25mM Tris/HCL pH 7.6, 150 nM NaCl, 1% NP-40, 1% desoxicolato de sodio, 0,1% de solución de dodecilsulfato sódico, 1mM PMSF, 0.2 mM Na₃VO₄ y 0.2nM NaF).

Las proteínas extraídas fueron cuantificadas mediante un lector de microplacas, a 562 nm. Para esto se agregaron 25 µl de cada muestra junto con 200 µl de solución de trabajo en cada pocillo de la placa lectora, esto se hizo por duplicado. Además, se midieron soluciones con muestras estándar de BSA con la que se realizó una curva estándar, lo que permitió determinar la concentración de proteínas presentes en cada una de las muestras extraídas.

Actividad 13. Inmunoensayo ELISA

Para realizar el ensayo ELISA se realizó el protocolo descrito a continuación para cada uno de los tratamientos, en las 3 líneas celulares de mama, la línea no tumoral MCF-10A, y las dos líneas tumorales MDA-MB-231 y MCF-7.

Como control positivo para este ensayo se utilizó proteína extraída de tejido de hígado de rata, y como control negativo solo se agregó PBS en lugar de proteína.

En primer lugar, se activó la placa de ELISA (Maxisorp, Nunc), con 10 ng/μl de proteína (extraída de cada cultivo celular con su respectivo tratamiento) diluida en PBS durante toda la noche a 4°C. Luego se realizaron tres lavados con PBST y a continuación se bloqueó a un volumen final de 200 μl con BSA 1% diluido en PBS (PBSA), por 2 horas a 37°C con agitación suave. Luego se incubó con una dilución de 1:500 del primer anticuerpo monoclonal anti-GCLC (Invitrogen # MA5-26346) por 1 hora a 37°C con agitación suave. Después de 3 lavados, se adicionó el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (H+L), (Thermo), a una dilución de 1:7000 por 1 hora a 37°C con agitación suave. Para revelar se utilizaron 100 μl por pocillo del reactivo 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina (TMB), (Invitrogen) y se dejó incubando por un tiempo máximo de 30 minutos a temperatura ambiente. Posterior a esto se adicionaron 50 μl de ácido sulfúrico 1N y se realizó la lectura se realizó a 450 nm con un lector de microplaca VERSA máx. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Actividad 14. Medición de los niveles de GSH, GSSG y la razón GSH/GSSG

Para este experimento se utilizó un n=3, para cada una de las líneas celulares normales y tumorales. Cada línea celular fue sembrada en placas de 6 pocillos, una vez se logró la confluencia del 60-70% cada línea celular se le extrajo el medio de cultivo y se le realizó uno de los siguientes tratamientos de la tabla 8 durante 12 horas.

Tabla 8. Tratamientos

Tratamiento	Descripción
Control negativo	Solo se cambió el medio de cultivo del pocillo tratado.

Solo péptido	Células incubadas junto con el péptido ss-IL-8α
Solo miRNA	Células incubadas junto con el mimic de mir-433-3p
Complejo péptido + mimic	Células incubadas con el complejo ss-IL-8α: mimic/mir-433-3p
Complejo péptido + antimir	Células incubadas con el complejo ss-IL-8α: antimir/mir-433-3p

Posterior a las 12 horas de incubación, se descartó medio de cultivo de cada pocillo, y las células fueron expuestas a un 1 mL por pocillo de solución hipotónica (0.1% Triton-X y 0.6% ácido sulfosalicílico en KPE) para obtener el GSH total intracelular, con el fin de cuantificar este mediante el protocolo descrito por Rahman et al.2006 ((77).

Este protocolo consistió en agregar, en una cubeta de cuarzo, 700 µL de buffer KPE (Fosfato de potasio 0,1M en EDTA 5mM pH 7,5), 100 µL de muestra tratada (precipitado celular en solución hipotónica) con 2 µL de 2-vinilpiridina y 120 µL de mezcla de DTNB:glutathión reductasa (GR) (1:1), se incubó durante 30 segundos y se realizó una primera lectura 412nm, la que entregó un primer valor [GSH]^{*1}. Luego a la mezcla se le agregaron 60 µL de β-NADPH, se agitó y se incubó durante 2 minutos para ser leída a 412λ entregándonos un segundo valor [GSH] total^{*2}. Con estos dos valores y mediante la (ecuación 1) se calculó la relación entre glutathión oxidado [GSSG], glutathión reducido [GSH] y GSH total.

$$[\text{GSH}] \text{ total}^{*2} = \text{GSH}^{*1} + 2 \times [\text{GSSG}] \quad (\text{ecuación 1})$$

Actividad 15. Análisis estadístico de los ensayos realizados.

Los datos obtenidos fueron recolectados y analizados mediante la herramienta informática GraphPad Software Inc. (Prism 8, USA). Se les aplicó análisis de normalidad, en el caso de datos paramétricos se les aplicó un One Way ANOVA test o Two way ANOVA dependiendo el caso. Para el análisis de los datos no paramétricos se decidió utilizar Kruskal Wallis test o Mixed model, solo cuando fue necesario.

RESULTADOS

OE1: Validar la actividad penetrante del péptido ss-IL-8 α en líneas celulares normales y tumorales de cáncer de mamas

Con el fin de evaluar la seguridad del péptido como eventual vector de transporte, se analizó su citotoxicidad en las 3 líneas celulares de mama, dos líneas tumorales de mama MCF-7 y MDA-MB231 y una línea no tumoral de mama MCF-10. Para ello, se realizó el ensayo de sulforodamina B en donde se expusieron todas las líneas celulares al péptido en concentraciones desde los 0,625 μ M hasta los 50 μ M durante 24 hrs.

Los resultados obtenidos de este ensayo son los que se muestran en la figura 7.

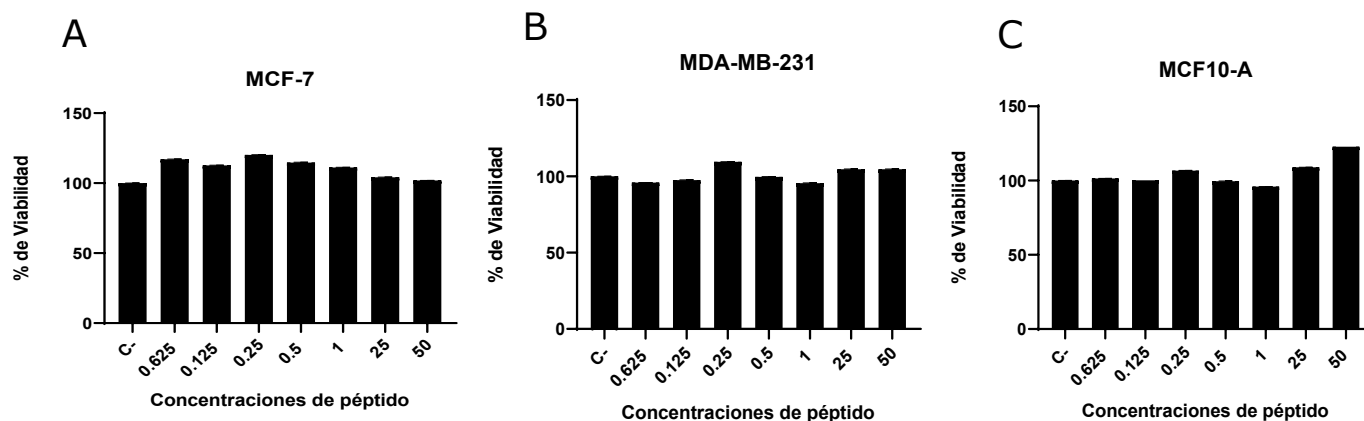


Fig.7. Efectos citotóxicos del péptido ss-IL-8 α . (A) Efectos citotóxicos en la línea celular Michigan Cancer Foundation 7 (MCF-7). (B) Efectos citotóxicos de la línea celular MD Anderson-Metastatic Breast-231 (MDA-MB-231). (C) Efectos citotóxicos en la línea celular Michigan Cancer Foundation-10A (MCF10-A). Representación gráfica del efecto sobre la viabilidad celular de la exposición al péptido ss-IL-8 α (0.625-50 μ M) durante 24 horas en las 3 líneas celulares de mama. Los datos se expresan como $\pm$ SD (n=6) *p < 0.05.

En los datos obtenidos del ensayo de sulfordamina B, se observó que el péptido ss-IL-8 α no mostró citotoxicidad a ninguna de las concentraciones utilizadas a las 24 hrs. Estos resultados fueron similares en las 3 líneas celulares estudiadas, sin diferencias significativas respecto al control (Figura 7).

Seguido de la obtención de los resultados del ensayo de sulforodamina B, se analizó la capacidad del péptido ss-IL-8 α para translocar al interior de las tres líneas celulares de mama, las dos líneas celulares tumorales MCF-7 y MDA-MB-231y la línea celular no tumoral MCF-10A. Para esto el péptido fue sintetizado junto con el marcador fluorescente rodamina B para poder ser visualizado al momento de entrar al interior de la célula mediante microscopia de fluorescencia. A continuación, se muestra las imágenes representativas de todas las líneas celulares en estudio y de su interacción con el péptido, además de la representación gráfica de la cantidad de fluorescencia cuantificada en cada línea celular.

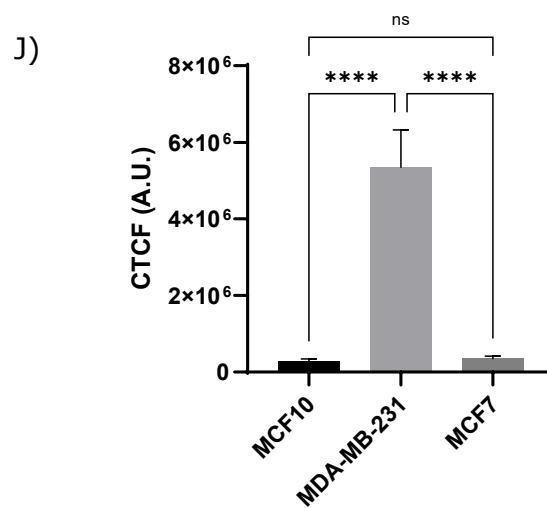
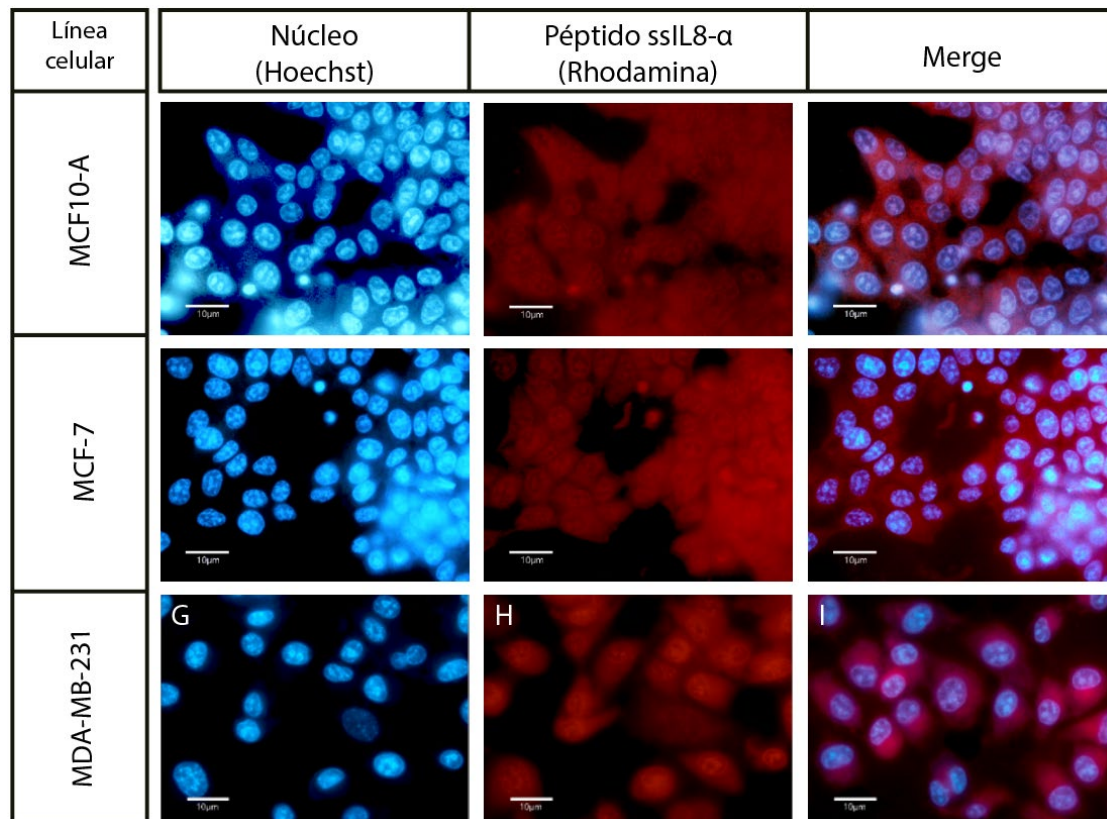


Fig.8. Microfotografía de microscopía de fluorescencia. Se observan microfotografías de la línea celular MCF-10-A, MCF-7 y MDA-MB-231. Las imágenes A, D y G corresponden a las tinciones nucleares con Hoescht; B, E y H corresponde a imágenes del péptido marcado con rodamina (5 μ M) y por ultimo las imágenes C, F e I corresponden a la unión de ambas imágenes para cada una de las líneas celulares. J, mediante Image J se cuantificó y calculó la fluorescencia celular total corregida.

Los resultados obtenidos de la fluorescencia nos indica que el péptido marcado con rodamina B es capaz de penetrar en las 3 líneas celulares de mama, las dos líneas tumorales MCF-7, MDA-MB-231, y en la línea no tumoral MCF-10 (Figura 8A a 8I). Además, mediante el análisis de la fluorescencia celular total corregida mediante el programa Image J, la línea MDA-MB-231, presenta una diferencia significativa ($p < 0,0001$) respecto a las otras dos líneas estudiadas, sugiriendo un mayor ingreso por parte del péptido ss-IL-8 α (Figura 8J)

OE2: Evaluar el ingreso del complejo péptido ss-IL-8 α - microRNA mir -433-3p en las líneas celulares normales y tumorales de cáncer de mama

Una vez evaluada la citotoxicidad y la capacidad penetrante del péptido ss-IL-8 α al interior de líneas celulares humanas, se evaluó la capacidad de este de unirse al miRNA mir-433-3p de manera no covalente, mediante unión por cargas. Para esto el péptido fue incubado junto con el miRNA en diferentes proporciones (400 nM de mir-433-3p y 400 nM de de péptido ss-IL-8 α , en proporciones 1:1, 1:5 ,1:10, 1:20, 1:40, 1:60 y 1:80), para luego evaluar en un gel de electroforesis de agarosa al 2%, la generación de la unión y además, la proporción en la cual ocurría la máxima unión de péptido con el miRNA. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 9.

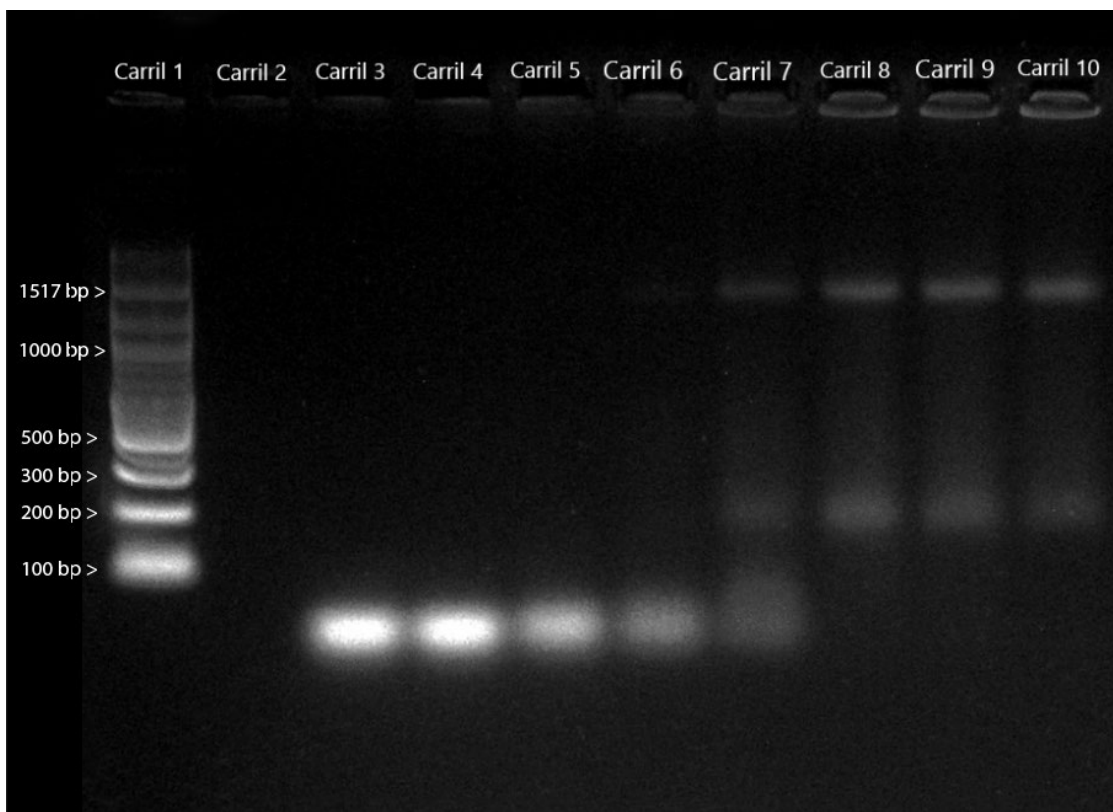


Fig.9. Gel de electroforesis de agarosa al 2%. Carril 1 : Ladder de 100 bp; Carril 2: Péptido ss-IL-8a; Carril 3: MicroRNA mir-433-3p; Carril 4: Comp. ss-IL-8a:mir-433-3p 1:1; Carril 5: Comp. ss-IL-8a:mir-433-3p 5:1; Carril 6: Comp. ss-IL-8a:mir-433-3p 10:1; Carril 7: Comp. ss-IL-8a:mir-433-3p 20:1; Carril 8: Comp. ss-IL-8a:mir-433-3p 40:1; Carril 9: Comp. ss-IL-8a:mir-433-3p 60:1 ;Carril 10: Comp. ss-IL-8a:mir-433-3p 80:1

Los resultados obtenidos de la electroforesis muestran como la unión entre el miRNA y el péptido genera un retraso del movimiento de las muestras, dependiendo de la variación en la cantidad de péptido que se agrega para generar la formación del complejo (Figura 9). Observamos en el carril 3 al mir-433-3p solo, que será nuestro punto a comparar con el resto de muestras. Luego, desde el carril 4 hasta el 6 observamos que el movimiento del RNA se ve levemente retrasado, correspondiendo a las muestras del complejo en relación 1:1 hasta 10:1 respectivamente. En el carril 7, correspondiente al

complejo en relación 20:1, se observa una porción de miRNA que queda libre y que se encuentra aproximadamente la altura alcanzada por RNA de los carriles 4-6. Por último, desde el carril 8 hasta el 10 se observa como el miRNA no llega hasta la altura encontrada en las demás muestras. Hay un desplazamiento debido a un retraso en su movimiento. Además, no se observa diferencia significativa aparente en el movimiento entre estos últimos carriles. Sin embargo, desde la proporción 40:1 la unión entre péptido y miRNA es máxima y no mostró variación al agregar una proporción mayor de péptido (Figura 9).

Al comprobarse que el péptido se unía de manera espontánea con el miRNA mediante atracción por cargas, se realizó el análisis y caracterización de estos complejos en todas las proporciones analizadas anteriormente. Para esta caracterización de los complejos se utilizó un análisis mediante DLS y ZP, explicados en la actividad 5 de la sección metodología. Los resultados obtenidos de dicha caracterización son expuestos en la tabla 9.

Tabla 9:	Caracterización de complejos	ss-IL-8α/mir-433-3p
Muestra	DLS (nm) ^a	ZP(mV) ^b
Péptido	5,34 ±0,63	n.d.
Mimic	0,63 ±0,05	-0,77 ±0,24
Complejo 1:1	3,67 ±0,61	-3,26 ±0,11
Complejo 5:1	40,85 ±5,34	-2,89 ±0,36
Complejo 10:1	44,42 ±8,19	-2,83 ±0,46
Complejo 20:1	132,66 ±13,48	-3,97 ±0,84
Complejo 40:1	106,22 ±17,9	+1,87 ±0,11
Complejo 60:1	101,01 ±13,2	+4,55 ±0,53
Complejo 80:1	100,1 ±9,51	+5,19 ±0,28

Notas: ^a Una cantidad de 50 ng del mir-433-3p (8 μM en 12 μL de agua) fueron mezclados con distintas proporciones de péptido en relación a la masa del mir-433-3p. Luego los complejos fueron diluidos en 988 μL de agua para ser medidos por DLS n=3.

^b Los complejos y las diluciones formadas en el paso anterior fueron recuperadas y utilizadas para la medición del potencial Zeta. n=3.

Abreviaciones: n.d.: No determinado; DLS: Dynamic Light Scattering; ZP: Zeta Potential.

Basados en los resultados anteriores (Figura 9 y Tabla 4), es que se decidió utilizar la proporción del complejo ss-IL-8α/mir-433-3p 40:1 presente en el carril 8 (Figura 9), esto debido a que en el gel de electroforesis no se observan diferencias en el desplazamiento del complejo respecto a las proporciones más altas (Carril9: 60:1 y Carril 10: 80:1 de la Figura 9) , pero si se observó que no hay miRNA libre desplazándose como en las proporciones menores (desde el carril 3 hasta el 7 de la Figura 9) indicando

una máxima unión entre péptido y miRNA. Por otra parte, en la caracterización mediante DLS, se observó que desde la proporción 40:1 el complejo no tiene una gran variación de tamaño respecto a las proporciones más altas (60:1-80:1), y además el ZP nos indica que en esta proporción posee una carga positiva (+1.87) (Tabla 4).

Posterior a la caracterización del complejo ss-IL-8 α /mir-433-3p, se evaluó su citotoxicidad exponiendo a las 3 líneas celulares a la proporción de complejo 40:1, que es la que se decidió ocupar debido a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores. Por lo tanto, las 3 líneas celulares se expusieron al complejo ss-IL-8 α /mir-433-3p 40:1 durante distintos periodos de tiempo, desde las 24 hasta las 72 horas, los resultados obtenidos se exponen en la figura 10.

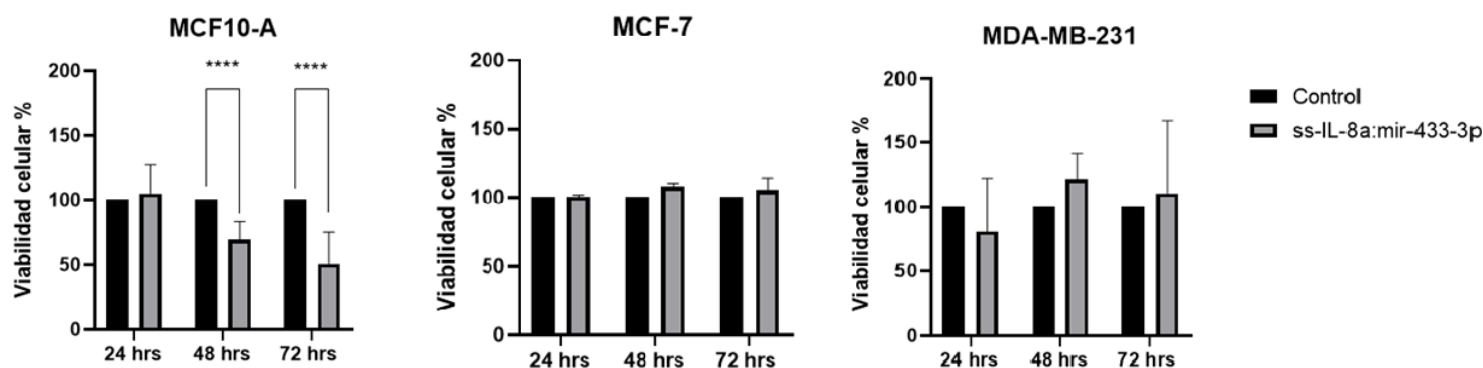
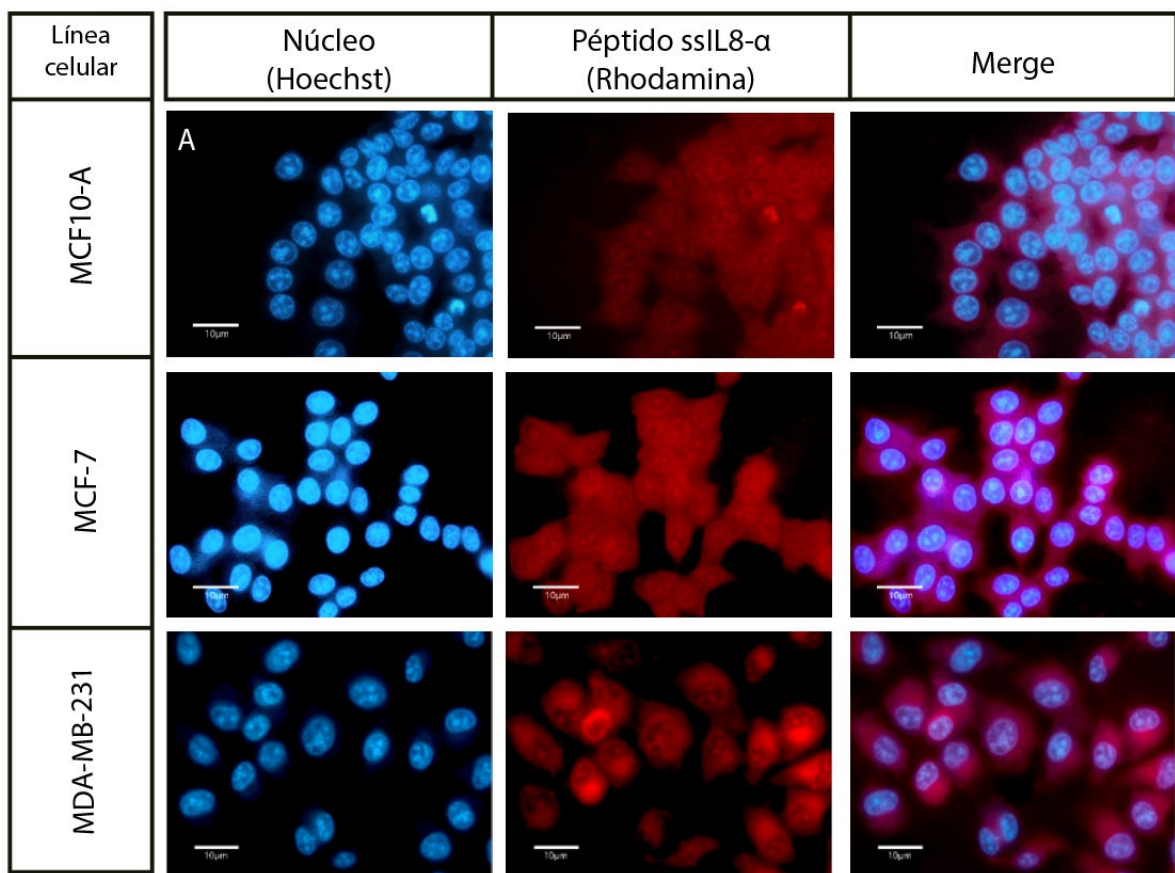


Fig.10. Efectos citotóxicos del complejo ss-IL-8 α /mir-433-3p. (A) Efectos citotóxicos en la línea celular Michigan Cancer Foundation-10A (MCF10-A) (****P). (B) Efectos citotóxicos en la línea celular Michigan Cancer Foundation 7 (MCF-7). (C) Efectos citotóxicos de la línea celular MD Anderson-Metastatic Breast-231 (MDA-MB-231). Representación gráfica del efecto sobre la viabilidad celular de la exposición del complejo ss-IL-8 α /mir-433-3p en proporción 40:1 (16 μ M de péptido y 400 nM de mir-433-3p) durante 24, 48 y 72 horas. La citotoxicidad de los complejos fue medida mediante el ensayo de sulforodamina B. Se realizaron 3 réplicas para cada condición.

Nota: * = $p < 0,5$, ** = $p < 0.05$, *** = $p < 0.005$, **** = $p < 0.0005$

En el ensayo de sulforodamina B para el estudio de la citotoxicidad de los complejos, se observó que solo la línea MCF10-A fue afectada a las 48 y 72 hrs post-tratamiento con el complejo ss-IL-8 α /mir-433-3p, teniendo una diferencia significativa respecto a su control correspondiente. Las líneas celulares tumoral MCF-7 y MDA-MB-231 no se vieron afectadas por el complejo a ninguno de los tiempos de exposición (Figura 10).

El siguiente experimento realizado para dar respuesta al OE 2, fue el de evaluar el ingreso del complejo ss-IL-8 α /mir-433-3p en la proporción escogida como consecuencia de los resultados de los experimentos anteriores. Como se explicó anteriormente, la proporción que se decidió utilizar para evaluar el ingreso fue 40:1, para esto se incubó previamente el mir-433-3p junto con el péptido marcado con rodamina B en agua libre de DNAsas y RNAsas. Una vez formado el complejo se incubó junto con las 3 líneas celulares en estudio como se explica en el apartado de Metodología actividad 6. A continuación, se muestran los resultados obtenidos mediante microscopia de fluorescencia. En la figura 11 observamos microfotografías representativas de las 3 líneas celulares expuestas al complejo marcado, además de la representación gráfica de la cantidad de fluorescencia cuantificada en cada línea celular.



J)

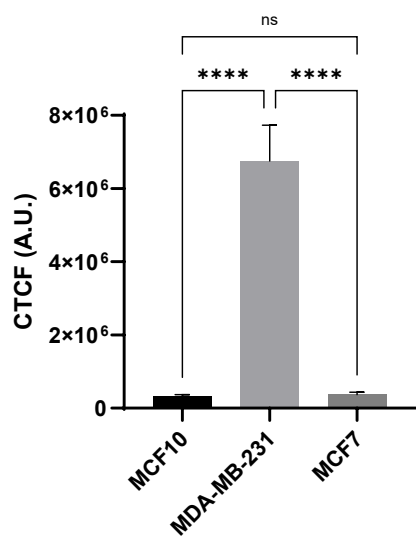


Fig.11. Microfotografía de microscopía de fluorescencia. Se observan microfotografías de la línea celular MCF-10-A, MCF-7 y MDA-MB-231. Las imágenes **A**, **D** y **G** corresponden a las tinciones nucleares con Hoescht; **B**, **E** y **H** corresponde a imágenes del péptido marcado con rodamina y por último las imágenes **C**, **F** e **I** corresponden a la unión de ambas imágenes para cada una de las líneas celulares. El complejo marcado se incubó en proporción 40:1, 16µM de péptido marcado con rodamina y 400 nM de mir-433-3p, respectivamente.

J, Cuantificación de la fluorescencia total corregida mediante Image J para 3 fotografías representativas de cada línea celular.

Nota: * = $p < 0,5$, ** = $p < 0.05$, *** = $p < 0.005$, **** = $p < 0.0005$

Con la microscopia de fluorescencia se observó que los complejos ss-IL-8α/mir-433-3p previamente incubados y donde solo el péptido está marcado con rodamina B, son capaces de penetrar en las 3 líneas celulares de mama, las dos líneas tumorales MCF-7, MDA-MB-231, y en la línea no tumoral MCF-10 (Figura 11A a 11I). Además, mediante el análisis de la fluorescencia celular total corregida mediante el programa Image J, la línea MDA-MB-231, presenta una diferencia significativa ($p < 0,0001$), sugiriendo que en esta línea celular hubo un mayor ingreso de complejo respecto de las otras dos líneas estudiadas (Figura 11J).

Para finalizar los experimentos que buscan dar respuesta al OE2, se realizó un ensayo de RT-qPCR dirigido al mir-433-3p mediante sondas TaqMan. El procedimiento fue detallado en las Actividades 8, 9 y 10. Se incubó durante 1 hora cada uno de los tratamientos junto con las 3 líneas celulares de mama. Posterior a eso fue extraído el RNA total de cada uno de los tratamientos, retro-transcrito a cDNA y cuantificado mediante qPCR y calculada la expresión relativa del mir-433-3p mediante el método $\Delta\Delta CT$, usando como normalizador el snRNA U6. Los resultados obtenidos de dicha cuantificación se exponen de manera gráfica en la figura 12.

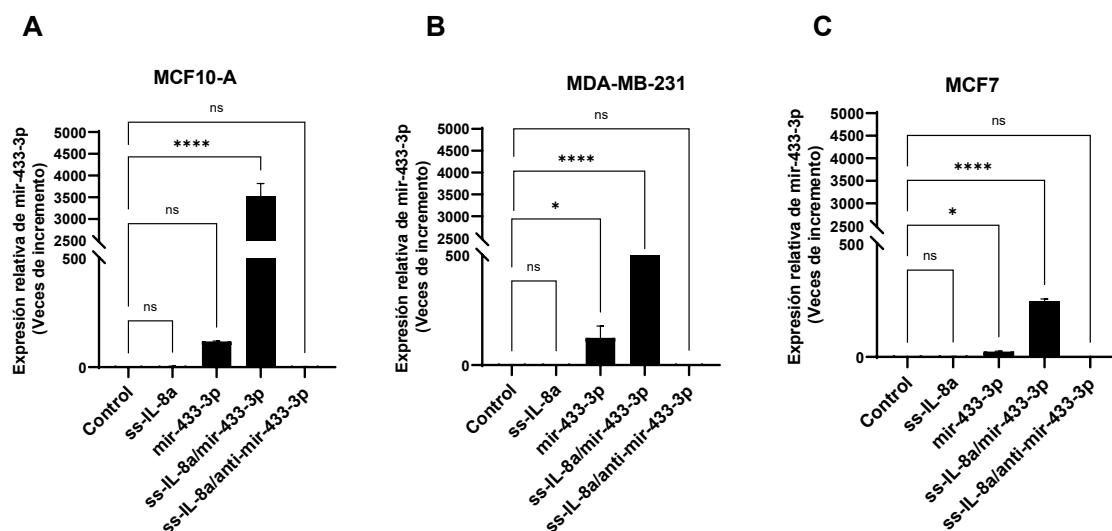


Fig.12. qPCR de la expresión relativa del mir-433-3p. (A) Expresión relativa del mir-433-3p en la línea celular Michigan Cancer Foundation-10A (MCF10-A) (****P). (B) Expresión relativa del mir-433-3p en la línea celular MD Anderson-Metastatic Breast-231 (MDA-MB-231) (*P, ****P). (C) Expresión relativa del mir-433-3p en la línea celular Michigan Cancer Foundation 7 (MCF-7) (*p, ****P). Expresión del mir-433-3p de las 3 líneas celulares de mama expuestas a distintos tratamientos durante 1 hora, la expresión relativa del mir-433-3p fue cuantificada mediante el método $\Delta\Delta CT$, y normalizado con la expresión del snRNA U6. Se realizaron 3 réplicas técnicas por duplicado de cada muestra.

Nota: * = $p < 0,5$, ** = $p < 0.05$, *** = $p < 0.005$, **** = $p < 0.0005$

En los resultados obtenidos del ensayo qPCR para la línea celular no tumoral MCF-10A, se observó que el tratamiento del complejo ss-IL-8a/mir-433-3p elevó la expresión relativa del mir-433-3p (3528.4 veces de incremento) generando una diferencia significativa ($p < 0.0001$) respecto del control (Figura 12A). En la línea celular tumoral MDA-MB-231 el tratamiento solo con el mimic del mir-433-3p generó una elevación de la expresión relativa del mir-433-3p (125 veces de incremento) con diferencias significativas respecto del control ($p < 0.05$). Sin embargo, el mayor aumento de la

expresión relativa del mir-433-3p se observó en el tratamiento con el complejo ss-IL-8 α /mir-433-3p (838.7 veces de incremento) (Figura 11B). Por último, algo similar a lo anterior fue observado en la línea celular tumoral MCF-7, donde se observó un incremento en la expresión relativa del mir-433-3p en el tratamiento solo con el mimic (24.2 veces de incremento) generando una diferencia significativa respecto del control ($p < 0.05$). Sin embargo, la máxima elevación de la expresión relativa fue lograda por el tratamiento con el complejo ss-IL-8 α /mir-433-3p (246.4 veces de incremento) generando una diferencia significativa respecto del control ($p < 0.0001$) (Figura 12C).

OE3: Demostrar el efecto del complejo ss-IL-8 α /mir-433-3p sobre la expresión de la proteína GCL y los niveles de GSH en líneas celulares normales y tumorales de mama.

Con el fin de dar respuesta al OE3 se realizó un ensayo que buscó evaluar las diferencias en la expresión de la enzima GCL, para eso se trataron las células con 5 tratamientos distintos en cada una de las líneas celulares estudiadas como se explica detalladamente en las actividades 12 y 13 de la sección metodología. Posterior a 48 horas de tratamiento, fueron extraídas las proteínas de cada cultivo celular, cuantificadas y evaluadas mediante el ensayo ELISA. Los resultados obtenidos de dicho ensayo son expuestos en la figura 13.

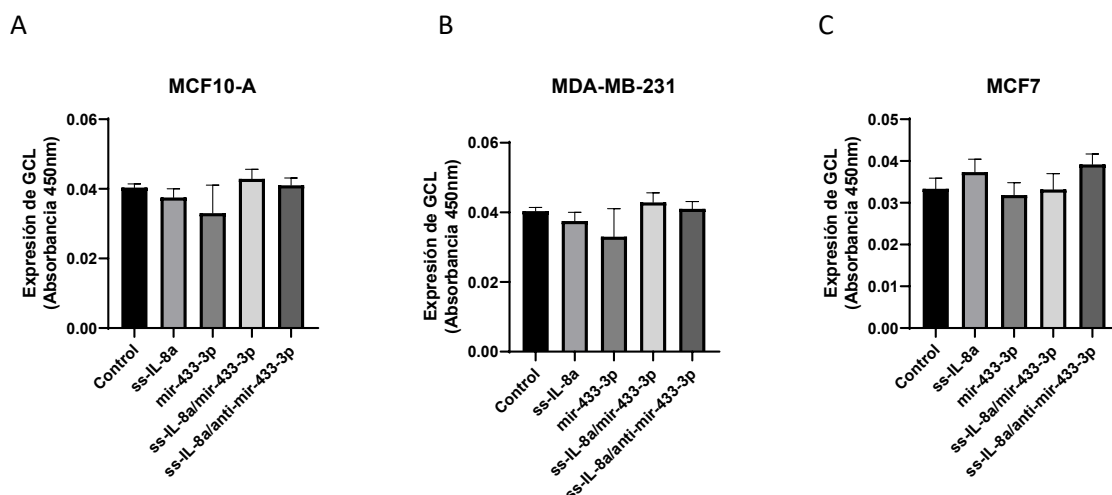


Fig.13. Ensayo ELISA dirigido a la enzima GCL. (A) Expresión de la proteína GCL en la línea celular Michigan Cancer Foundation-10A (MCF10-A). (B) Expresión de la proteína GCL en la línea celular MD Anderson-Metastatic Breast-231 (MDA-MB-231). (C) Expresión de la proteína GCL en la línea celular Michigan Cancer Foundation 7 (MCF-7). Se midió la expresión de la enzima GCL mediante ensayo ELISA posterior a 48 horas de tratamiento en las líneas celulares MCF10-A, MDA-MB-231 y MCF-7. Un total de 10 ng/ μ L fue cargado en cada pocillo de la placa de ELISA, para reconocer la proteína diana GCL se utilizó un anticuerpo 1° anti-GCL (1:500), y un anticuerpo secundario anti-mouse (1:7000) marcado para su cuantificación mediante espectrofotometría (450 nm). Los datos se expresan como $\pm$ SD (n=3) *p < 0.05.

En el ensayo ELISA no se observaron variaciones en las concentraciones de GCL en ninguna de las tres líneas celulares, en ninguno de los 5 tratamientos (Figura 13).

Por último, para dar respuesta al OE3 se midieron los niveles de GSH, GSSG y la razón GSH/GSSG, para evaluar su concentración en las mismas condiciones del ensayo anterior. Para esto se utilizó la metodología propuesta por Rahman et al. (2006)(77) como se describe en la Actividad 14 de la sección de Metodología.

Las 3 líneas celulares estudiadas fueron expuestas durante 12 horas a los 5 tratamientos distintos. Un tratamiento control, solo ss-IL-8a, solo miR-4333p, complejo ss-IL-8a/ mir-433-3p y ss-IL-8a/anti- mir-433-3p), para luego ser expuestas a una solución hipotónica

con el fin de extraer el lisado celular y realizar los ensayos celulares con estos. Los resultados obtenidos de este ensayo son expuestos en la figura 14.

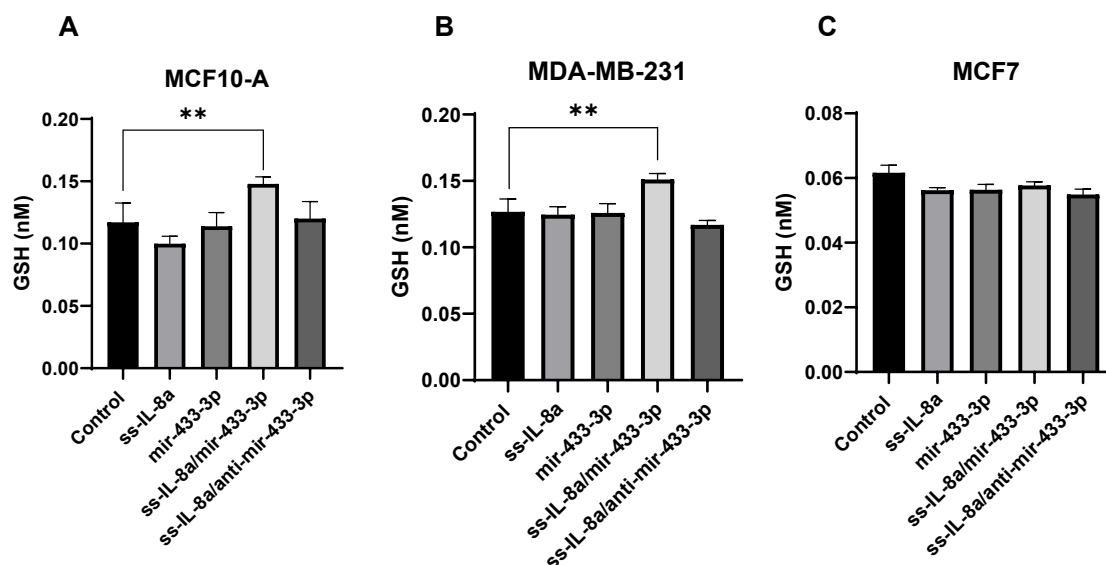


Fig.14. Concentración intracelular de GSH. A) Concentración intracelular de GSH en la línea celular Michigan Cancer Foundation-10A (MCF10-A). (B) Concentración intracelular de GSH en la línea celular MD Anderson-Metastatic Breast-231 (MDA-MB-231). (C) Concentración intracelular de GSH en la línea celular Michigan Cancer Foundation 7 (MCF-7). Variación en la concentración de GSH en las distintas líneas celulares luego de ser expuestas por 12 horas a los distintos tratamientos (Control, ss-IL-8a, mir-433-3p, ss-IL-8a/ mir-433-3p y, ss-IL-8a/anti- mir-433-3p) . N=3 con 3 réplicas técnicas.

La línea celular no tumorales MCF10-A y la línea tumoral MDA-MB-231 tuvieron un aumento significativo respecto a la concentración de GSH del control en los grupos que fueron tratados con el complejo ss-IL-8a/mir-433-3p. Por otra parte, no fue posible calcular la razón GSH/GSS debido a que los niveles de GSS no pudieron ser detectados (bajo el umbral de detección).

DISCUSIÓN.

A continuación, se analizan los resultados obtenidos en la presente investigación, contrastando con investigaciones previas realizadas en el área. Además, se discuten los resultados dispares y por último se ofrecen posibles proyecciones siguiendo la misma línea de investigación.

En este estudio se logró validar la actividad penetrante del péptido ss-IL-8 α en línea no tumoral de mama MCF10-A y en las líneas tumorales de mama MCF-7 y MDA-MB-231. Los resultados obtenidos mostraron que el péptido no es citotóxico en las líneas celulares tumorales y no tumoral de mama en concentraciones que van desde los 0.625-50 μ M. Como se sabe, este péptido que deriva de la IL-8 de salmónidos, no habían sido probados en ninguna concentración en líneas celulares humanas (72). Estudios como los de Paul Y. y colaboradores (1998) junto con Kolusheva S. y colaboradores (2008) utilizaron para sus estudios, un péptido derivado de peces con capacidad penetrante llamado pardaxin. , sin embargo, no midieron citotoxicidad ni capacidad penetrante en células humanas, por lo que el presente estudio es pionero en este tipo de ensayos (78,79).

Posterior a esto, se analizó la capacidad de translocación del péptido ss-IL-8 α al interior de células no tumorales (MCF-10A) y tumorales de mama (MCF-7 y MDA-MB-231). En los estudios realizados por Sáenz-Mártinez y colaboradores (2021) (73), los investigadores observaron la capacidad de penetración por parte del péptido ss-IL-8 α (2.5 μ M) en las líneas celulares monocito/macrófago de bazo y riñón, epitelial de branquia y epitelial de intestino de salmónidos (73), pero no se habían hecho pruebas en líneas celulares humanas. Los resultados obtenidos en este experimento indican que el péptido si posee capacidad de translocar al interior de las células humanas, en las tres líneas celulares de mama estudiadas. Además, mediante un análisis realizado con el software de análisis de imagen Image J, se generó una cuantificación de la fluorescencia presente en cada grupo de células estudiadas posterior al tratamiento con el péptido marcado, este análisis conocido como fluorescencia celular total corregida (CTCF), nos entregó como resultado que hubo un mayor ingreso por parte del péptido en la línea celular MDA-MB-231. Según Guidotti G y colaboradores (2017)(80) , múltiples péptidos (TAT-NBD, AM-111, PTD-FNK, RT001 entre otros) son capaces de entrar al interior de

líneas celulares humanas e incluso en modelos murinos de experimentación, independiente de su naturaleza de origen (Virus, animal o sintéticos), mientras posean ciertas características, como poseer una naturaleza catiónica y una estructura anfipática o hidrofóbica, características que el péptido ss-IL-8 α posee (80).

Estos resultados nos permitieron continuar utilizando el péptido ss-IL-8 α como posible vector de transporte del mir-433-3p.

Con el objetivo de evaluar la capacidad del péptido ss-IL-8 α para unirse a una molécula cargo, en este caso el mir 433-3p se buscó generar la unión entre un CPP y su cargo, para lograr esto hay dos estrategias principales, la primera, es la unión por enlace covalente entre el péptido y su cargo y la segunda estrategia es la unión no covalente entre el péptido y su cargo, debido a la naturaleza catiónica del péptido y a las cargas negativas propias de la estructura del miRNA (dadas por el esqueleto de fosfato), se optó por la segunda estrategia.

Basados en la literatura, se propuso el uso del ensayo de retardo en gel (75), en donde se utiliza una cantidad fija de la molécula cargo, en este caso el miRNA, y se va incubando con cantidades crecientes del péptido. Luego el complejo formado fue cargado en un gel de agarosa en donde se observó el retardo del movimiento del miRNA debido a la unión con el péptido, en el caso en que se hayan unido por la interacción de cargas. En este ensayo obtuvimos el resultado esperado en donde desde el carril 8, 9 y 10 (proporciones 40:1, 60:1 y 80:1 respectivamente) se observó una máxima unión entre péptido y miRNA, lo que nos da cuenta de la formación de una nano partícula o agregado de moléculas. Cabe mencionar que es primera vez que se reporta la unión de un microRNA junto con un péptido derivado de salmónidos, y de origen marino en general, ya que la literatura previa como es el caso de Rádis-Baptista (2021) (58) y Mclorey G y colaboradores (2018) (55), menciona el uso de CPPs derivados de origen animal como toxinas o proteínas constitutivas de algunos insectos y virus, además de que gran número de sus reportes son utilizando RNAs pequeños interferentes (siRNAs), y no miRNAs como lo hace la presente investigación (55,58). Es importante mencionar que en algunos estudios se ha reportado una amplia variación en la relación en la que se forman los complejos, desde 20:1 de CPP y RNA, hasta complejos formados por una relación de 100:1 de CPP y RNA, respectivamente (81,82).

Una vez concluido el experimento, se continuó con la caracterización de los complejos formados mediante los ensayos de DLS y ZP.

En el ensayo de caracterización de los nanocomplejos mediante el ensayo DLS se obtuvo que los complejos formados por el péptido ss-IL-8 α / mir-433-3p iban aumentando su tamaño a medida que se agregaba una mayor cantidad de péptido, llegando hasta un límite desde la proporción 20:1, en donde se observa un complejo de mayor tamaño (app. 132 nm de diámetro), y que luego se estabiliza a un nano complejo de 100 nm de diámetro en las siguientes proporciones. Según Boisguérin y colaboradores (2021) (44). Que observaron decenas de distintas nano partículas basadas en péptidos, concluyeron que tamaños entre los 60 -150 nm de diámetro son ideales para la correcta función de los complejos (44).

El siguiente paso fue medir las cargas presentes en la superficie de las nano-partículas formadas mediante el ensayo de ZP, en donde se observó que desde la proporción 40:1 las cargas entregadas por la lectura fueron positivas (+1.87 mV). Estos valores positivos entregados en el ensayo ZP nos indicarían que las cargas negativas propias de los miRNAs se ven contrarrestadas por las cargas positivas de los péptidos, por lo tanto, que el complejo posea cargas positivas facilitaría el ingreso al interior de la célula (83).

Una vez formados y caracterizados los complejos se fijó como objetivo analizar su capacidad citotóxica, por lo que las tres líneas celulares de mama, la línea no tumoral MCF-10A y las dos líneas tumorales MDA-MB-231 y MCF7 fueron expuestas a distintos tiempos (24-72 hrs) al complejo péptido ss-IL-8 α /mir-433-3p en relación 40:1 (16 μ M de péptido : 400 nM de miRNA). Nuestra hipótesis se enfocó en que el mir-433-3p podría modular GCL disminuyendo las concentraciones de GSH intracelular viéndose así las célula tumorales afectadas por la sobreproducción de ROS, generando estrés oxidativo y causando la muerte de estas (84). Sin embargo, la línea más afectada por la exposición al complejo ss-IL-8 α /mir-433-3p fue nuestra línea control MCF10-A. ($p < 0,0005$ a las 48 y 72 hrs). Una forma de mejorar la selectividad del complejo es la adición de folatos al esqueleto del péptido, se ha demostrado que la adición de folato permite un mayor ingreso del complejo en células con fenotipo cancerígeno (85).

Lo siguiente fue analizar la capacidad del complejo ss-IL-8 α / mir-433-3p de translocar al interior de la célula, para esto se realizó microscopia de fluorescencia donde se utilizó el complejo marcado en proporción 40:1 (16 μ M de péptido: 400 nM de miRNA). Los resultados que observamos nos indica la translocación por parte del complejo marcado en todas las líneas celulares estudiadas, sugiriendo que el péptido no pierde su capacidad de ingresar al interior de la célula mientras está unido al mir-433-3p, además en un análisis mediante el programa de análisis de imagen ImageJ, se realizó la cuantificación (CTCF), entregándonos que la mayor fluorescencia fue captada en la línea célula MDA-MB-231, estos valores se condicen con los obtenidos en el ensayo de fluorescencia en donde se utilizó solo el péptido ss-IL-8 α . Chugh A y colaboradores (2010) mencionaron que los CPP a pesar de ser secuencias cortas de aminoácidos son capaces de asociarse con moléculas que superan en 100 veces su peso molecular, y ser capaces de funcionar como vector de transporte para estas translocándolas al interior de la célula. También es mencionada la facilidad con la que los CPP pueden transportar ácidos nucleicos (AN), debido a las interacciones entre las cargas positivas del CPP y las negativas de los ANs, similar a lo que ocurre en la presente investigación (86).

El siguiente ensayo que se realizó para dar respuesta al OE 2, fue la técnica de qPCR dirigida hacia el mir-433-3p, con el fin de evidenciar si el péptido es capaz de transportar al interior de la célula al mir-433-3p, aumentando como consecuencia sus niveles intracelulares. Los resultados obtenidos en ese ensayo nos mostraron que en el tratamiento con el complejo ss-IL-8 α / mir-433-3p en cada línea celular estudiada hubo una diferencia significativa ($p < 0.0001$) en el incremento de la expresión relativa del mir-433-3p con respecto del control negativo, sugiriendo que el mimic del mir-433-3p efectivamente ingreso por medio de la utilización del péptido ss-IL-8 α . Además, se encontró que el mir-433-3p desnudo también entro en las dos líneas celulares tumorales, con una diferencia significativa respecto del control ($p < 0,5$). Si bien, se desconoce la forma en que este ingresó a la célula, Buonfiglioli A y colaboradores (2019) sugieren que los miRNAs desnudos podrían entrar a la célula, mediante la interacción con receptores (87), así como también asociándose a lipoproteínas de baja densidad (LDL) como sugiere Desgagné V y colaboradores (2016) (88), e incluso se desconoce el mecanismo

de entrada de algunos. Sin embargo, cabe destacar que no todos los miRNAs pueden entrar mediante estos mecanismos mencionados debido a su naturaleza aniónica, demostrándose que el uso de péptidos penetrantes mejora sustancialmente el ingreso de miRNAs al interior de la célula (83,89). Esto además se valida con el presente estudio ya que el complejo multiplica al menos por 5 la concentración intracelular del mir-433-3p.

Con el fin de medir las variaciones en la concentración de la proteína GCL, posterior a realizar los tratamientos (Control, solo péptido (16 μ M), solo mir-433-3p (400 nM), complejo ss-IL-8 α /mir-433-3p (40:1) y el complejo ss-IL-8 α /anti-mir-433-3p (40:1)), se extrajo proteína y se analizó mediante el ensayo ELISA.

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre cada tratamiento lo que indica que el mir-433-3p no realizó su función sobre el mRNA de GCL. Por esta razón, es importante recalcar las diferencias que tuvimos en nuestro trabajo con otras investigaciones en las que se ha usado una metodología similar. En el trabajo de Espinosa-Diez et al. (2015), se reportó la modulación a la baja de la enzima GCL mediante la transfección del mir-433-3p, a diferencia de la investigación presente en la que no se encontraron diferencias posterior a la transfección del mir-433-3p, cabe destacar que ellos utilizaron un modelo celular distinto (HUVEC) las cuales son células derivadas de vena de cordón umbilical, que a pesar de derivar de tejido epitelial como las células utilizadas en este estudio, las células HUVEC derivan de epitelio plano en donde el transporte de macromoléculas es mayormente facilitado por su morfología, por otra parte ellos realizaron su transfección mediante lipofectamina elemento que genera el ingreso mediante vesículas lipídicas que liberan su contenido directamente al citoplasma (43).

Otro punto a tener en cuenta, es que desconocemos el mecanismo de internalización del complejo ss-IL-8 α /mir-433-3p, que puede ser a través de mecanismos de endocitosis o mediante translocación directa, o pudiendo participar ambos procesos. Lo anterior dicho puede variar dependiendo de varios factores, como la naturaleza del péptido, la concentración en que se encuentra, el tipo de cargo al que se une y el tipo celular con el que interactúa (67,83,90). Estos puntos son importantes ya que en otros trabajos donde ocupan CPPs junto con miRNAs, suelen acompañar la transfección con un reactivo

que bloquea la endocitosis, mejorando sustancialmente la efectividad del miRNA al interior celular. Algunos ejemplos de esto son el trabajo de Lockhart et al. (2021), en donde utilizan el fármaco cloroquina junto con el complejo péptido:miRNA al momento de transfectar, la cloroquina es conocida por poseer actividad endosomolítica, de esta forma, evitaría que el complejo péptido:miRNA quede atrapado en el interior del endosoma, en el caso en que la entrada de este sea por la vía endocítica (75). Otro ejemplo de la utilización de mecanismos para aumentar la eficiencia de transfección en pruebas de uso de complejo péptido:miRNA, es la unión de un PMAP como el péptido HA2, un péptido con capacidad disruptora del endosoma (91), o también la unión de residuos de histidina a un péptido base, si bien el mecanismo no es claro, se teoriza que el anillo de imidazol presente en la histidina, al ser una base débil funcione a modo de "esponja de protones", generando la disrupción y liberación del contenido endosomal (92). Otro importante punto a discutir en este resultado es que basados en la metodología de Espinosa-Diez y colaboradores . (2015), realizamos nuestra medición en la variación de la proteína a las 48 hrs. post-tratamiento. El efecto del mir-433-3p pudo resultar afectado debido al tiempo en que se realizaron las mediciones post-transfección, esto sustentado en que los miRNAs muchas veces tienen un tiempo de vida media menor a las 24 h , que en algunos casos resulta menor a 4 horas, en investigaciones posteriores se sugiere no ocupar tiempos tan prolongados para la pesquisa de resultados más fieles (93).

La última actividad para dar respuesta al tercer objetivo, buscaba medir cambios en las concentraciones intracelulares de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSS) post-tratamiento con el complejo ss-IL-8 α /mir-433-3p.

En los resultados se aprecian cambios solo en dos de las tres líneas celulares estudiadas (MCF-10A y MDA-MB-231) siendo el tratamiento con el complejo ss-IL-8 α /mir-433-3p el que presenta una diferencia significativa con respecto al control en cada línea. Los resultados no son los esperados, puesto que se hipotetizaba que la disminución en la expresión de la enzima GCL produciría como consecuencia una disminución en la síntesis de GSH, obteniendo un resultado contrario al esperado, que se repitió en tanto en la línea MCF-10A como en la línea MDA-MB-231. Este aumento inesperado en las

concentraciones de GSH en nuestros experimentos puede deberse a múltiples factores, a continuación, se discutirán algunas posibles explicaciones de esta disparidad.

En primer lugar, se debe contrastar con el artículo de investigación desde donde sustentamos el uso del miRNA mir-433-3p. La primera diferencia es la línea celular utilizada por Espinosa-Diez y colaboradores (2015) en su investigación, siendo esta la línea celular HUVEC mencionada anteriormente. Sabiendo que estamos ocupando un modelo celular distinto encontraremos diferencias tanto en el nivel de expresión de sus genes, como en los distintos miRNAs que actúan regulando esta expresión. Por lo tanto, desde esta primera mirada podemos encontrar diferencias en los resultados (94,95). Por otra parte un solo miRNAs posee múltiples objetivos, ya que muchas veces su secuencia semilla se une a MREs en distintos transcritos, así como un transcrito es regulado por distintos miRNAs (96). También es importante mencionar que como dice Bracken CD. (2023), los miRNA actúan bajo un sistema llamado "Crowd control" o control de multitudes en español, que significa que la regulación de un gen no depende de solo un miRNA sino que este responde a la regulación por muchos miRNAs distinto a la vez, por lo que se sobreestima la habilidad de un solo miRNA al momento de regular la expresión de un gen en específico (97). Otro punto importante por mencionar es la regulación propia de miRNAs que posee cada tejido en específico, debido a la red de RNAs competitivos endógenos (ceRNA). Esta red nos describe que existen "esponjas de RNA" que son transcritos de RNAs no codificantes largos (lncRNA) que poseen la misma secuencia que el gen diana en donde el miRNA hará su efecto regulador, de esta manera los miRNAs son "capturados" por los lncRNA, y el transcrito queda libre de la acción reguladora del miRNA pudiendo expresarse con normalidad (98). Por último tenemos un claro ejemplo de un miRNA con un rol antagónico dependiendo del tejido en el que actúe, este es el mir-125b que se ha encontrado sobre-expresado en múltiples cánceres como cáncer de colon o tumores hematopoyéticos, induciendo crecimiento tumoral y proliferación celular, mientras que en otros cánceres como el carcinoma hepatocelular o tumores mamarios se encuentra regulado a la baja, induciendo la pérdida de la apoptosis celular, promoviendo la migración e invasión celular, así como el proceso de angiogénesis (99). Todos estos puntos son importantes a la hora de analizar los resultados obtenidos de esta investigación, sobre todo en las últimas actividades que

buscaban dar respuesta al objetivo 3, que es con lo que nos encontramos más resultados dispares respecto de lo esperado.

Como futuras proyecciones se sugiere contar con el miRNA marcado con alguna molécula señalizadora para demostrar la co-localización junto con el péptido, además de agregar la captura de microfotografías con un microscopio confocal, para así robustecer los resultados de fluorescencia. Otra proyección es la de estudiar la vía de ingreso del péptido ss-IL-8 α , mediante un marcador de endosoma, de esta manera si la vía de ingreso se esclarece y resulta ser mediante la vía endocítica, se podría utilizar un agente endosomolítico para así mejorar la eficiencia del mir-433-3p.

Otra posible proyección es generar un análisis del efecto del mir-433-3p en distintos tiempos de exposición, así como poder contar con células HUVEC para poder contrastar con los efectos generados por la transfección del mismo miRNA pero con diferentes métodos, como son el uso de lipofectamina y un CPP.

Por último, además de la caracterización del complejo mediante DLS y ZP, la captura de microfotografías a través de un microscopio electrónico, nos hubiera permitido comparar los resultados obtenidos con la caracterización, observar la distribución de tamaños del complejo y robustecer los datos obtenidos con la metodología realizada en esta investigación.

CONCLUSIONES

1. Respecto de la hipótesis planteada se demostró que el péptido ss-IL-8 α y el mir-433-3p forman un complejo capaz de translocar al interior de líneas celulares tumorales y no tumorales de mama, sin embargo, hubo un aumento en la actividad de GSH contrario a lo que se planteó. Adicionalmente no afectó los niveles de proteína GCL.
2. Respecto al objetivo general se demostró que el péptido ss-IL-8 α es capaz de transportar al mir-433-3p en líneas celulares tumorales y no tumorales de mama, sin embargo, no se reportó capacidad de modular la actividad de GCL.
3. Respecto del OE1: El péptido ss-IL-8 α no posee citotoxicidad en concentraciones desde 0.625 hasta 50 μ M y además es capaz de translocar al interior de líneas celulares no tumorales y tumorales de mama.
4. Respecto del OE2: El péptido ss-IL-8 α se une de forma espontánea con el miRNA mir-433-3p, para dar lugar al nano-complejo ss-IL-8 α /mir-433-3p y es capaz de translocarlo al interior de líneas celulares no tumorales y tumorales de mama.
5. Respecto del OE2: El nano-complejo ss-IL-8 α /mir-433-3p no afectó los niveles de GCL, sin embargo, genera aumento de la concentración de GSH en las líneas celulares MCF-10A y MDA-MB-231.

BIBLIOGRAFÍA

1. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1 de enero de 2016;25(1):16-27.
2. 20-Breast-fact-sheet.pdf [Internet]. [citado 2 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>
3. DeSantis CE, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Anderson BO, Jemal A. International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* octubre de 2015;24(10):1495-506.
4. Ministerio de Salud – Gobierno de Chile [Internet]. [citado 19 de marzo de 2023]. Informe de Vigilancia de Cáncer denominado Análisis de Mortalidad Prematura y Años de Vida Potencial Perdidos (AVPP) 2009-2018. Disponible en: <https://www.minsal.cl/informe-de-vigilancia-de-cancer-denominado-analisis-de-mortalidad-prematura-y-anos-de-vida-potencial-perdidos-avpp-que-abarca-la-decada-entre-2009-2018/>
5. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med.* diciembre de 2010;49(11):1603-16.
6. Ďuračková Z. Some Current Insights into Oxidative Stress. *Physiol Res.* 2010;459-69.
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* marzo de 2011;144(5):646-74.
8. Locasale JW, Cantley LC. Metabolic Flux and the Regulation of Mammalian Cell Growth. *Cell Metab.* octubre de 2011;14(4):443-51.
9. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* marzo de 2016;41(3):211-8.
10. Bansal A, Simon MC. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *J Cell Biol.* 2 de julio de 2018;217(7):2291-8.
11. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. *Cell.* 6 de marzo de 2009;136(5):823-37.

12. Pingitore A, Lima GPP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C. Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition*. julio de 2015;31(7-8):916-22.
13. Krejsa CM, Franklin CC, White CC, Ledbetter JA, Schieven GL, Kavanagh TJ. Rapid Activation of Glutamate Cysteine Ligase following Oxidative Stress. *J Biol Chem*. mayo de 2010;285(21):16116-24.
14. Griffith OW, Mulcahy RT. The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1999;73:209-67, xii.
15. Ookhtens M, Kaplowitz N. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Semin Liver Dis*. 1998;18(4):313-29.
16. Lu SC. GLUTATHIONE SYNTHESIS. *Biochim Biophys Acta*. mayo de 2013;1830(5):3143-53.
17. Aoyama K, Nakaki T. Inhibition of GTRAP3-18 May Increase Neuroprotective Glutathione (GSH) Synthesis. *Int J Mol Sci*. 20 de septiembre de 2012;13(9):12017-35.
18. Gamcsik MP, Kasibhatla MS, Teeter SD, Colvin OM. Glutathione levels in human tumors. *Biomarkers*. diciembre de 2012;17(8):671-91.
19. Kennedy L, Sandhu JK, Harper ME, Cuperlovic-Culf M. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules*. 9 de octubre de 2020;10(10):1429.
20. Hiyama N, Ando T, Maemura K, Sakatani T, Amano Y, Watanabe K, et al. Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit is associated with cisplatin resistance in lung adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 21 de febrero de 2018;48(4):303-7.
21. Syu JP, Chi JT, Kung HN. Nrf2 is the key to chemotherapy resistance in MCF7 breast cancer cells under hypoxia. *Oncotarget*. 15 de febrero de 2016;7(12):14659-72.
22. Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, et al. Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:1-10.
23. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*. febrero de 2009;30(1-2):42-59.
24. Yang J, Zhou Y, Xie S, Wang J, Li Z, Chen L, et al. Metformin induces Ferroptosis by

- inhibiting UFMylation of SLC7A11 in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* diciembre de 2021;40(1):206.
25. Andringa KK, Coleman MC, Aykin-Burns N, Hitchler MJ, Walsh SA, Domann FE, et al. Inhibition of glutamate cysteine ligase activity sensitizes human breast cancer cells to the toxicity of 2-deoxy-D-glucose. *Cancer Res.* 1 de febrero de 2006;66(3):1605-10.
 26. Radhakrishnan R, Kowluru RA. Long Noncoding RNA MALAT1 and Regulation of the Antioxidant Defense System in Diabetic Retinopathy. *Diabetes.* enero de 2021;70(1):227-39.
 27. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohmmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* diciembre de 2003;67(4):657-85.
 28. de Souza N. Genomics: The ENCODE project. *Nat Methods.* 1 de noviembre de 2012;9:1046.
 29. Palazzo AF, Lee ES. Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front Genet* [Internet]. 26 de enero de 2015 [citado 4 de abril de 2022];6. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2015.00002/abstract>
 30. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell.* marzo de 2018;173(1):20-51.
 31. Guo L, Lu Z. The Fate of miRNA* Strand through Evolutionary Analysis: Implication for Degradation As Merely Carrier Strand or Potential Regulatory Molecule? Stajich JE, editor. *PLoS ONE.* 30 de junio de 2010;5(6):e11387.
 32. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* febrero de 2008;9(2):102-14.
 33. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. *Science.* 2 de enero de 2004;303(5654):83-6.
 34. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.* febrero de 2006;38(2):228-33.
 35. Wilfred BR, Wang WX, Nelson PT. Energizing miRNA research: A review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab.* julio de 2007;91(3):209-17.

36. Carrington JC, Ambros V. Role of MicroRNAs in Plant and Animal Development. *Science*. 18 de julio de 2003;301(5631):336-8.
37. Luo M, Wu L, Zhang K, Wang H, Zhang T, Gutierrez L, et al. miR-137 regulates ferroptosis by targeting glutamine transporter SLC1A5 in melanoma. *Cell Death Differ*. agosto de 2018;25(8):1457-72.
38. Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer*. 2007;96 Suppl:R40-44.
39. Leisegang MS, Schröder K, Brandes RP. Redox Regulation and Noncoding RNAs. *Antioxid Redox Signal*. 20 de septiembre de 2018;29(9):793-812.
40. Ruiz GP, Camara H, Fazolini NPB, Mori MA. Extracellular miRNAs in redox signaling: Health, disease and potential therapies. *Free Radic Biol Med*. septiembre de 2021;173:170-87.
41. Fierro-Fernández M, Miguel V, Lamas S. Role of redoximiRs in fibrogenesis. *Redox Biol*. abril de 2016;7:58-67.
42. MicroRNA-509-5p functions as an anti-oncogene in breast cancer via targeting SOD2.
43. Espinosa-Diez C, Fierro-Fernández M, Sánchez-Gómez F, Rodríguez-Pascual F, Alique M, Ruiz-Ortega M, et al. Targeting of Gamma-Glutamyl-Cysteine Ligase by miR-433 Reduces Glutathione Biosynthesis and Promotes TGF- β -Dependent Fibrogenesis. *Antioxid Redox Signal*. 10 de noviembre de 2015;23(14):1092-105.
44. Boisguérin P, Konate K, Josse E, Vivès E, Deshayes S. Peptide-Based Nanoparticles for Therapeutic Nucleic Acid Delivery. *Biomedicines*. 20 de mayo de 2021;9(5):583.
45. Juliano RL, Ming X, Carver K, Laing B. Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Oligonucleotides: Implications for Oligonucleotide Pharmacology. *Nucleic Acid Ther*. abril de 2014;24(2):101-13.
46. Erak M, Bellmann-Sickert K, Els-Heindl S, Beck-Sickinger AG. Peptide chemistry toolbox – Transforming natural peptides into peptide therapeutics. *Bioorg Med Chem*. junio de 2018;26(10):2759-65.
47. Wang T, Larcher L, Ma L, Veedu R. Systematic Screening of Commonly Used Commercial Transfection Reagents towards Efficient Transfection of Single-Stranded Oligonucleotides. *Molecules*. 8 de octubre de 2018;23(10):2564.

48. Mäde V, Els-Heindl S, Beck-Sickinger AG. Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides. *Beilstein J Org Chem*. 22 de mayo de 2014;10(1):1197-212.
49. Craik DJ, Fairlie DP, Liras S, Price D. The Future of Peptide-based Drugs. *Chem Biol Drug Des*. 2013;81(1):136-47.
50. Thapa P, Zhang RY, Menon V, Bingham JP. Native Chemical Ligation: A Boon to Peptide Chemistry. *Molecules*. 12 de septiembre de 2014;19(9):14461-83.
51. Zhou M, Jiang W, Xie J, Zhang W, Ji Z, Zou J, et al. Peptide-Mimicking Poly(2-oxazoline)s Displaying Potent Antimicrobial Properties. *ChemMedChem*. 19 de enero de 2021;16(2):309-15.
52. B K, Mn E, S L, R C, Y L, S IN, et al. Antiinflammatory properties of a peptide derived from interleukin-4. *Cytokine* [Internet]. octubre de 2013 [citado 20 de marzo de 2023];64(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23972727/>
53. Argente J, García-Segura LM, Pozo J, Chowen JA. Growth hormone-releasing peptides: clinical and basic aspects. *Horm Res*. 1996;46(4-5):155-9.
54. Guterstam P, Madani F, Hirose H, Takeuchi T, Futaki S, EL Andaloussi S, et al. Elucidating cell-penetrating peptide mechanisms of action for membrane interaction, cellular uptake, and translocation utilizing the hydrophobic counter-anion pyrenebutyrate. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. diciembre de 2009;1788(12):2509-17.
55. McClorey G, Banerjee S. Cell-Penetrating Peptides to Enhance Delivery of Oligonucleotide-Based Therapeutics. *Biomedicines*. 5 de mayo de 2018;6(2):51.
56. Ryser HJP, Shen WC. Conjugation of methotrexate to poly(L-lysine) increases drug transport and overcomes drug resistance in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci*. agosto de 1978;75(8):3867-70.
57. Roberts TC, Langer R, Wood MJA. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. octubre de 2020;19(10):673-94.
58. Rádis-Baptista G. Cell-Penetrating Peptides Derived from Animal Venoms and Toxins. *Toxins*. 15 de febrero de 2021;13(2):147.
59. Ruseska I, Zimmer A. Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides. *Beilstein J Nanotechnol*. 9 de enero de 2020;11:101-23.

60. Nam SH, Lee Y, Kim CH, Kim DE, Yang HJ, Park SB. The complex of miRNA2861 and cell-penetrating, dimeric α -helical peptide accelerates the osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Biomater Res.* 29 de diciembre de 2022;26:90.
61. Kim H, Kitamatsu M, Ohtsuki T. Combined apoptotic effects of peptide and miRNA in a peptide/miRNA nanocomplex. *J Biosci Bioeng.* julio de 2019;128(1):110-6.
62. Yang G, Zhao Y, Gong A, Miao W, Yan L, Nie P, et al. Improved Cellular Delivery of Antisense Oligonucleotide for miRNA-21 Imaging In Vivo Using Cell-Penetrating Peptide-Based Nanoprobes. *Mol Pharm.* 1 de marzo de 2021;18(3):787-95.
63. Liu Q, Lin Z, Liu Y, Du J, Lin H, Wang J. Delivery of miRNA-29b Using R9-LK15, a Novel Cell-Penetrating Peptide, Promotes Osteogenic Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells. *BioMed Res Int.* 2019;2019:3032158.
64. Palanikumar L, Al-Hosani S, Kalmouni M, Saleh HO, Magzoub M. Hexokinase II-Derived Cell-Penetrating Peptide Mediates Delivery of MicroRNA Mimic for Cancer-Selective Cytotoxicity. *Biochemistry.* 23 de junio de 2020;59(24):2259-73.
65. Carreras-Badosa G, Maslovskaja J, Periyasamy K, Urgard E, Padari K, Vaher H, et al. NickFect type of cell-penetrating peptides present enhanced efficiency for microRNA-146a delivery into dendritic cells and during skin inflammation. *Biomaterials.* diciembre de 2020;262:120316.
66. Müller J, Triebus J, Kretzschmar I, Volkmer R, Boisguerin P. The agony of choice: how to find a suitable CPP for cargo delivery: CPP FOR CARGO DELIVERY. *J Pept Sci.* mayo de 2012;18(5):293-301.
67. Jiao CY, Delaroche D, Burlina F, Alves ID, Chassaing G, Sagan S. Translocation and Endocytosis for Cell-penetrating Peptide Internalization. *J Biol Chem.* diciembre de 2009;284(49):33957-65.
68. Erazo-Oliveras A, Muthukrishnan N, Baker R, Wang TY, Pellois JP. Improving the Endosomal Escape of Cell-Penetrating Peptides and Their Cargos: Strategies and Challenges. *Pharmaceuticals.* 1 de noviembre de 2012;5(11):1177-209.
69. Wharton SA, Martin SR, Ruigrok RW, Skehel JJ, Wiley DC. Membrane fusion by peptide analogues of influenza virus haemagglutinin. *J Gen Virol.* agosto de 1988;69 (Pt 8):1847-57.
70. Nakase I, Kogure K, Harashima H, Futaki S. Application of a fusiogenic peptide GALA for intracellular delivery. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2011;683:525-33.

71. Wyman TB, Nicol F, Zelphati O, Scaria PV, Plank C, Szoka FC. Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers. *Biochemistry*. 11 de marzo de 1997;36(10):3008-17.
72. Santana PA, Salinas N, Álvarez CA, Mercado LA, Guzmán F. Alpha-helical domain from IL-8 of salmonids: Mechanism of action and identification of a novel antimicrobial function. *Biochem Biophys Res Commun*. abril de 2018;498(4):803-9.
73. Sáenz-Martínez DE, Santana PA, Aróstica M, Forero JC, Guzmán F, Mercado L. Immunodetection of rainbow trout IL-8 cleaved-peptide: Tissue bioavailability and potential antibacterial activity in a bacterial infection context. *Dev Comp Immunol*. noviembre de 2021;124:104182.
74. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1112-6.
75. Lockhart JH, VanWye J, Banerjee R, Wickline SA, Pan H, Totary-Jain H. Self-assembled miRNA-switch nanoparticles target denuded regions and prevent restenosis. *Mol Ther*. mayo de 2021;29(5):1744-57.
76. Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harb Protoc*. junio de 2010;2010(6):pdb.prot5439.
77. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*. 2006;1(6):3159-65.
78. Kolusheva S, Lecht S, Derazon Y, Jelinek R, Lazarovici P. Pardaxin, a fish toxin peptide interaction with a biomimetic phospholipid/polydiacetylene membrane assay. *Peptides*. septiembre de 2008;29(9):1620-5.
79. Paul Y, Weiss A, Adermann K, Erdmann G, Kassebaum C, Lazarovici P, et al. Translocation of acylated pardaxin into cells. *FEBS Lett*. 27 de noviembre de 1998;440(1-2):131-4.
80. Guidotti G, Brambilla L, Rossi D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol Sci*. abril de 2017;38(4):406-24.
81. non-covalent peptide-based carrier for in vivo delivery of DNA mimics | *Nucleic Acids Research* | Oxford Academic [Internet]. [citado 7 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://academic.oup.com/nar/article/35/7/e49/1088053>

82. Mills KA, Quinn JM, Roach ST, Palisoul M, Nguyen M, Noia H, et al. p5RHH nanoparticle-mediated delivery of AXL siRNA inhibits metastasis of ovarian and uterine cancer cells in mouse xenografts. *Sci Rep*. diciembre de 2019;9(1):4762.
83. Boisguérin P, Deshayes S, Gait MJ, O'Donovan L, Godfrey C, Betts CA, et al. Delivery of therapeutic oligonucleotides with cell penetrating peptides. *Adv Drug Deliv Rev*. junio de 2015;87:52-67.
84. Niu B, Liao K, Zhou Y, Wen T, Quan G, Pan X, et al. Application of glutathione depletion in cancer therapy: Enhanced ROS-based therapy, ferroptosis, and chemotherapy. *Biomaterials*. octubre de 2021;277:121110.
85. Li Y, Wen G, Wang D, Zhang X, Lu Y, Wang J, et al. A complementary strategy for enhancement of nanoparticle intracellular uptake. *Pharm Res*. agosto de 2014;31(8):2054-64.
86. Chugh A, Eudes F, Shim YS. Cell-penetrating peptides: Nanocarrier for macromolecule delivery in living cells. *IUBMB Life*. 2010;62(3):183-93.
87. Buonfiglioli A, Efe IE, Guneykaya D, Ivanov A, Huang Y, Orlowski E, et al. let-7 MicroRNAs Regulate Microglial Function and Suppress Glioma Growth through Toll-Like Receptor 7. *Cell Rep*. 10 de diciembre de 2019;29(11):3460-3471.e7.
88. Desgagné V, Bouchard L, Guérin R. microRNAs in lipoprotein and lipid metabolism: from biological function to clinical application. *Clin Chem Lab Med CCLM*. 1 de mayo de 2017;55(5):667-86.
89. Gray GD, Basu S, Wickstrom E. Transformed and immortalized cellular uptake of oligodeoxynucleoside phosphorothioates, 3'-alkylamino oligodeoxynucleotides, 2'-O-methyl oligoribonucleotides, oligodeoxynucleoside methylphosphonates, and peptide nucleic acids. *Biochem Pharmacol*. 15 de mayo de 1997;53(10):1465-76.
90. Pujals S, Fernández-Carneado J, López-Iglesias C, Kogan MJ, Giralt E. Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: Relevance of CPP self-assembly. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. marzo de 2006;1758(3):264-79.
91. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis - PubMed [Internet]. [citado 1 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14770178/>
92. Midoux P, Pichon C, Yaouanc JJ, Jaffrès PA. Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br J Pharmacol*. 2009;157(2):166-78.

93. Marzi MJ, Ghini F, Cerruti B, de Pretis S, Bonetti P, Giacomelli C, et al. Degradation dynamics of microRNAs revealed by a novel pulse-chase approach. *Genome Res.* abril de 2016;26(4):554-65.
94. Panwar B, Omenn GS, Guan Y. miRmine: a database of human miRNA expression profiles. *Bioinforma Oxf Engl.* 15 de mayo de 2017;33(10):1554-60.
95. Gilbert SF. Differential Gene Expression. En: *Developmental Biology* 6th edition [Internet]. Sinauer Associates; 2000 [citado 1 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10061/>
96. Mohr A, Mott J. Overview of MicroRNA Biology. *Semin Liver Dis.* 29 de enero de 2015;35(01):003-11.
97. Bracken CP. "Crowd-control" by RNA: a pervasive theme in biology. *RNA.* julio de 2023;29(7):885-8.
98. Qi X, Zhang DH, Wu N, Xiao JH, Wang X, Ma W. ceRNA in cancer: possible functions and clinical implications. *J Med Genet.* octubre de 2015;52(10):710-8.
99. Banzhaf-Strathmann J, Edbauer D. Good guy or bad guy: the opposing roles of microRNA 125b in cancer. *Cell Commun Signal CCS.* 28 de abril de 2014;12:30.