



Universidad de La Habana
Facultad de Biología

**Bases moleculares y celulares del efecto antineoplásico del péptido
CIGB-300 en células derivadas de tumores sólidos**

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Biológicas**

Autor: Lic. Yasser Perera Negrin

Tutor: Dr. Silvio E. Perea Rodríguez

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología



2012

Agradecimientos:

Mis primeras palabras de gratitud pertenecen a los profesores Luis Guerra e Inalvis Herrera del IPVC Vladimir Ilich Lenin por su oportuna introducción a la química (1991-1994). Fue en las aulas de dicha especialidad y gracias a su magisterio donde cuajó mi deseo de estudiar bioquímica. A la facultad de Biología y sus profesores debo entonces cinco años de excelente preparación académica. Su dedicación y profesionalidad me propició un cúmulo invaluable de conocimientos aun en los difíciles años de la década del 90 (1995-2000). Tuve la suerte también de contar con dos excelentes tutores en mi formación de postgrado en el CIGB. Agradezco a todos mis excolegas del grupo Meningo y su antiguo leader y tutor por casi seis años de formación profesional en la más estricta disciplina y rigor, así como por sus conocimientos y discusiones científicas (2000-2005). Agradezco particularmente al doctor Silvio E Perea por la oportunidad de trabajar en su Proyecto CIGB-300 durante los últimos 6 años (2006-). Por su excelente introducción a la oncología molecular, sus conocimientos teóricos y prácticos en la temática, así como por las oportunidades de desarrollo profesional que otorga a los jóvenes. Por supuesto, le agradezco también su tutoría de la presente tesis de doctorado.

Mis agradecimientos a todos los revisores del documento de tesis y profesores que participaron del muy útil ejercicio de Doctorado. Sus oportunas críticas y recomendaciones sin dudas han contribuido a alcanzar un documento de tesis más logrado.

A mis padres, su dedicación y sacrificios personales, durante todo el trayecto (1976-2012).

Especialmente a mi pequeña y relativamente joven familia, YLM y DAPL, por mis horas de ausencia dedicado a este empeño (2006-2012).

SÍNTESIS

El CIGB-300 es un péptido sintético seleccionado por su capacidad de inhibir la fosforilación catalizada por la enzima CK2 a través de la interacción con el sitio fosfoceptor. Evidencias preliminares sugieren que el CIGB-300 es capaz de inhibir la proliferación celular y que retarda el crecimiento tumoral en un modelo singénico de cáncer. Sin embargo, la identidad del(los) blanco(s) molecular(es), y los efectos de la inhibición de su fosforilación sobre la célula tumoral no han sido caracterizados. Los resultados del presente trabajo demuestran que la proteína multifuncional B23/NPM constituye el principal blanco molecular del péptido CIGB-300 en células tumorales derivadas de pulmón, cérvix, colon y próstata. La inhibición de la fosforilación de B23/NPM indujo muerte celular por apoptosis y arresto en el ciclo celular en dichas células, proceso que pudiera ser antecedido por la desintegración nucleolar. Por otra parte, el fenotipo de respuesta antiproliferativa de las líneas celulares estudiadas correlacionó con la llegada del péptido al nucléolo, principal localización subcelular de B23/NPM. Finalmente, se evidenció que el CIGB-300 modula la expresión de genes relacionados con la traducción de proteínas, el metabolismo energético y la biogénesis ribosomal, en correspondencia con las funciones adscritas a B23/NPM y el papel de la fosforilación catalizada por CK2 sobre su actividad chaperona. Estos hallazgos develan por primera vez la identidad del principal blanco molecular del péptido CIGB-300 en células tumorales, así como aportan un conjunto de conocimientos sobre las bases moleculares y celulares que contribuyen a explicar el amplio efecto antineoplásico manifestado por el CIGB-300 en modelos preclínicos de cáncer.

Tabla de Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 Origen y antecedentes del péptido CIGB-300.....	6
2.2 Péptidos de penetración celular	7
2.2.1 Definición, características generales y clasificación	7
2.2.2 Tat como péptido penetrador celular	7
2.2.3 Mecanismos de internalización del Tat	8
2.2.4 Destino intracelular de los conjugados Tat-cargos	9
2.2.5 Cinética de internalización de los PPCs	10
2.2.6 Aplicaciones del Tat como PPC en modelos pre-clínicos	10
2.2.7 Toxicidad del Tat.....	12
2.3 Enzima CK2.....	13
2.3.1 Características generales, localización y regulación.....	13
2.3.2 Sustratos y sitio consenso de fosforilación.....	14
2.3.3 Papel de la enzima CK2 en la fisiología celular	14
2.3.4 Potencial oncogénico de la enzima CK2	15
2.3.5 Estrategias terapéuticas dirigidas a la inhibición de la actividad enzimática.....	15
2.4 B23/NPM	17
2.4.1 Características generales y relación estructura-función.....	17
2.4.2 Funciones biológicas e interacciones moleculares	18
2.4.3 Regulación de la expresión del gen <i>npm</i>	19
2.4.4 Regulación post-traduccional	20
2.4.5 CK2, B23/NPM y estructura nucleolar.....	22
2.4.7 B23/NPM y cáncer	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1 Líneas celulares.....	25
3.2 Péptidos sintéticos.....	25
3.3 Determinación de efecto antiproliferativo.....	26
3.4 Análisis de ciclo celular	27
3.5 Determinación del tipo de muerte celular	27
3.5.1 Marcaje con Anexina V.....	27
3.5.2 Fragmentación del ADN.....	28
3.5.3 Potencial de membrana mitocondrial	28
3.6 Efecto antitumoral del péptido CIGB-300 en modelos preclínicos de cáncer.....	28
3.6.1 Modelo singénico TC-1/C57/BL6.....	28
3.6.2 Modelos de xenotransplante en ratones atímicos	29
3.7 Experimentos de interacción en solución (del inglés “ <i>pull-down</i> ”)	30

3.7.1	Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas	30
3.7.2	Inmunodetección de proteínas mediante <i>Western blot</i>	31
3.8	Experimentos de microscopía confocal.....	32
3.9	Experimentos de inhibición de la fosforilación.....	33
3.9.1	Marcaje metabólico	33
3.9.2	Inhibición de la fosforilación <i>in vitro</i>	34
3.10	Estudios de internalización del péptido CIGB-300.....	34
3.10.1	Citometría de Flujo.....	34
3.10.2	Microscopía de fluorescencia	35
3.10.3	Fraccionamiento subcelular.....	35
3.11	Análisis de la expresión génica modulada por el péptido CIGB-300.....	36
3.11.1	Construcción de la biblioteca de hibridación substractiva.....	36
3.11.2	Identificación y anotación funcional de genes.....	37
3.11.3	PCR cuantitativo en tiempo real.....	37
3.12	Microscopía electrónica de transmisión	38
3.13	Análisis estadísticos	39
4.	RESULTADOS	40
4.1	Caracterización del perfil de respuesta antineoplásico del péptido CIGB-300	40
4.1.1	Evaluación del efecto antiproliferativo del péptido CIGB-300 en células tumorales y no tumorigénicas	40
4.1.2	Determinación del efecto antitumoral del péptido CIGB-300 en modelos animales de cáncer derivados de líneas celulares	41
4.1.3	Estudio del efecto del péptido CIGB-300 sobre la supervivencia celular y la progresión en el ciclo celular	43
4.2	Identificación de B23/NPM como blanco molecular del péptido CIGB-300 en líneas celulares tumorales de diferente origen y fenotipo de respuesta al péptido.....	50
4.2.1	Identificación de proteínas que interactúan <i>in vivo</i> con el péptido CIGB-300 en la línea celular NCI-H82.....	50
4.2.2	Evaluación del efecto del péptido CIGB-300 sobre la fosforilación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de B23/NPM ..	52
4.2.3	Verificación de la interacción CIGB-300-B23/NPM <i>in vivo</i> en líneas celulares tumorales diversas ..	54
4.2.4	Evaluación del efecto del péptido CIGB-300 sobre la fosforilación <i>in vivo</i> de B23/NPM en líneas celulares tumorales diversas.	55
4.3	Caracterización del proceso de internalización del péptido CIGB-300 y su relación con el perfil de respuesta antiproliferativa en células tumorales.....	57
4.3.1	Caracterización de la cinética de internalización del péptido CIGB-300 en células tumorales.....	57
4.3.2	Estudio de la localización subcelular del péptido CIGB-300 en células tumorales.....	59
4.3.3	Evaluación del efecto antiproliferativo, la deposición nuclear y la inhibición de la fosforilación <i>in vivo</i> de una variante de péptido CIGB-300 conjugada a ácido decanoico.....	61
4.4	Identificación de los procesos celulares afectados por el péptido CIGB-300 en células tumorales.....	65
4.4.1	Identificación de los genes regulados diferencialmente en presencia del péptido CIGB-300 en la célula tumoral NCI-H125	65
4.4.2	Análisis de expresión y validación de genes regulados diferencialmente	66

4.4.3 Análisis de evidencias celulares y moleculares sobre la afectación de procesos biológicos relacionados con los genes identificados.....	67
5. DISCUSIÓN	72
6. CONCLUSIONES	87
7. RECOMENDACIONES.....	88
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
9. BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR.....	100
10. ANEXOS	104

ABREVIATURAS MÁS FRECUENTES**Por orden alfabético:**

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
AnnexV-F	conjugado Anexina V-fluoresceína
ARN	ácido ribonucleico
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
CDKs	quinasas dependientes de ciclina, del inglés <i>“Cycline Dependent Kinases”</i>
CI₅₀	concentración de droga que inhibe el 50% de la proliferación celular
CI₅₀-P32	concentración de droga que inhibe el 50% de la fosforilación
CIGB-300-F	CIGB-300 conjugado a fluoresceína
CIGB-300-B	CIGB-300 conjugado a biotina
CK2	caseína quinasa 2, del inglés <i>“Casein Kinase 2”</i>
FSC	del inglés <i>“forward scatter”</i>
IP	ioduro de propidio
L-CIGB-300	CIGB-300 conjugado a ácido decanoico
NPM	nucleofosmina, del inglés <i>“Nucleophosmin”</i>
PBS	tampón fosfato, del inglés <i>“Phosphate Buffer Saline”</i>
PPC	péptido de penetración celular
PPM	patrón de peso molecular
qPCR	reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real, del inglés <i>“quantitative Polymerase Chain Reaction”</i>
SFB	suero fetal bovino
SSC	del inglés <i>“side scatter”</i>
SSH	Hibridación substractiva por supresión, del inglés <i>“Subtractive Suppression Hybridization”</i>
TBB	4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole
VIH	virus de inmunodeficiencia humana
VPH	virus del papiloma humano
WB	del inglés <i>“Western Blot”</i>

1. INTRODUCCIÓN

El CIGB-300 es una molécula de naturaleza peptídica que inhibe el evento de fosforilación catalizado por la enzima Caseína Quinasa 2 (CK2) a través de la interacción directa con el sitio fosfoceptor en el sustrato (Perea y cols., 2004). La enzima CK2 participa en la fosforilación de más de 300 proteínas celulares que en su conjunto representan cerca del 20% del fosfoproteoma celular (Meggio y Pinna, 2003; Salvi y cols., 2009). Entre los sustratos de esta enzima se encuentran factores transcripcionales, moléculas que participan en vías de señalización, modificadores del ADN/ARN, reguladores de la síntesis proteica, proteínas estructurales, y enzimas del metabolismo celular. La enorme diversidad funcional de los sustratos fosforilados por la CK2 sustenta el carácter pleiotrópico de la enzima a través de su participación en procesos celulares globales como la síntesis de ARN ribosomal y de transferencia (Ghavidel y cols., 2001), la apoptosis (Guo y cols., 2001), la supervivencia celular (Ahmed y cols., 2002), y la transformación maligna (Tawfic y cols., 2001).

La relación directa entre la sobre-expresión de la enzima CK2 y el cáncer se ha documentado a través de estudios epidemiológicos (Munstermann y cols., 1990; Faust y cols., 1996; Tawfic y cols., 2001), experimentación *in vitro* (Wang y cols., 2001; Romieu-Mourez y cols., 2002) y el uso de modelos animales (Landesman-Bollag y cols., 1998; Landesman-Bollag y cols., 2001), constituyendo dicha enzima un atractivo blanco terapéutico en la actualidad (Duncan y cols., 2008). El evento de fosforilación catalizado por la CK2 ha sido manipulado en oncología experimental mediante el uso de compuestos químicos derivados del 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole (TBB) (Pagano y cols., 2004), oligonucleótidos antisentido (Slaton y cols., 2004) y péptidos bloqueadores de la interacción entre las subunidades catalíticas y regulatorias de la enzima (Laudet y cols., 2007). Sin embargo, la inhibición de dicho evento a través de la interacción directa de una molécula con el sitio fosfoceptor en el sustrato constituye la principal novedad del péptido CIGB-300.

La conservación del sitio fosfoceptor entre los sustratos de la enzima CK2 (Meggio y Pinna, 2003) permitió emplear a la proteína oncogénica E7 del virus del papiloma humano (VPH) como sustrato modelo para el aislamiento de un péptido inhibidor de la fosforilación utilizando la metodología de pesquizado de bibliotecas de péptidos expuestas en fagos

filamentosos (Felici y cols., 1991). El péptido cíclico aislado (P15), se fusionó con el péptido de penetración celular (PPC) Tat (Wadia y Dowdy, 2005) con el objetivo de garantizar su internalización en la célula, generando la molécula quimérica denominada CIGB-300 (Perea y cols., 2004). Hallazgos preliminares demostraron que el péptido CIGB-300 es capaz de inhibir la proliferación de células tumorales *in vitro* y que ejerce efecto antitumoral *in vivo* cuando se administra localmente en un modelo murino singénico de cáncer (Perea y cols., 2004). De manera interesante, el efecto antiproliferativo también se observó en líneas celulares tumorales no transformadas por el VPH, eliminando la posibilidad de que dicho efecto esté relacionado con la inhibición de la fosforilación de la proteína modelo E7. Los resultados anteriores presuponen la necesidad de identificar los sustratos de la enzima CK2 que constituyen blancos moleculares del péptido CIGB-300 en células tumorales diversas, hallazgos que contribuirían a esclarecer las bases moleculares y celulares de los efectos antineoplásicos observados en los diferentes modelos preclínicos de cáncer.

Estudios del proteoma de la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H125 tratada con el péptido CIGB-300 sugieren que la proteína sustrato de la enzima CK2 B23/Nucleofosmina (B23/NPM) pudiera constituir un blanco molecular del péptido en células tumorales (Rodríguez-Ulloa y cols., 2010). El análisis de las fracciones nucleares de dichas células reveló la presencia de degradaciones de la proteína B23/NPM, evento antes asociado con la inhibición de su fosforilación catalizada por la enzima CK2 en células de cáncer de próstata (Tawfic y col., 1995). Por otra parte, hallazgos previos indican que el PPC Tat pudiera interactuar directamente con una región de la proteína B23/NPM comprendida entre los aminoácidos 187-255 (Li, 1997). Por tanto, la inclusión del PPC Tat en la molécula CIGB-300 además de garantizar la internalización del dominio inhibidor de la fosforilación P15, pudiera direccionar en alguna medida la quimera peptídica hacia B23/NPM entre los múltiples sustratos de la enzima CK2 que constituyen blancos moleculares potenciales para el CIGB-300 (Meggio y Pinna, 2003).

La proteína B23/NPM se localiza fundamentalmente en el nucléolo celular y se encuentra sobre-expresada, mutada o fusionada para constituir moléculas oncogénicas en diversos tipos de cáncer (Grisendi y cols., 2006). B23/NPM participa en procesos celulares como la biogénesis ribosomal (Murano y cols., 2008), el mantenimiento de la estabilidad genómica

(Zhang y cols., 2004), la regulación de la transcripción (Hingorani y cols., 2000) y la respuesta a estímulos como radiaciones ultravioletas e hipoxia (Wu y Yung, 2002; Li y cols., 2004). Dicha multifuncionalidad es sustentada por la estructura modular de la proteína, manifestando actividad de chaperona molecular, nucleasa de ARN y proteína transportadora entre el compartimento nuclear y citoplasmático de la célula (Hingorani y cols., 2000; Yun y cols., 2003). Particularmente, la fosforilación catalizada por la enzima CK2 del residuo Ser-125 constituye el principal evento de fosforilación en la proteína B23/NPM (Chan y cols., 1990). Dicho evento de fosforilación pudiera estar asociado con la regulación de la actividad chaperona de B23/NPM, aunque se desconocen los efectos de su inhibición farmacológica para la fisiología de la célula tumoral (Szebeni y cols., 2003).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se formuló la siguiente **hipótesis de trabajo**:

“El péptido CIGB-300 al internalizarse en las células tumorales pudiera interactuar preferencialmente con la proteína B23/NPM en el nucléolo celular, inhibir su fosforilación catalizada por la enzima CK2, y afectar procesos biológicos relevantes para la supervivencia y/o proliferación celular”.

Para corroborar o refutar dicha hipótesis se trazaron los siguientes **objetivos**:

1. Caracterizar el perfil de respuesta antineoplásico del péptido CIGB-300.
2. Demostrar la interacción del péptido CIGB-300 con la proteína B23/NPM y la subsiguiente inhibición de su fosforilación en líneas celulares tumorales de diferente origen y fenotipo de respuesta al péptido.
3. Caracterizar el proceso de internalización del péptido CIGB-300 en células tumorales, su posible localización nucleolar y relación con el perfil de respuesta antiproliferativa.
4. Identificar el(los) principal(es) proceso(s) celular(es) afectados por el péptido CIGB-300 mediante el estudio de los genes regulados diferencialmente en una línea modelo de cáncer de pulmón.

Para cumplimentar dichos **objetivos** se plantearon las siguientes **tareas experimentales**:

Objetivo 1:

- Determinación del efecto antiproliferativo del CIGB-300 en un panel de líneas celulares de cáncer y células no tumorigénicas.
- Evaluación del efecto antitumoral del CIGB-300 en modelos animales de cáncer singénico y de xenotransplante.
- Evaluación del efecto del CIGB-300 sobre la viabilidad celular y la progresión en el ciclo celular.

Objetivo 2:

- Identificación de proteínas que interactúan con el péptido CIGB-300 *in vivo* en una línea celular de cáncer de marcada sensibilidad al péptido.
- Evaluación del efecto inhibitorio del CIGB-300 sobre la fosforilación catalizada por la enzima CK2 del(los) blanco(s) molecular(es) identificado(s).
- Verificación de la interacción CIGB-300-blanco molecular y la subsiguiente inhibición de la fosforilación en un panel de líneas celulares.

Objetivo 3:

- Caracterización de la cinética de internalización del CIGB-300 en líneas celulares con diferente fenotipo de respuesta al péptido mediante citometría de flujo.
- Análisis de la distribución subcelular del CIGB-300 en células tumorales mediante microscopía de fluorescencia.
- Verificación de la relevancia del proceso de internalización del CIGB-300 mediante la evaluación de una molécula derivada con mayor potencia antiproliferativa.

Objetivo 4:

- Identificación y clasificación funcional de los genes regulados diferencialmente por el péptido CIGB-300 en células de cáncer de pulmón mediante hibridación substractiva.
- Análisis de expresión mediante qPCR de genes regulados diferencialmente.
- Verificación a nivel molecular y celular del impacto del péptido CIGB-300 sobre los procesos celulares identificados.

La **novedad científica** del presente trabajo consiste en que por primera vez se identifica el principal blanco molecular del péptido CIGB-300 en células tumorales y se aportan evidencias moleculares y celulares sobre la repercusión de la inhibición de su fosforilación para la fisiología de la célula tumoral. Resulta novedosa además, la identificación de la distribución subcelular del CIGB-300 como variable relevante asociada al fenotipo de respuesta de la célula tumoral a dicho péptido. En su conjunto, estos hallazgos experimentales corroboran la hipótesis que dio origen al péptido CIGB-300 argumentando la relevancia de las vías de señalización mediadas por la enzima CK2 para el mantenimiento del fenotipo maligno dentro del fenómeno conocido como adicción no-oncogénica, así como la factibilidad del bloqueo de dicho evento como estrategia terapéutica novedosa.

La **importancia práctica** del presente trabajo consiste en que aporta los elementos preclínicos que argumentan la evaluación de esta novedosa terapia en el escenario clínico. Estos incluyen la demostración del efecto antiproliferativo y antitumoral en modelos preclínicos robustos de cáncer, conocimiento sobre el mecanismo de acción, de marcadores moleculares asociados a este, y de las posibles bases celulares de la sensibilidad diferencial al péptido CIGB-300. Particularmente, el estudio de los marcadores moleculares propuestos en el presente trabajo permitirá verificar si los hallazgos experimentales obtenidos *in vitro* son extrapolables al escenario clínico, así como su potencial uso como marcadores farmacodinámicos o subrogados de efecto para el diseño y evaluación eficaz de los futuros estudios clínicos.

El **documento de tesis** consta de Introducción, Revisión bibliográfica, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Recomendaciones, Referencias Bibliográficas y Anexos. Los resultados incluidos en el trabajo han sido presentados en cuatro conferencias internacionales y han sido objeto de cinco publicaciones en revistas internacionales (**Bibliografía del autor**). Además parte del trabajo fue merecedor de un Premio Anual de Salud en la categoría de Artículo Científico y de un Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba (**Bibliografía del autor**). La investigación contenida en el documento de tesis fue realizada en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana (CIGB).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Origen y antecedentes del péptido CIGB-300

El péptido CIGB-300 se diseñó con el objetivo de inhibir el evento de fosforilación catalizado por la enzima CK2 mediante interacción directa con el sitio fosfoaceptor en los sustratos (Perea y cols., 2004). La hipótesis inicial que dio origen a esta molécula considera que dada la elevada conservación del dominio fosfoaceptor en los sustratos de la CK2 (Meggio y Pinna, 2003), y la relevancia de sus vías de señalización en cáncer, un péptido seleccionado por su capacidad de interactuar con dicho dominio pudiera inhibir *in vivo* la fosforilación de sustratos críticos para el mantenimiento del fenotipo maligno. Partiendo de dicha hipótesis, el péptido inhibidor P15 fue seleccionado a partir de una biblioteca de péptidos cíclicos expuestos en fagos filamentosos por su capacidad de interactuar con el sitio fosfoaceptor en el sustrato modelo E7 del VPH-16 (Perea y cols., 2004).

Considerando que la mayoría de los sustratos de la enzima CK2 son intracelulares se seleccionó al Tat (48-60, GRKKRRQRRRPPQ), péptido derivado de la proteína homónima del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), como PPC y se fusionó al extremo N-terminal del péptido P15 (CWMSPRHLGTC) para constituir la molécula denominada CIGB-300 (Perea y cols., 2004). En la quimera peptídica los dominios PPC e inhibidor P15, se enlazaron a través de un espaciador de beta-alanina con el objetivo de conferir flexibilidad estructural a la molécula.

Las evidencias preclínicas previas demostraron que el péptido CIGB-300 es capaz de inducir apoptosis en células tumorales *in vitro* y que ejerce un marcado efecto antitumoral *in vivo* cuando es administrado localmente en modelos murinos singénicos de cáncer (Perea y cols., 2004). En el escenario clínico, el CIGB-300 ha sido evaluado recientemente con la culminación de dos estudios clínicos fase I en lesiones pre-malignas de cuello de útero y cáncer cervical. En ambos estudios se obtuvieron evidencias preliminares de seguridad y signos de eficacia (Solares y cols., 2009). Por otra parte, se encuentran en curso otros cinco estudios clínicos fase I-II en tumores de cérvix, pulmón, ovario y lesiones condilomatosas (datos no publicados). Dichos estudios clínicos tienen como objetivo evaluar la seguridad del

producto, caracterizar sus perfiles farmacocinéticos y de biodistribución cuando se administra por diferentes vías, y al mismo tiempo acumular evidencias de eficacia antitumoral.

2.2 Péptidos de penetración celular

2.2.1 Definición, características generales y clasificación

Los PPCs son péptidos relativamente cortos de 5-40 aminoácidos que tienen la capacidad de penetrar al interior celular mediante diferentes mecanismos y que pueden translocar cargos acoplados a ellos de manera covalente o no-covalente (Langel, 2006). Los PPCs han sido ampliamente utilizados para la internalización de un gran número de moléculas bioactivas como proteínas, péptidos, oligonucleótidos y nanopartículas en diferentes tipos celulares *in vitro* e *in vivo* (Dietz, 2004). La transducción de cargos acoplados a los PPCs es un proceso que se caracteriza por una rápida y eficiente transferencia de material biológico al citoplasma o núcleo y una baja citotoxicidad (Langel, 2006).

Teniendo en cuenta la gran diversidad de PPCs que existen en la actualidad, el criterio de clasificación más general se basa en las diferentes propiedades estructurales e incluye tres clases: 1-péptidos con baja anfipaticidad donde los residuos cargados son principalmente argininas, 2- péptidos con elevada anfipaticidad donde los residuos cargados son mayormente lisinas y 3- péptidos donde se alternan residuos cargados e hidrofóbicos a lo largo de la secuencia. Entre los PPCs más empleados se encuentran el Penetratin y el Tat (clase 1), Transportan y péptidos modelos anfipáticos (clase 2), y péptido VE derivado de caderina (clase 3) (Langel, 2006). Particularmente el PPC Tat, que comprende los residuos aminoacídicos 47-58 de la proteína transactivadora de igual nombre del VIH, constituye el péptido penetrador más utilizado (Dietz, 2004).

2.2.2 Tat como péptido penetrador celular

El PPC Tat ha sido conjugado químicamente a cargos de diferente naturaleza como proteínas (Fawell y cols., 1994), péptidos (Selivanova y cols., 1997), nanopartículas (Lewin y cols., 2000), liposomas (Torchilin y cols., 2001), y oligonucleótidos (Astria-Fisher y cols., 2002), con el objetivo de garantizar su translocación al interior celular y ejercer funciones biológicas diversas. En la molécula final, el enlace químico Tat-cargo debe ser lo suficientemente flexible como para permitir la interacción efectiva con el blanco, minimizando posibles

impedimentos estéricos o restricciones conformacionales que comprometan dicha interacción (Brooks y cols., 2005). El Tat como penetrador una vez acoplado, de manera covalente o no covalente, a cargos peptídicos o proteínas que tienen como blanco cascadas intracelulares de señalización, ha demostrado *in vitro* e *in vivo* ser una valiosa herramienta con perspectivas terapéuticas en cáncer (Wadia y Dowdy, 2005).

La capacidad del PPC Tat para internalizar cargos tan diversos de manera eficiente en un gran número de estirpes celulares ha sido atribuida a su particular composición aminoacídica. El péptido que presenta una carga positiva neta 8+ está compuesto por un total de seis argininas y dos lisinas en una secuencia lineal de nueve residuos aminoacídicos (Vives y cols., 1997). El grupo guanidino de la cadena lateral de las argininas es un mediador más potente de la internalización en comparación con residuos aminoacídicos de igual carga neta como la lisina o histidina, sugiriendo por tanto la existencia de requerimientos estructurales adicionales (Mitchell y cols., 2000). Ambos elementos, la carga y la orientación de los residuos, parecen ser importantes para la interacción electrostática inicial con las moléculas polianiónicas de glicosilaminoglicanos, fundamentalmente heparán sulfato, presentes en la superficie externa de la membrana celular (Ziegler y Seelig, 2004).

2.2.3 Mecanismos de internalización del Tat

La translocación del PPC Tat acoplado a cargos biológicos es mayormente un proceso dependiente de energía que involucra la interacción inicial con moléculas de heparán sulfato de la superficie celular (Tyagi y cols., 2001) y la subsiguiente internalización mediante diferentes procesos endocíticos como macropinocitosis (Kaplan y cols., 2005), endocitosis dependiente de clatrina (Richard y cols., 2005), caveolina (Ferrari y cols., 2003) o independiente de ambos (Jones y cols., 2005). No obstante, hallazgos recientes sugieren que la translocación directa del PPC Tat a través de las membranas biológicas no puede ser descartada para el PPC libre o conjugado a cargos pequeños (Ter-Avetisyan y cols., 2009). La prevalencia de uno u otro mecanismo de endocitosis ha sido asociada al tipo celular, las condiciones fisiológicas del cultivo, las características del cargo, o incluso la concentración del conjugado Tat-cargo (Patel y cols., 2007). Otras variables que pudieran influir son la hidrofobicidad, el tipo de enlace químico, y la accesibilidad del PPC en la molécula (Brooks y cols., 2005). El conjugado Tat-cargo puede ser internalizado simultáneamente mediante

más de una vía incluso en una misma estirpe celular, evento que depende del tamaño del cargo y su concentración (Tunnemann y cols., 2006).

Para los diferentes procesos endocíticos el tráfico vesicular y compartimento de destino de los endosomas determina directamente la biodisponibilidad de la molécula para interactuar con el blanco (Patel y cols., 2007). Existen rutas preferentemente degradativas como la endocitosis mediada por clatrina que limitan drásticamente las posibilidades del cargo (Fischer y cols., 2004), mientras que otras como la internalización vía caveolina tributa directamente al aparato de Golgi o al retículo endoplasmático, constituyendo una vía no degradativa favorable para la internalización (Le y Nabi, 2003). Sin embargo, tomando en consideración que todos los procesos endocíticos tienen en común el secuestro de la molécula internalizada en vesículas citosólicas, el escape endosomal y la degradación vesicular y/o citosólica del Tat-cargo constituyen factores limitantes comunes para alcanzar el efecto biológico deseado (Langel, 2006). En su conjunto, las múltiples variables que determinan los procesos de internalización explican las diferencias observadas entre estirpes celulares diversas en cuanto a eficiencia y cinética de internalización, así como el efecto biológico del cargo (Mai y cols., 2002; Violini y cols., 2002).

2.2.4 Destino intracelular de los conjugados Tat-cargos

La rapidez y magnitud del proceso de transducción mediado por los PPCs *per se* no garantiza su éxito como molécula portadora para la internalización de cargos biológicos. Una interacción eficiente con el blanco solo se logra si el cargo es direccionado correctamente y en concentraciones suficientes al compartimento subcelular de destino, elementos que dependen directamente del proceso de internalización del conjugado PPC-cargo y de la secuencia del propio PPC (Langel, 2006). El destino final del PPC-cargo una vez internalizado depende de la fortaleza relativa de las señales de localización nuclear (SLN) o de exportación nuclear (SEN) presentes en el PPC y el cargo, y de la exposición relativa de dichas señales en la molécula final (Chauhan y cols., 2007). Se conoce que el Tat presenta una potente señal de localización nuclear que interactúa directamente con importina β , y media su translocación al núcleo a través del poro nuclear (Hauber y cols., 1989; Truant y Cullen, 1999). La localización nuclear de los complejos Tat-cargo internalizados se corroboró mediante

microscopía de células vivas en varios modelos experimentales (Potocky y cols., 2003; Ziegler y cols., 2005).

2.2.5 Cinética de internalización de los PPCs

La cinética de entrada de los PPCs ha sido ampliamente estudiada en diferentes líneas celulares y condiciones experimentales (Zorko y Langel, 2005). Con el objetivo de monitorear la internalización de los PPCs *in vitro*, estos se han conjugado directamente o a través de grupos funcionales a enzimas, radioisótopos, o fluoróforos (Zorko y Langel, 2005). Sin embargo, solamente los dos últimos métodos de marcaje permiten el monitoreo en tiempo real del proceso de internalización si se considera la velocidad típica de dicho proceso. En términos generales, la cinética de internalización de los PPCs puede ajustarse a una ecuación de primer orden: $[A] = [A]_0 \cdot (1 - e^{-kt})$ (Zorko y Langel, 2005). De acuerdo a dicho ajuste, el tiempo medio de internalización ($t_{0.5} = \ln 2/k$) estimado para cuatro de los PPCs más empleados osciló entre 7–56 min. (Hallbrink y cols., 2001). Particularmente, para el PPC Tat conjugado a cargos pequeños se han descrito $t_{0.5}$ entre 1–30 min en diversas líneas celulares (Polyakov y cols., 2000; Hallbrink y cols., 2001; Suzuki y cols., 2002; Richard y cols., 2003).

2.2.6 Aplicaciones del Tat como PPC en modelos pre-clínicos

El Tat ha sido ampliamente empleado *in vitro* como PPC para la inducción de apoptosis y/o arresto en el ciclo celular en modelos experimentales de cáncer. Las estrategias terapéuticas incluyen la estabilización (*e.g.* p53) y reconstitución (*e.g.* p16, p27, von Hippel-Lindau (VHL)) de la funcionalidad de proteínas supresoras de tumores, la internalización de péptidos pro-apoptóticos (*e.g.* Smac), la inhibición de factores anti-apoptóticos (*e.g.* Bcl-X_L) y la modulación de cascadas de transducción de señales (*e.g.* HER-2) (Wadia y Dowdy, 2005). La administración del Tat acoplado a un péptido mimético de p16 en células de queratinocitos humanos resultó en la transducción del 100% de las células con un máximo de acumulación intracelular a los 20 min de incubación (Gius y cols., 1999). La rápida internalización del conjugado en dichas células precedió la inactivación del complejo CDK4/6 (del inglés “*Cycline Dependent Kinases*”) y el subsiguiente arresto en el ciclo celular fase G1. En otro ejemplo de aplicación del Tat como PPC, su fusión a un péptido antagonista del factor transcripcional ESX (del inglés “*epithelium-specific transcription factor*”) relevante para la expresión del receptor HER-2 en cáncer de mama, resultó en la

disminución de los niveles del receptor, la inhibición del crecimiento celular y la inducción de apoptosis en células tumorales (Asada y cols., 2002).

In vivo, los PPCs en general y el Tat en particular han sido ampliamente utilizados como elementos transportadores de cargos peptídicos o proteínas completas. Schwarze y cols. (1999) evidenciaron por primera vez que la administración intraperitoneal del Tat acoplado a la enzima B-galactosidasa resultaba en una transducción rápida y eficiente del cargo en la mayoría de los tejidos murinos evaluados. A partir de dichos estudios, se han descrito numerosas aplicaciones *in vivo* de los PPCs en modelos preclínicos de enfermedades como el cáncer, asma, isquemia cerebral y diabetes (Langel, 2006). Particularmente, el empleo del Tat en modelos preclínicos de cáncer como portador de proteínas supresoras de tumores, proteínas pro-apoptóticas o péptidos moduladores ha resultado una prometedora estrategia terapéutica (Wadia y Dowdy, 2005). Los ejemplos incluyen la restauración *in vivo* de la funcionalidad de una variante mutada de la proteína p53 con la subsiguiente inducción de apoptosis e incremento de la supervivencia en un modelo de carcinomatosis peritoneal (Snyder y cols., 2004). Por otra parte, la fusión de un péptido derivado de la proteína pro-apoptótica Smac al Tat y su administración mediante inyección intratumoral en modelos de glioblastoma y cáncer de pulmón, demostró pre-sensibilización de ambos tumores al tratamiento con el ligando de receptor de muerte TRAIL (del inglés “*Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis Inducing Ligand*”) y la terapia sistémica con cisplatino, respectivamente (Fulda y cols., 2002; Yang y cols., 2003). Otros ejemplos de aplicación exitosa de este PPC como vehículo de moléculas antitumorales *in vivo* lo constituyen la fusión del Tat con la caspasa-3 o la proteína supresora de tumores VHL y su administración intraperitoneal en modelos animales de cáncer pancreático y carcinoma de células renales, respectivamente (Datta y cols., 2001; Harada y cols., 2002).

La biodistribución del PPC Tat y los conjugados Tat-cargos una vez administrados mediante rutas sistémicas ha sido caracterizada en diferentes modelos murinos (Chen y Harrison, 2007). La administración del conjugado Tat- δ V1-1 (péptido inhibidor de la proteína quinasa C) mediante la vía intraperitoneal, resultó en la verificación a los 10 min del efecto biológico esperado en el hígado, pulmón, corazón, cerebro y riñones de los animales tratados (Begley y cols., 2004). Por otra parte, en un estudio de biodistribución realizado con el conjugado Tat-

B-galactosidasa, se registró una actividad enzimática máxima a los 15 min de administración por ambas vías intraperitoneal e intravenosa en el hígado, riñones, bazo, pulmones y cerebro (Cai y cols., 2006). Finalmente, mediante el acoplamiento del Tat a radioinmunoconjugados y su administración intravenosa en modelos murinos de tumores humanos, se han registrado acumulaciones en el tumor entre 1-2% de la dosis inicial por gramo de tejido a los 20 min de la inyección (Cornelissen y cols., 2008).

2.2.7 Toxicidad del Tat

La citotoxicidad de los PPCs ha sido asociada fundamentalmente a su efecto desestabilizador sobre las membranas biológicas y la interacción con componentes celulares (Zorko y Langel, 2005). Estudios de permeabilización de la membrana celular realizados para cuatro PPCs en células de melanoma, evidenciaron que el Tat es el PPC de menor efecto citotóxico en dicho modelo experimental (1-20 μM) (Hallbrink y cols., 2001). Por otra parte, Suzuki y cols. (2002) evaluaron el efecto citotóxico del Tat en células HeLa mediante ensayos de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) e inhibición de la proliferación celular. La incubación de las células con 100 μM del Tat durante 3 ó 24 h, no afectó la viabilidad del cultivo de acuerdo a los resultados de dichos ensayos (Suzuki y cols., 2002). Estudios posteriores describen valores de citotoxicidad que oscilan entre 10-20% a concentraciones cercanas a los 100 μM de Tat en diferentes estirpes celulares tumorales (Jones y cols., 2005). La toxicidad del Tat *in vivo* no ha sido extensivamente caracterizada a pesar del gran número de aplicaciones de este PPC como portador de cargos biológicos en diferentes modelos animales (Chen y Harrison, 2007). En un análisis histopatológico de los tejidos con acumulación significativa del Tat posterior a la administración intraperitoneal de 60 μg /ratón durante 14 días, no se encontraron evidencias de toxicidad en ninguno de los órganos analizados (Begley y cols., 2004). Por otra parte, la administración intraperitoneal del Tat a una dosis de 1600 μg /ratón durante cuatro semanas (1 dosis/semana) no resultó en la alteración de los parámetros hepáticos, renales o hematológicos registrados en un modelo murino de deficiencia de fosforilasa de nucleósido de purina (Toro y Grunebaum, 2006).

2.3 Enzima CK2

2.3.1 Características generales, localización y regulación

La enzima CK2 es una serina/treonina quinasa ampliamente conservada en eucariontes y de distribución ubicua en los tejidos de organismos superiores (Faust y Montenarh, 2000). La holoenzima puede utilizar GTP o ATP como cofactor, y consiste en un heterotetrámero compuesto por la asociación de dos subunidades catalíticas con actividad enzimática constitutiva (α y α') de 38-42 kDa y dos subunidades regulatorias (2β) de 28 kDa (Pinna, 2002). La holoenzima y sus subunidades libres han sido identificadas prácticamente en todos los compartimentos subcelulares (Faust y Montenarh, 2000; Martel y cols., 2002). Considerando el amplio número de sustratos identificados para la CK2 y su diversa distribución subcelular (Meggio y Pinna, 2003), así como la propia localización de la enzima en regiones discretas de la célula, se ha sugerido la existencia de una regulación específica y dinámica para cada una de las subpoblaciones de la CK2 en la célula (Olsten y cols., 2005). No obstante, una diferencia importante entre las células normales y tumorales, es que en las últimas las subunidades catalíticas se encuentran mayormente localizadas en las estructuras nucleares (Wang y cols., 2003).

La solución de la estructura cristalina de la holoenzima y el análisis de la dinámica de sus diferentes subunidades *in vivo* sugieren que la enzima CK2 existe como holoenzima en equilibrio con sus subunidades catalíticas y reguladoras, asociándose de manera transiente para a través de la fosforilación de sus sustratos regular procesos biológicos específicos en los diferentes contextos celulares (Niefind y cols., 2001; Filhol y cols., 2003). Las subunidades regulatorias en el complejo modulan la actividad enzimática a través de la estabilización de la holoenzima, la regulación de la especificidad por el sustrato y la distribución subcelular (Faust y Montenarh, 2000). Otros mecanismos de regulación de la actividad enzimática incluyen la modulación de la expresión génica de las subunidades, las modificaciones postraduccionales (*e.g.* fosforilación y ubiquitinación), la interacción con moléculas biológicas (*e.g.* heparina, poliaminas, y fosfatidil inositol), y las interacciones proteína-proteína (Olsten y cols., 2005).

2.3.2 Sustratos y sitio consenso de fosforilación

La enzima CK2 ha sido asociada a la fosforilación de más de 300 proteínas celulares que en su conjunto representan cerca del 20% del fosfoproteoma celular (Salvi y cols., 2009). Entre los sustratos se encuentran factores transcripcionales, moléculas que participan en vías de señalización, modificadores del ADN/ARN, reguladores de la síntesis proteica, proteínas estructurales del citoesqueleto, y enzimas que participan en el metabolismo celular (Meggio y Pinna, 2003). De manera interesante, la CK2 también participa en la fosforilación de más de 40 proteínas virales derivadas del VIH, VPH, influenza, virus de la estomatitis vesicular (VEV) y del virus del simio 40 (SV40), evidencias que sugieren que evolutivamente la CK2 pudiera haber sido incorporada en el ciclo replicativo viral de dichas entidades en virtud de su activación constitutiva (Meggio y Pinna, 2003). Sin embargo, a pesar de la enorme diversidad estructural y funcional de los sustratos de la CK2, el sitio de fosforilación presenta un elevado grado de conservación cuya secuencia consenso mínima es S-x-x-E/D. En dicha región, la presencia del residuo aminoacídico ácido en la posición n+3 es determinante (Marin y cols., 1986), mientras que más del 97% de los sustratos presentan al menos otro residuo ácido en las posiciones n+2 y n+3 (Meggio y Pinna, 2003).

2.3.3 Papel de la enzima CK2 en la fisiología celular

La enzima CK2 a través de su contribución al fosfoproteoma celular regula directamente procesos fisiológicos globales como la transcripción de ARN, la traducción de proteínas, y la señalización intracelular, procesos relacionados con la proliferación, la diferenciación celular, la apoptosis y la supervivencia celular (Meggio y Pinna, 2003). Experimentos genéticos en levaduras evidenciaron que variantes *knockout* de las subunidades catalíticas α y α' son inviables (Glover y cols., 1998; Barz y cols., 2003), mientras que en mamíferos se evidenció que la CK2 es indispensable para la transición a través de las fases G0/G1, G1/S y G2/M del ciclo celular (Lorenz y cols., 1993; Pepperkok y cols., 1994). Por otra parte, estudios en ratones *knockout* para la subunidad β de la CK2 evidenciaron la relevancia particular de dicha subunidad reguladora en el contexto celular pues en dichos experimentos se registró la muerte prematura de los embriones (Buchou y cols., 2003).

2.3.4 Potencial oncogénico de la enzima CK2

La enzima CK2 se encuentra sobre-expresada de tres a siete veces en diferentes tipos de tumores (Tawfic y cols., 2001) y ha sido asociada a la agresividad del tumor en carcinomas escamosos de cabeza y cuello (Faust y cols., 1996). Hallazgos epidemiológicos en cáncer renal (Stalter y cols., 1994), de mama (Landesman-Bollag y cols., 2001), pulmón (Daya-Makin y cols., 1994) y próstata (Yenice y cols., 1994), también sugieren una relación directa entre la sobre-activación de la enzima CK2 y el cáncer. Por otra parte, la experimentación *in vitro* e *in vivo* en modelos animales transgénicos evidenció que la sobre-expresión de la CK2 *per se*, o en un contexto genético donde proteínas supresoras de tumores se encuentran mutadas, confiere potencial oncogénico y tumorigenicidad (Landesman-Bollag y cols., 1998; Landesman-Bollag y cols., 2001; Romieu-Mourez y cols., 2002).

La enzima CK2 ejerce funciones globales como agente anti-apoptótico y de supervivencia celular a través de la potenciación del fenotipo de resistencia a drogas, la regulación de oncoquinas y la promoción de la angiogénesis (Ruzzene y Pinna, 2010). Una parte importante de dicho potencial oncogénico tiene sus bases moleculares en la regulación directa que ejerce la CK2 sobre proteínas supresoras de tumores (*e.g.* p53 y PTEN, del inglés “*tumor suppressor phosphatase and tensin homologue*”), proteínas proto-oncogénicas (*e.g.* c-Myc, c-Myb, y c-Jun), y factores transcripcionales como el NF- κ B (del inglés “*Nuclear Factor-KappaB*”), B-Catenina y Max (Duncan y Litchfield, 2008). Particularmente, la CK2 impacta a dos niveles la ruta oncogénica de supervivencia celular del fosfatidil-inositol-3 quinasa (PI3'K). Por una parte, activa directamente la onco-quinasa AKT, y por otra a través de la fosforilación inactiva la proteína supresora de tumores PTEN, facilitando la señalización continua a través de dicha ruta oncogénica (Di Maira y cols., 2005; Kim y Mak, 2006). Otros eventos importantes de regulación por la CK2 que transmiten señales de supervivencia celular y resistencia a apoptosis, se ejercen sobre la proteína inhibitoria del NF- κ B (I κ B) y la B-catenina (Romieu-Mourez y cols., 2002; Gordon y Nusse, 2006; Saadeddin y cols., 2009).

2.3.5 Estrategias terapéuticas dirigidas a la inhibición de la actividad enzimática

Considerando el potencial oncogénico de la CK2 se han implementado numerosas estrategias terapéuticas dirigidas a inhibir la actividad quinasa a través de la interacción directa con las subunidades catalíticas o regulatorias de la enzima (Prudent y Cochet, 2009). Dichos

inhibidores farmacológicos pueden ser clasificados en competitivos o no competitivos de la unión a ATP (Prudent y Cochet, 2009). Dentro de los inhibidores que interactúan directamente con el sitio de unión a ATP se incluye el TBB y sus derivados (Pagano y cols., 2004), así como los derivados condensados polifenólicos (Meggio y cols., 2004). La segunda clase de inhibidores incluyen moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas, o péptidos que interactúan con la interfase CK2 α /CK2 β (Prudent y cols., 2008), la subunidad reguladora β (Martel y cols., 2006), o que afectan la interacción entre las subunidades α y β de la CK2 (Laudet y cols., 2007; Laudet y cols., 2008). La racionalidad del empleo de la enzima CK2 como blanco terapéutico en cáncer está sustentada por hallazgos experimentales *in vitro* e *in vivo* donde mediante el uso de oligonucleótidos antisentido se evidenció la inducción de apoptosis en células tumorales (Faust y cols., 2000; Wang y cols., 2001; Slaton y cols., 2004). Sin embargo, solo recientemente se demostró efecto antitumoral para dos inhibidores que compiten por el sitio de unión a ATP en la enzima CK2 (Prudent y cols., 2010; Siddiqui-Jain y cols., 2010).

La evaluación en células derivadas de cáncer de cérvix, glioblastoma y sarcoma, de un compuesto químico optimizado a partir de la droga antitumoral elipticina (Auclair, 1987), demostró inhibición de la proliferación celular a concentraciones inferiores a 10 μ M con un índice terapéutico *in vitro* de 1,6 (Prudent y cols., 2010). Dicha inhibición fue precedida por el arresto en el ciclo celular (fase G2/M) y la inducción de apoptosis en las células tratadas. El compuesto químico redujo de manera significativa el crecimiento tumoral (T/C óptimo= 0,2) cuando se administró por la vía intraperitoneal en un modelo animal de glioblastoma (Prudent y cols., 2010).

Por otra parte, el compuesto químico CX-4945 fue optimizado mediante modelación molecular para inhibir ambas subunidades catalíticas de la enzima CK2 (Siddiqui-Jain y cols., 2010). CX-4945 es un potente inhibidor de la proliferación celular *in vitro* (CI₅₀= 5,5 μ M), sin embargo se requieren altas dosis (25 y 75 mg/kg) y un agresivo régimen de administración (dos dosis x día x 31 días consecutivos) para inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*. El compuesto CX-4945 mostró un mejor perfil de respuesta antiproliferativa hacia células de cáncer de colon y próstata, mientras se observó un patrón mixto en células de cáncer de pulmón. Dicho efecto pudo ser explicado por el arresto en el ciclo celular (fase G1 y G2/M) e

inducción de apoptosis en las células tratadas (Siddiqui-Jain y cols., 2010). Solamente este inhibidor de la enzima CK2 ha sido evaluado satisfactoriamente en humanos donde se registraron parámetros farmacocinéticos y de seguridad favorables en estudios clínicos Fase I (Lim y cols., 2010).

2.4 B23/NPM

2.4.1 Características generales y relación estructura-función

La proteína NPM, también conocida como B23, numatrin o NO38, es una proteína de 37 kDa que pertenece a la superfamilia de chaperonas nucleoplasmina (Dingwall y Laskey, 1990). Aunque existen dos isoformas que difieren en su región C-terminal, B23.1 (294 a.a.) y B23.2 (254 a.a.), solo la primera variante predomina en todos los tejidos (Wang y cols., 1993). Ambas isoformas se localizan mayoritariamente en el nucléolo, aunque B23.2 también está presente en el nucleoplasma (Okuwaki y cols., 2002). En condiciones fisiológicas, B23/NPM existe como un heterooligómero donde las isoformas B23.1 y B23.2 se asocian con estequiometría variable, conformando estructuras pentaméricas que dimerizan para formar un decámero (Namboodiri y cols., 2004).

La secuencia lineal de B23.1 muestra dos regiones marcadamente acídicas hacia el centro de la molécula, una región de oligomerización hacia el extremo N-terminal y una región de unión a ácidos nucleicos hacia el C-terminal (**Figura 1**). Adicionalmente, B23/NPM presenta en su secuencia primaria señales de localización y exportación nuclear críticas para su funcionamiento como proteína transportadora entre el citoplasma y el núcleo (Borer y cols., 1989; Yun y cols., 2003). La estructura modular de B23/NPM constituye la base de su multifuncionalidad presentando actividad endoribonucleasa (Hingorani y cols., 2000) y de chaperona molecular (Szebeni y Olson, 1999), además de la ya mencionada actividad de proteína transportadora o lanzadera.

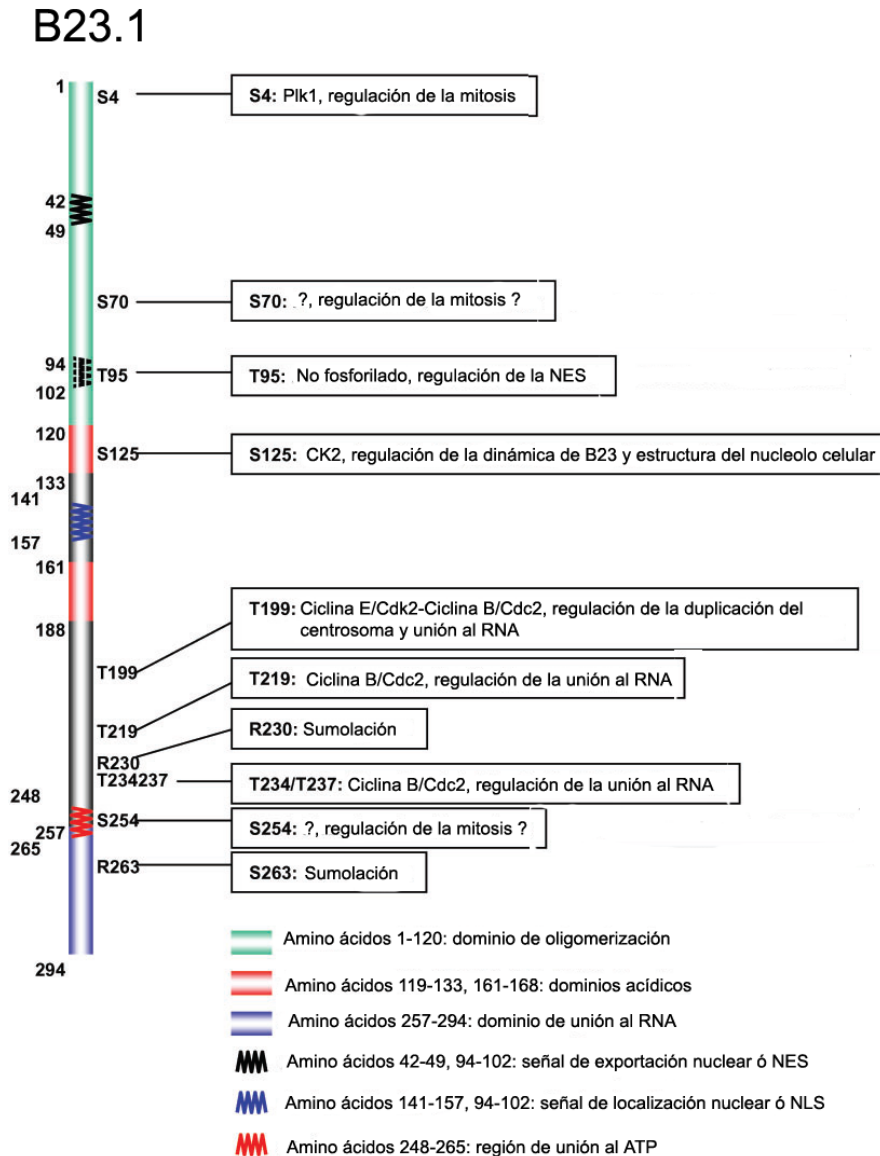


Figura 1. Características estructurales y principales sitios de modificación post-traduccional representados en la secuencia correspondientes a la isoforma B23.1. Se muestran las proteínas quinasas y funciones asociadas a cada evento de fosforilación, así como los dominios funcionales y las señales de localización y exportación nuclear. Los sitios de adición de residuos de ubiquitina en la secuencia primaria aun se desconocen. Figura adaptada a partir del artículo publicado por Okuwaki (2007).

2.4.2 Funciones biológicas e interacciones moleculares

La proteína B23/NPM participa en una gran diversidad de procesos celulares entre los que se encuentran la biogénesis ribosomal (Murano y cols., 2008), la respuesta a estímulos como radiaciones ultravioletas (Wu y cols., 2002) e hipoxia (Li y cols., 2004), el mantenimiento de la estabilidad genómica (Zhang y cols., 2004), y la regulación de la

transcripción del ADN (Hingorani y cols., 2000). Adicionalmente, B23/NPM modula la actividad funcional de los genes supresores de tumores p53 y ARF mediante interacciones proteína-proteína en el núcleo (Colombo y cols., 2002; Itahana y cols., 2003).

A través de sus diferentes dominios funcionales B23/NPM interactúa con una gran diversidad de moléculas de ADN, ARN y proteínas en los diferentes compartimentos subcelulares. En el nucléolo B23/NPM interactúa con las proteínas nucleolina, fibrilarina, proteínas ribonucleolares pequeñas y proteínas estructurales ribosomales (Piñol-Roma, 1999). Por otra parte, en el nucleoplasma interactúa con factores transcripcionales como el IRF-1 (del inglés “*Interferon-Regulatory Factor*”) (Kondo y cols., 1997), NF- κ B (Dhar y cols., 2004) y el YY1 (Inouye y Seto, 1994), mientras que en el citoplasma se encuentra asociada fundamentalmente a proteínas estructurales de ambas subunidades ribosomales (Yu y cols., 2006). Sin embargo, en experimentos de interacción en solución realizados a partir de extractos de células totales se demostró que las principales asociaciones moleculares de B23/NPM ocurren con proteínas relacionadas con la biogénesis ribosomal y el complejo del poro nuclear (Maggi y cols., 2008).

2.4.3 Regulación de la expresión del gen *npm*

Estudios previos permitieron la identificación de tres factores transcripcionales que regulan la expresión del gen *npm1* en células de mamíferos. El primero en identificarse fue la proteína YY1 que también es capaz de interactuar directamente con B23/NPM, sugiriendo la existencia de un posible mecanismo de retroalimentación en la regulación de la transcripción del gen (Chan y cols., 1997). La inducción de la transcripción del gen *npm1* también se ha descrito en condiciones de estrés celular por hipoxia (Li y cols., 2004) y en presencia de señales de proliferación celular (Zeller y cols., 2001). En células humanas embrionarias de riñón (HEK293) cultivadas en condiciones de hipoxia se demostró la inducción de la expresión de B23/NPM por el factor transcripcional HIF-1 α (Li y cols., 2004). Por otra parte, Zeller y cols. (2001) demostraron mediante experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina que dentro de la secuencia correspondiente al intrón 1 del gen *npm1* existen elementos respuesta al factor transcripcional pro-oncogénico c-myc.

2.4.4 Regulación post-traducciona

La proteína B23/NPM es regulada a nivel post-traducciona mediante tres tipos de modificaciones de naturaleza covalente que incluyen la fosforilación, la sumolación y la adición de moléculas de ubiquitina (**Figura 1**). La sumolación de B23/NPM se ha asociado directamente con su localización en la región nucleolar y del centrosoma, así como el incremento de la estabilidad en presencia de estímulos apoptóticos (Liu y cols., 2007). Por otra parte, la adición de moléculas de ubiquitina modula la estabilidad intracelular de B23/NPM cuando es mediada por el complejo BRCA1-BARD1 (Sato y cols., 2004) y potencia su degradación vía proteosomal cuando resulta de la interacción B23-ARF (Itahana y cols., 2003). La fosforilación constituye la modificación post-traducciona más abundante en B23/NPM y ocurre de manera regulada durante la progresión del ciclo celular (Okuwaki, 2007). Entre las quinasas que fosforilan B23/NPM se encuentran principalmente las CDKs (Pei y cols., 2000; Okuda y cols., 2000; Tokuyama y cols., 2001; Okuwaki y cols., 2002) y la CK2 (Chan y cols., 1990).

2.4.4.1 Fosforilación catalizada por CDKs

La proteína B23/NPM presenta numerosos sitios consenso de fosforilación para las CDKs distribuidos a lo largo de toda la secuencia primaria de la proteína (Ser-10, Ser-70, Treo-199, Treo-219, Treo-234, Treo-237) (**Figura 1**) (Okuwaki y cols., 2002). Se ha demostrado, *in vitro* e *in vivo* que los cuatro residuos de treonina localizados hacia la región C-terminal de la molécula son fosforilados por la CDK2 (dependiente de ciclina E) y la quinasa CDK (dependiente de ciclina B). La fosforilación de estos cuatro residuos regula la actividad de unión al ARN del dominio C-terminal de la proteína y está asociada con el control de la duplicación del centrosoma y los cambios de localización subcelular de B23/NPM durante la interfase y mitosis (Tokuyama y cols., 2001; Okuwaki y cols., 2002).

2.4.4.2 Fosforilación catalizada por CK2

La fosforilación del residuo aminoacídico Ser-125 en la secuencia de B23/NPM constituye un evento de regulación post-traducciona de particular relevancia. Dicha fosforilación es máxima durante la interfase del ciclo celular a diferencia de los eventos de fosforilación catalizados por las CDKs que ocurren mayoritariamente durante las diferentes etapas de la mitosis (Pei y cols., 2000). El residuo Ser-125 en B23/NPM se encuentra incluido dentro

del sitio consenso de fosforilación de la enzima CK2 y es considerado como el principal sitio de fosforilación en la proteína (Chan y cols., 1990; Pei y cols., 2000). Dicho evento de fosforilación regula de manera no-convencional la actividad chaperona de B23/NPM que no depende de la hidrólisis de ATP como el resto de los miembros de la familia de las nucleoplasminas. El modelo propuesto por Szebeni y cols. (2003) a partir de un conjunto de hallazgos experimentales sugiere que la fosforilación catalizada por CK2 sobre el residuo Ser-125 de B23/NPM conlleva a la liberación del sustrato, evento que generalmente es producido por hidrólisis de ATP (**Figura 2**).

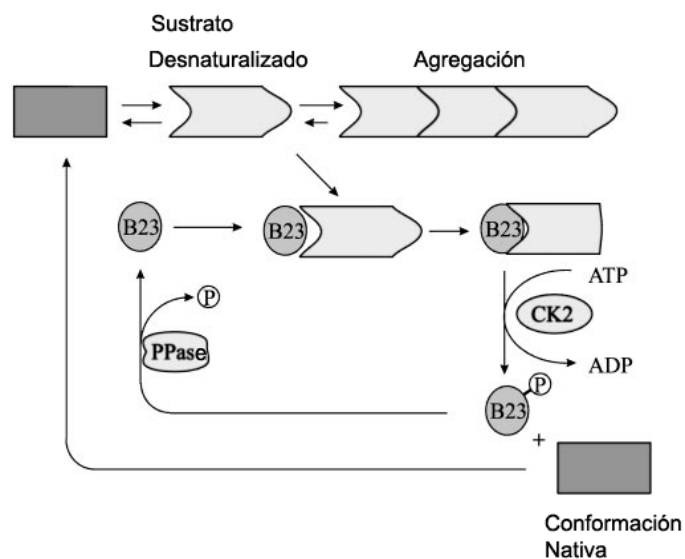


Figura 2. Modelo propuesto por Szebeni y cols. (2003) sobre el papel de la fosforilación catalizada por la CK2 en la actividad chaperona de B23/NPM. PPase, del inglés “*Phosphatase*”, proteína involucrada en la hidrólisis del grupo fosfato. Figura adaptada del artículo publicado por Szebeni y cols. (2003).

La proteína B23/NPM en su estado no fosforilado presenta elevada afinidad por los sustratos desnaturalizados y mediante interacciones rápidas y transitorias contribuye al plegamiento de los mismos. Una vez fosforilada en el residuo Ser-125, B23/NPM pierde afinidad por el sustrato y lo libera en un estado de plegamiento más cercano a su conformación nativa. El ciclo comienza de nuevo cuando B23/NPM es desfosforilada y recupera su capacidad de interactuar con una nueva molécula (Szebeni y cols., 2003).

2.4.5 CK2, B23/NPM y estructura nucleolar

La relevancia de la enzima CK2 para el mantenimiento de la estructura nucleolar fue inicialmente evidenciada por Louvet y cols. (2005) a través del empleo del inhibidor de la enzima CK2 5,6-dichloro-1-b-D-ribofuranosylbenzimidazole. Los autores concluyeron sobre la base de sus hallazgos que el ensamblaje y disociación del nucléolo dependía de eventos de fosforilación catalizados por la enzima CK2 en dicho compartimiento celular. La sustitución subsiguiente del residuo Ser-125 por Ala en B23/NPM (Ser-125-Ala) en experimentos de transfección transiente evidenció que la sola eliminación de este residuo fosfoceptor para la CK2 era suficiente para impedir la correcta reorganización del nucléolo en una célula modelo (Louvet y cols., 2006). Experimentos independientes de transfección transiente y recobrado de la fluorescencia (del inglés “*Fluorescence Recovery After Photobleaching*”) demostraron además que la fosforilación del residuo Ser-125 por la CK2 modula la dinámica intracelular de la proteína B23/NPM (Chen y Huang, 2001; Negi y Olson, 2006). En dichos experimentos la sustitución del residuo fosfoceptor (Ser-125-Ala) en la proteína de fusión GFP (del inglés “*Green Fluorescent Protein*”)-B23/NPM resultó en la disminución significativa de su movilidad en el nucléolo y nucleoplasma de la célula (Chen y Huang, 2001).

El nucléolo es una estructura subnuclear muy compacta donde todos los procesos de biogénesis ribosomal ocurren estrechamente relacionados (Le Panse y cols., 1999). A diferencia de otras estructuras subcelulares no se encuentra físicamente limitado, sino que está conformado por la concurrencia de todos los factores moleculares (proteínas y ácidos nucleicos) que forman parte de la maquinaria de transcripción, procesamiento y ensamblaje de los ribosomas sobre los propios genes que codifican los ARNr. Por tanto, el nucléolo existe cuando es funcional el proceso de biogénesis ribosomal (*i.e.* la acción de construir ribosomas) (Melese y cols., 1995; Olson y cols., 2002). Durante la interfase, los nucléolos son estructuras relativamente estables, que pueden aislarse para estudios funcionales. Sin embargo, con el inicio de la mitosis el nucléolo así como la envoltura nuclear comienzan a desensamblarse, re-conformándose posteriormente al inicio de la interfase celular (Savino y cols., 2001; Angelier y cols., 2005). Muchos de estos eventos resultan de la fosforilación de proteínas nucleares por las CDKs (Okuwaki, 2007).

En los nucléolos el ARNr es sintetizado, procesado y ensamblado por proteínas ribosomales en forma de subunidades pre-ribosomales grande (60S) y pequeña (40S) (Shaw y Jordan, 1995). La integración dinámica de estos procesos diferentes genera una típica organización nucleolar. Existen tres componentes específicos principales, el centro fibrilar (FC), el componente fibrilar denso (DFC) y el componente granular (GC) en el cual FC y DFC están embebidos (Scheer y Hock, 1999). La iniciación de la transcripción del ARNr ocurre en la frontera entre FC y el DFC (Huang, 2002). En este último compartimiento se acumulan los transcritos primarios y son posteriormente procesados mientras migran hacia la región GC que constituye el sitio donde ocurren las últimas etapas de procesamiento y ensamblaje de las subunidades pre-ribosomales (Shaw y Jordan, 1995).

En células de mamíferos se consume aproximadamente el 80% de la energía total en la transcripción, síntesis, transporte, y ensamblaje de las subunidades ribosomales, proceso que concluye con la exportación de aproximadamente 7500 subunidades por minuto (Lewis y Tollervey, 2000). La biogénesis ribosomal en su conjunto constituye un proceso muy dinámico que demanda gran cantidad de recursos celulares y energía, por lo que se encuentra estrictamente regulado a diferentes niveles como la transcripción, el procesamiento del ARNr, el ensamblaje de las subunidades y el tráfico nuclear (Leary y Huang, 2001).

2.4.7 B23/NPM y cáncer

La proteína B23/NPM se encuentra frecuentemente sobre-expresada, mutada o fusionada para constituir moléculas oncogénicas en diversos tipos de cáncer (Grisendi y cols., 2006). Particularmente en los tumores sólidos B23/NPM se encuentra sobre-expresada (Feuerstein y cols., 1988) y ha sido propuesta como marcador en carcinomas de origen gástrico (Tanaka y cols., 1992), colon (Nozawa y cols., 1996), ovario (Shields y cols., 1997), próstata (Subong y cols., 1999), y pulmón (Bergstralh y cols., 2007). Los niveles elevados de B23/NPM han sido correlacionados con la proliferación celular y la inhibición de la diferenciación celular y la apoptosis, características típicas de las transformaciones malignas (Ye, 2005).

Una característica distintiva de la célula tumoral es la hiperactividad y el pleiomorfismo del nucléolo, consecuencia directa de la presión adicional que impone la elevada tasa de proliferación sobre la maquinaria de síntesis ribosomal (Busch y cols., 1963). Considerando el papel clave que tiene B23/NPM en la biogénesis ribosomal y la relevancia de este proceso para el mantenimiento del fenotipo tumoral, se ha sugerido que los niveles elevados de B23/NPM en cáncer pudieran sostener el crecimiento descontrolado de la célula maligna por su contribución a la maquinaria ribosomal (Grisendi y cols., 2006).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares

Las líneas celulares humanas derivadas de cáncer de pulmón (NCI-H460, NCI-H125, NCI-H82, A549), cáncer de cérvix (SiHa, HeLa, HEP-2C, CaSki), cáncer de próstata (PC-3, DU 145, LNCaP) y cáncer de colon (SW948, HT-29, LS 174T) se adquirieron originalmente a partir de la Colección Americana de Cultivos Tipo (del inglés “*American Type Culture Collection*”) (ATCC, EUA). Las líneas celulares no-tumorigénicas de fibroblasto pulmonar humano (MRC-5) y riñón de mono (Vero) se adquirieron a partir de la misma colección, mientras que la línea celular de queratinocitos transformados espontáneamente (HaCaT) se obtuvo a partir de la casa comercial Cell Lines Service (CLS, Eppelheim, Alemania). Las células de fibroblasto de retina humana y la línea murina TC-1 (epitelio pulmonar transformado con el virus del VPH-16) fueron gentilmente donadas por el grupo de Transgénesis del CIGB y por T.C. Wu (Lin y cols., 1996), respectivamente.

Para el cultivo celular y la experimentación *in vitro* los medios de cultivo comerciales RPMI (del inglés “*Roswell Park Memorial Institute*”) y DMEM (del inglés “*Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium*”) (Hyclone, EUA) se suplementaron con suero fetal bovino (SFB) (PAA, Canadá) al 10% volumen/volumen (v/v) y se empleó como antibiótico gentamicina (Sigma, EUA) a una concentración final de 50 µg/mL (medio completo). Las células fueron mantenidas en fase exponencial de crecimiento a 37°C y 5% de CO₂.

3.2 Péptidos sintéticos

El péptido CIGB-300 o P15-Tat (GRKKRRQRRRPPQ-A-CWMSPRHLGTC) como se denominó inicialmente, fue obtenido con una pureza superior al 98% en la unidad de Síntesis Química del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, La Habana) mediante un procedimiento de síntesis en fase sólida y purificación en cromatografía líquida de fase reversa y alta resolución (HPLC, del inglés “*High Performance Liquid Chromatography*”). Mediante el mismo procedimiento, se sintetizaron variantes del péptido donde se sustituyeron dos aminoácidos en la secuencia del dominio inhibidor P15 (CIGB-300mut, GRKKRRQRRRPPQ-A-CAMSPRHAGTC), cinco aminoácidos del PPC Tat

(PPCmut-P15, GRKEGGAERRPPQ-A-CWMSPRHLGTC), o se reemplazó completamente el P15 (F20-2, GRKKRRQRRRPPQ-A-LNDAAEEDEI).

Para la obtención de los conjugados CIGB-300-fluoresceína (CIGB-300-F), CIGB-300-biotina (CIGB-300-B) y CIGB-300-ácido decanoico (L-CIGB-300, L-PPCmut-P15), se acoplaron las moléculas carboxifluoresceína (Fluka, EUA), 7-NHS-biotina (Merck, Alemania), o ácido decanoico (Merck, Alemania) mediante un enlace amida con el residuo N-terminal del CIGB-300. Todos los péptidos fueron obtenidos con una pureza superior al 95% siguiendo las normas y controles de calidad establecidos en el CIGB para la producción de ingredientes farmacéuticos activos. La identidad de cada molécula se verificó mediante análisis por espectrometría de masas (Micromass, Manchester, Reino Unido).

3.3 Determinación de efecto antiproliferativo

Las suspensiones celulares ($5-10 \times 10^4$ células/mL) se sembraron en medio completo RPMI a razón de 100 μ L por pozo en placas de 96 pozos (Costar, EUA) y se incubaron durante 24 h. A continuación, se adicionaron 100 μ L/pozo de diluciones seriadas 1:2 del CIGB-300 (25-400 μ M) o las variantes peptídicas seleccionadas. Paralelamente, se prepararon pozos controles a los que solo se adicionó medio RPMI (máximo de proliferación, 100%). Después de incubar durante 48 h, se procedió a revelar el efecto mediante incubación de las placas con 50 μ L/pozo de ácido tricloroacético 50% (TCA) a 4°C durante 1 h (Merck, Alemania). Se lavó cinco veces con agua desionizada y las células se tiñeron durante 10 min con 100 μ L/pozo de sulforrodamina B 0,4% (m/v) (Sigma, EUA) en ácido acético 0,1% (v/v) (Merck, Alemania). Después de realizar cinco lavados con ácido acético 0,1% (v/v), se adicionaron 200 μ L/pozo de una solución 10 mM Tris Base (Plusone, Suecia) y se registró la absorbancia a 492 nm (BiotraK, Austria).

Para la determinación de los valores de CI_{50} , así como de los parámetros de la curva dosis-respuesta se empleó el programa CalcuSyn (CalcuSyn v2.0, Biosoft, EUA). La representación de los perfiles de respuesta antiproliferativa se realizó mediante la transformación de los datos correspondientes a la CI_{50} de cada línea celular de acuerdo a la ecuación \log relativo $CI_{50} = \log CI_{50}$ (media panel) – $\log CI_{50}$ (línea celular).

3.4 Análisis de ciclo celular

Las células se sembraron en placas de seis pozos (Costar, EUA) a razón de $2,5 \times 10^5$ células/pozo en 2 mL de medio completo y se cultivaron durante 18-20 h. Al día siguiente, se adicionaron concentraciones del péptido CIGB-300 correspondientes a la CI_{50} para cada línea celular y se incubó durante 0.5, 1, 3, 5, 8 ó 24 h. Posteriormente, se colectaron las células mediante tripsinización, se lavaron con tampón fosfato (PBS) y se fijaron mediante incubación durante 1 h a $4^{\circ}C$ en una mezcla de metanol: acetona (4 v. de metanol: 1 v. de acetona). A continuación, se incubaron durante 20 min con $100 \mu g/mL$ de una solución de yoduro de propidio (IP) (Sigma, EUA) que contiene $10 \mu g/mL$ RNAsa libre de DNAsa (Promega, EUA). El análisis de ciclo celular se realizó empleando un citómetro de flujo FACscan (Becton Dickinson, EUA) y el programa CellQuest (Becton Dickinson, EUA). Los agregados y detritos celulares en las muestras se excluyeron del análisis mediante la selección de la población celular de interés en el gráfico de ploteo de puntos FL3-W (del inglés “*FL3-width*”) vs. FL3-A (del inglés “*FL3-area*”) (Muehlbauer y Schuler, 2005). En cada experimento se adquirieron 10 000 eventos.

3.5 Determinación del tipo de muerte celular

3.5.1 Marcaje con Anexina V

Las células se sembraron en placas de 24 pozos (Costar, EUA) a razón de 5×10^4 células/pozo en $500 \mu L$ de medio completo y se cultivaron durante 18-20 h. A continuación, se adicionó la concentración seleccionada de CIGB-300 o los controles y se incubó durante 0.5, 1, ó 6 h. Posteriormente, se lavó mediante centrifugación a 200 g con PBS ($4^{\circ}C$) y se tripsinizó durante 5 min. Finalmente, se inactivó la tripsina, las muestras se colectaron en tubos independientes y se lavaron con 1 mL de PBS ($4^{\circ}C$). La apoptosis fue cuantificada mediante el kit de detección de apoptosis Annexina V-FITC (AnnexV-F) (BD Pharmingen, EUA) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se resuspendieron en solución tampón AnnexV-F a una concentración final de 1×10^6 células/mL. A continuación, se adicionaron $5 \mu L$ del conjugado AnnexV-F y $1 \mu L$ de IP a cada muestra y se incubó durante 10 min a $22^{\circ}C$ en la oscuridad. El análisis se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACscan con el programa CellQuest. Para el procesamiento y presentación de los datos se empleó el programa WinMDI v2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>). Las

células doble negativas fueron clasificadas como vivas (Q3), las células positivas a AnnexV-F como apoptóticas (Q1), las células doble positivas (AnnexV-F y IP) como apoptosis tardía (Q2); y las positivas a IP como células en necrosis (Q4). En cada experimento se adquirieron 10 000 eventos.

3.5.2 Fragmentación del ADN

Se cultivaron durante 20 h 2×10^5 células NCI-H82, NCI-H125 o SiHa en 5 mL de medio de cultivo suplementado con 4 $\mu\text{Ci/mL}$ de timidina tritiada (Amersham International, Reino Unido). Seguidamente, las células se colectaron mediante tripsinización, se contaron y se sembraron en placas de 96 pozos a razón de 5000 células/pozo. Después de 3 h, se adicionaron 100 $\mu\text{L/pozo}$ de diluciones seriadas 1:2 de cada péptido (12-200 μM) y se incubó durante 15-120 min. Finalmente, las células se cosecharon individualmente (Harvester 96 MACH III, TOMTEC, EUA) y se registraron los conteos correspondientes al ADN radiomarcado usando un contador Beta (Wallac TRILUX, Perkin Elmer, EUA). El porcentaje de fragmentación del ADN genómico fue estimado mediante la fórmula: % Fragmentación = $[\text{cpm (no tratado)} - \text{cpm (tratado)}] / \text{cpm (no tratado)} \times 100$.

3.5.3 Potencial de membrana mitocondrial

Los cambios en el potencial de la membrana mitocondrial de células NCI-H82 tratadas con los péptidos CIGB-300 o CIGB-300mut se evidenciaron empleando el kit APO LOGIX JC-1 (Cell Technology, EUA). Se preparó una suspensión celular de 1×10^5 células/mL, se sembró en placas de 24 pozos (Corning, EUA) y se mantuvo durante 3 h en condiciones de cultivo celular. A continuación, se adicionaron los péptidos a 100 μM , se incubó durante 30 min y se procedió a realizar el marcaje con el reactivo JC-1 según las recomendaciones del fabricante. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron empleando un microscopio Axioskop 40 (Carl Zeiss, EUA) equipado con una fuente de luz UV y cámara digital Canon (PC1089, Japón).

3.6 Efecto antitumoral del péptido CIGB-300 en modelos preclínicos de cáncer

3.6.1 Modelo singénico TC-1/C57/BL6

Ratones hembras C57/BL6 de 6-8 semanas de edad (18-20 g) se inyectaron por vía subcutánea (s.c.) con 1×10^5 células tumorales TC-1 en 300 μL de PBS. Después de 10 días y antes del debut tumoral, se aleatorizaron y distribuyeron a razón de 8 animales por grupo

experimental. Seguidamente, los animales recibieron cinco inyecciones consecutivas por la vía intraperitoneal (i.p.) de 2.5, 10, ó 40 mg/kg del péptido CIGB-300 o PBS en el grupo control (frecuencia diaria). Los tumores se midieron con pie de rey tres veces por semana y se estimó el volumen tumoral utilizando la fórmula: $\text{Volumen} = \text{ancho}^2 \text{ (mm)} \times \text{largo}/2 \text{ (mm)}$. Para cada medición se calculó la relación T/C= volumen tumoral medio animales tratados (T)/volumen tumoral medio animales controles (C), definiéndose el menor valor como T/C óptimo. La supervivencia de los animales fue registrada hasta que el volumen tumoral alcanzó los 4000 mm³ momento en que los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Durante toda la experimentación los ratones fueron mantenidos en un ambiente libre de patógenos y los procedimientos se realizaron acorde a las normas de trato con animales del Bioterio del CIGB.

La inducción de apoptosis *in vivo* en una masa tumoral de 50 mm³ se verificó en el modelo anterior después de aplicar cinco inyecciones consecutivas del péptido CIGB-300 (40 mg/kg) o PBS mediante la vía i.p. Concluida la quinta inyección, se sacrificaron dos animales por grupo y se extrajo el tumor, se sumergió en parafina y se cortaron muestras de 5 µm para el análisis de fragmentación del ADN *in situ* mediante la técnica de TUNEL empleando el kit comercial DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, EUA). Las imágenes de fluorescencia se adquirieron con magnificación 20 y 40X empleando el microscopio Axioskop 40.

3.6.2 Modelos de xenotransplante en ratones atímicos

Para el establecimiento de los modelos animales de xenotransplante se usaron ratones atímicos hembras de 6-8 semanas de edad (18-20 g) (Harlan, Germany/CNEA, Buenos Aires). Se inocularon por vía s.c. 4×10^6 células de cáncer de pulmón NCI-H82 o de cervix SiHa en un volumen final de 300 µL de PBS. Una vez prendidos los tumores, los animales se aleatorizaron y se distribuyeron a razón de 6 ratones por grupo experimental. A continuación se procedió a la inyección directa de 200 µg de CIGB-300 (100 µL) o PBS (100 µL) en la masa tumoral (30-50 mm³) durante cinco días consecutivos. El efecto antitumoral del péptido CIGB-300 por la vía sistémica se evaluó en el modelo experimental de cáncer de pulmón NCI-H125 después de inocular 5×10^6 células por vía s.c en un volumen final de 300 µL de PBS. Cuando los tumores alcanzaron 50 mm³, los animales se aleatorizaron, se distribuyeron

a razón de 7 ratones por grupo experimental y se procedió a la inyección por vía i.p. durante cinco días consecutivos de 2 ó 10 mg/kg de CIGB-300 o PBS en un volumen final de 100 μ l. En todos los experimentos se registró el volumen tumoral y la supervivencia de los animales.

3.7 Experimentos de interacción en solución (del inglés “*pull-down*”)

Las células seleccionadas se sembraron en placas de 100 mm (Cellstar, EUA) a razón de $3,5 \times 10^5$ células/mL y se cultivaron durante 18-20 h en medio completo RPMI o DMEM. Al siguiente día, se adicionó el conjugado CIGB-300-B a una concentración final de 100 μ M para las células NCI-H82 o a la concentración correspondiente a la CI_{50} para el resto de las líneas celulares y se incubó durante 30 min (NCI-H82) ó 10 min (NCI-H125, HEP-2C, SiHa, PC-3, SW948). A continuación, se colectaron las células mediante tripsinización, se lavaron dos veces con PBS (4°C) y se lisaron mediante incubación en una solución hipotónica (0,1X PBS) que contenía 1 mM ditioneitol (DTT) (Sigma, EUA) e inhibidores de proteasas (Roche, EUA) durante 30 min (4°C). Seguidamente, se realizaron cinco ciclos de congelación (nitrógeno líquido)–descongelación (37°C), se colectó la fracción soluble del lisado celular mediante centrifugación a 13 000 g por 15 min (4°C) y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad, EUA). Para cada reacción de *pull-down* se utilizaron 200-300 μ g de proteínas totales y se mezclaron con 30 μ L de matriz estreptavidina-sefarosa pre-equilibrada (Amersham, Suecia). Después de 1 h de incubación en agitación a 4°C, la matriz se colectó mediante centrifugación, se lavó y se preparó para el análisis mediante espectrometría de masas o *Western blot* (WB).

3.7.1 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

La mezcla de proteínas provenientes del *pull-down* se fraccionó mediante electroforesis de proteínas SDS-PAGE 12,5% y se tiñó con azul Coomassie. Las bandas de proteínas visibles se extrajeron del gel y se sometieron a digestión con tripsina porcina (Promega, EUA). La mezcla de péptidos resultante se aplicó en una micro-columna de fase reversa C18 ZipTip (Millipore, EUA) y se analizó empleando un espectrómetro de masas de cuadrupolo QTOF2 (Micromass, Reino Unido) equipado con una fuente de electroaerosol. Para la identificación de las proteínas a partir de los espectros de masas se empleó el programa Mascot (Matrix Science, Reino Unido) y la base de datos de proteínas humanas UniProt.

3.7.2 Inmunodetección de proteínas mediante *Western blot*

La mezcla de proteínas se fraccionó mediante SDS-PAGE 12,5% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C extra, Amershan, Reino Unido) en un equipo de transferencia semihúmedo (Trans Blot SD Cell, BioRad, EUA). Posterior a la transferencia, la membrana se bloqueó durante 18-20 h en PBS-leche 5% (OXOID, Inglaterra), se adicionaron los anticuerpos anti-B23 (Zymed, EUA) o anti-C23 (Sigma, EUA) a 1 $\mu\text{g/mL}$ y se incubó durante 1 h a 37°C. Después de tres lavados con PBS, se incubó en idénticas condiciones experimentales con el conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa (Sigma, EUA). Finalmente se procedió al revelado de la reacción durante 1-2 min con una solución de luminol (1,5 mM luminol, 0,4 mM ácido cumárico, peróxido de hidrógeno 0,01%, 0,1M Tris pH 8,6) y la subsiguiente exposición de la membrana en filmes de rayos-X (Ortho CP-G plus, Bélgica). En algunos experimentos se realizó un tratamiento previo al *pull-down* con nucleasas de ADN y ARN (Promega, EUA) donde se mezclaron 50 μg de proteínas totales del lisado celular con 100 u/mL ó 100 $\mu\text{g/mL}$ de cada nucleasa respectivamente, y se incubaron durante 10 min a 30°C.

Para los experimentos de inmunodetección del blanco molecular del péptido CIGB-300 en extractos celulares, los cultivos se incubaron durante 10 min con concentraciones variables de péptido. A continuación, las células se lisaron en solución tampón RIPA (del inglés “*radio immunoprecipitation assay*”) (Boehringer Mannheim, EUA), se estimó la concentración de proteínas totales y se aplicaron 10 μg proteínas/carril en geles de SDS-PAGE 12,5%. La inmunodetección de B23/NPM se realizó como se describió anteriormente y se utilizó al anticuerpo monoclonal anti-B-actina (1:1000) (Sigma, EUA) para normalizar la carga de proteínas/carril en la electroforesis. Finalmente, los cambios en los niveles intracelulares de la proteína pro-apoptótica Bax en células NCI-H82 se detectaron utilizando un anticuerpo anti-Bax a una concentración final de 2 $\mu\text{g/mL}$ (Santa Cruz, EUA).

3.8 Experimentos de microscopía confocal

Para demostrar la colocalización del péptido CIGB-300 con el blanco molecular se incubaron células NCI-H82 con 80 μ M del conjugado CIGB-300-B durante 5, 15 ó 30 min. A continuación, se colectaron las células mediante centrifugación, se lavaron con PBS y se fijaron en una solución de paraformaldehído 3% durante 30 min a 22°C. Después de permeabilizar con Tritón 0,1%, se bloqueó durante 30 min con una solución de albúmina de suero bovino al 3% y se incubó 1 h a 37°C con el conjugado estreptavidina-FITC (Dako Cytomation, EUA), el anticuerpo monoclonal anti-B23, o ambos. Finalmente, se utilizó el conjugado anti-IgG de ratón-Rodamina (Chemicon Temecula, EUA) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Las células se montaron en cubreobjetos de vidrio empleado una solución tampón (glicerol 80%, 1 mg/mL parafenildiamina, 0,2 M Tris-HCl pH 8,5) y se observaron en un microscopio confocal Olympus FV300 (Olympus Fluoview FV300; Tokyo, Japón). Para la excitación de los fluoróforos fluoresceína y rodamina, se emplearon los láser 488 nm (argon-ion laser) y 543 nm (helio-neón laser), respectivamente. La emisión de la fluoresceína se colectó mediante un filtro de 510-530 nm y para la rodamina se empleó el filtro de paso largo de 605 nm. Para reducir la interferencia recíproca de los fluoróforos se empleó una técnica de adquisición secuencial. Las imágenes se adquirieron usando una lente de inmersión 60X y procesadas empleando el programa FluoView v3.3.

Para el estudio del efecto del péptido CIGB-300 sobre la estructura nucleolar, las células NCI-H82 se incubaron durante 10, 30 y 60 min con 200 μ M de CIGB-300 y se procesaron como se describió anteriormente. A continuación, las células se incubaron durante 1 h a 37°C con los anticuerpos comerciales anti-fibrilarina (Abcam, EUA) o anti-B23 a las concentraciones recomendadas por el proveedor. Después de lavar con PBS se adicionaron los conjugados anti-IgG de conejo-FITC o anti-IgG de ratón-Rodamina, se incubó durante 1 h a 37°C y se procedió al montaje para la observación al microscopio.

3.9 Experimentos de inhibición de la fosforilación

3.9.1 Marcaje metabólico

Para cada variante experimental se sembraron 3×10^6 células en placas de 100 mm a razón de 3×10^5 células/mL en medio completo RPMI o DMEM y se incubaron durante 18-20 h. Al día siguiente, se lavaron las células con medio libre de fosfatos (DMEM, Gibco, EUA) y se incubaron durante 1 h en medio suplementado con SFB al 10%. A continuación se adicionó medio fresco con 1 mCi/mL de ortofosfato de sodio [P^{32}] (Amersham, Alemania) y se incubó durante 30-150 min. Se adicionaron los péptidos o el inhibidor comercial de la enzima CK2 TBB (donado por el Dr. Favlio Meggio) a diferentes concentraciones y se incubó durante 30-120 min. Seguidamente, se realizaron dos lavados con PBS (4°C), se lisaron las células en tampón RIPA suplementado con 2 mM de inhibidores de fosfatasas (NaF, Na_3VO_4 , B-glicerofosfato) y se colectaron los sobrenadantes mediante centrifugación a 13 000 g durante 5 min (4°C). Finalmente, se determinó la concentración de proteínas en dicha fracción y se mezclaron 200 μ g de proteínas totales con 3 μ g del anticuerpo anti-B23 para la inmunoprecipitación utilizando el kit IP-50 (Sigma, EUA). La fracción inmunoprecipitada fue separada mediante SDS-PAGE, visualizada por tinción con azul Coomassie, y posteriormente se procedió al secado y exposición del gel en placas de rayos-X (Kodak, Alemania). Después de 7-10 días de incubación, las placas se revelaron y se realizó el análisis densitométrico de cada banda visible mediante el programa ImageJ v1.37 (NIH, EUA). La inhibición de la fosforilación fue calculada según la fórmula: % Inhibición = $(1 - IR \text{ banda B23 tratada} / IR \text{ banda B23 control}) * 100$, donde IR (Intensidad Relativa) = intensidad banda P^{32} / intensidad banda azul Coomassie.

Para la línea celular NCI-H82 se realizó un experimento de marcaje metabólico en condiciones de baja concentración de suero. Las células fueron incubadas durante 48 h en medio RPMI al 0,2% de SFB y posteriormente inducidas a re-entrar en el ciclo celular por incubación durante 2 h en presencia de medio completo (10%). A partir de este momento se continuó con el protocolo anteriormente descrito.

3.9.2 Inhibición de la fosforilación *in vitro*

La proteína recombinante de fusión GST-B23 fue obtenida mediante el clonaje del ADN complementario (ADNc) al gen *npm1* proveniente de la línea celular NCI-H82 en el vector de expresión pGEX-6P-2 (Amersham Biosciences, EUA) y su posterior semipurificación empleando el kit MicroSpin GST Purification Module (Amersham Biosciences, EUA). El ensayo de inhibición de la fosforilación se realizó directamente sobre la proteína de fusión GST-B23 anclada a la matriz glutatión-sefarosa, una vez estimada la cantidad y pureza de la proteína por análisis densitométrico del gel SDS-PAGE. En cada reacción de fosforilación se pre-incubaron 20 μ L de matriz (8 μ g de GST-B23) con los péptidos o controles durante 30 min a 37°C en agitación constante. Después de lavar con PBS, la matriz se pre-equilibró en solución tampón CK2 (20 mM Hepes, 20 mM MgCl₂ pH 7,5), se añadieron 6 μ L de la mezcla de reacción de la enzima (8 μ g/mL Aprotinina, 100 μ g/mL BSA, 100 μ M ATP, 12 μ Ci ATP-P³²) y 1 U/reacción de enzima CK2 comercial (Promega, EUA). La mezcla de reacción se incubó durante 1 h a 37°C en agitación constante y se empleó el inhibidor TBB como control positivo. Finalmente, después de cinco lavados con PBS la proteína GST-B23 se eluyó de la matriz por calentamiento durante 10 min a 95°C en presencia de solución tampón muestra y se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE 12,5%. El desarrollo de la señal radioactiva y posterior análisis se realizó como se describió en el acápite anterior. La concentración de CIGB-300 que inhibió el 50% de la fosforilación en estas condiciones experimentales se determinó a partir de la curva dosis-respuesta obtenida empleando el programa CalcuSyn.

3.10 Estudios de internalización del péptido CIGB-300

3.10.1 Citometría de Flujo

Las células seleccionadas se sembraron en placas de seis pozos a razón de $3,5 \times 10^5$ células/pozo en un volumen final de 1,5 mL de medio completo, y se incubaron durante 18-20 h. A continuación, se eliminó el sobrenadante de cultivo, se adicionaron 1,5 mL/pozo de una solución de 100 μ M de CIGB-300 acoplado a fluoresceína (CIGB-300-F) y se incubó durante 3, 10, 30 ó 60 min. Después de dos lavados con PBS, las células adheridas se colectaron mediante tripsinización (10 min), se inactivó la tripsina con medio completo, y se mezclaron con los sobrenadantes correspondientes. Los precipitados celulares se lavaron

dos veces con PBS (4°C) mediante centrifugación a 200 g durante 5 min, se disolvieron en 1 mL de PBS (4°C) con IP 5 µg/mL (Sigma, EUA), y a continuación se analizaron mediante citometría de flujo. En las muestras controles se incubó durante 5 min con Tripán Blue (Sigma, EUA) 0,4% (m/v) como agente apagador de la fluorescencia extracelular.

Se utilizó un citómetro PAS III (Partec, Alemania) con una fuente de excitación de argón 488 nm y los filtros correspondientes a 520 nm (FL1, fluoresceína) y 630 nm (FL3, yoduro de propidio). El porcentaje de células transducidas y la fluorescencia intracelular (unidades arbitrarias, u.a.) se estimó usando el programa del citómetro FloMax v2.57. Los parámetros del proceso de internalización en cada línea celular se determinaron a partir del ajuste de las curvas Fluorescencia (u.a.) vs Tiempo de incubación (min) al modelo de asociación exponencial descrito para los PPC ($Y=Y_{max}*(1-\exp(-K*T))$) (Zorko y Langel, 2005) utilizando el programa GraphPad Prism v4.00 (GraphPad Software, EUA).

3.10.2 Microscopía de fluorescencia

Las células seleccionadas se sembraron en placas de vidrio a razón 3×10^5 células/mL en un volumen final de 30 µL de medio completo y se incubaron durante 18-20 h. A continuación, se adicionó el conjugado CIGB-300-F a una concentración de 100 µM en medio de cultivo, y se incubó durante 3, 10, 30 y 60 min en los experimentos cinéticos. En los experimentos de dosis-respuesta se adicionó el conjugado a 50, 100 y 200 µM y se incubó durante 10 min. Las células se fijaron durante 15 min a 22°C en solución de paraformaldehído 3% (m/v) (Sigma, EUA), se lavaron tres veces con PBS (3 min) y se detuvo la reacción con 50 mM NH₄Cl (CALEDON, Canadá). Finalmente, se repitieron los lavados y se realizó el montaje de las placas con glicerol 40% (v/v) (Plusone, Suecia). Para la visualización del conjugado a fluoresceína y la documentación fotográfica, se empleó el microscopio Axioskop 40. Se estimó por conteo directo al microscopio de fluorescencia el número de células con señal fluorescente en el nucléolo celular (núcleolo+) y se determinó el porcentaje con relación al total de células transducidas en cada campo visual (% nucléolo+).

3.10.3 Fraccionamiento subcelular

Para estimar el depósito intracelular del péptido CIGB-300 y las moléculas derivadas, los péptidos se conjugaron por su región C-terminal al radioisótopo Tecnecio 99 (Tc99)

mediante un método directo con dimercapto succinato como co-ligando (Succinate-Sn kit, CENTIS, Cuba). Solo se utilizaron en la experimentación radiopéptidos con una pureza superior al 90% de acuerdo a los controles de calidad establecidos por el Centro de Radioisótopos (CENTIS, Cuba).

Las células NCI-H125 o SiHa se sembraron en placas de seis pozos a razón de $0,8 \times 10^6$ células en un volumen final de 3 mL de medio completo y se incubaron durante 18-20 h. Seguidamente, se añadieron los radiopéptidos CIGB-300 (100 μ M), L-CIGB-300 (20 μ M), L-CPPmut-P15 (20 μ M) y CPPmut-P15 (100 μ M), y se incubó durante 10 min en condiciones de cultivo celular. Se colectó el sobrenadante, se lavaron los pozos con 3 mL de PBS y se cosecharon las células mediante incubación con 1 mL de tripsina/pozo durante 10 min y posterior centrifugación a 200 g durante 5 min (4°C). Después de lavar con 5 mL de PBS 4°C, se procedió a lisar las células mediante incubación con 200 μ L de solución tampón de lisis total (150 mM NaCl, NP-40 1% (v/v), 50 mM Tris-HCl pH 7,4) o a obtener las fracciones celulares según el protocolo descrito por Cornelissen y cols. (2007). La fracción citosólica se obtuvo después de incubar los precipitados celulares de cada variante experimental durante 6 min a 4°C con 500 μ L de la solución tampón de lisis (25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, NP-40 0.5% (v/v), 10 mM Tris-HCl pH 7,4). Seguidamente los extractos celulares se centrifugaron a 1000 g durante 2 min (4°C) y se recolectó el sobrenadante como la fracción citosólica. Después de lavar con la misma solución, los núcleos celulares se lisaron con 200 μ L del tampón de lisis total. Las cantidades de péptido internalizado se estimaron a partir de los conteos por min (cpm) registrados en cada fracción (contador gamma) utilizando la actividad específica para cada molécula (A.E.= cpm radiopéptido/ μ g totales de péptido).

3.11 Análisis de la expresión génica modulada por el péptido CIGB-300

3.11.1 Construcción de la biblioteca de hibridación substractiva

Se cultivaron 3×10^6 células NCI-H125 en 10 mL de medio completo RPMI durante 18-20 h. A continuación, se incubó con 100 μ M de CIGB-300 o PBS durante 30 min y se colectaron las células mediante tripsinización. Seguidamente, se aisló el ARN total con reactivo Trizol (Invitrogen, EUA) y se cuantificó su concentración y pureza en un

espectrofotómetro Nanodrop 3300 (THERMO SCIENTIFIC, EUA). La síntesis del ADNc se realizó empleando 5 µg de ARN total y el kit comercial SuperScript II RT (Invitrogen, EUA). Los pasos subsiguientes de generación de la biblioteca mediante hibridación subtractiva se realizaron de acuerdo al protocolo PCR-Select cDNA Subtraction kit (Clontech, EUA) utilizando el ADNc proveniente de las células incubadas con PBS como referencia (del inglés “*driver*”) para determinar los genes expresados diferencialmente en la muestra tratada (del inglés “*tester*”). Los ADNc resultantes de la substracción se clonaron en el vector pGEMTeasy vector (Promega, EUA) y se transformaron en la cepa de *E. coli* XL-1 Blue. Finalmente, los clones resultantes se inocularon en medio líquido 2XYT suplementado con 100 µg/mL de ampicilina (placas de 96 pozos, 100 µL/pozo) y se crecieron durante 16 h a 37°C para la posterior amplificación de los insertos de ADN por PCR y su secuenciación automática (Macrogen, Corea).

3.11.2 Identificación y anotación funcional de genes

Para la identificación de los genes contenidos en la biblioteca de hibridación subtractiva se realizó una búsqueda de homología en las bases de datos de secuencias de nucleótidos nr (GenBank+EMBL+DDBJ+PDB) empleando la herramienta BLAST (del inglés “*Basic Local Alignment Search Tool*”) y el programa Chromas v2.13 (Technelysium Pty Ltd, Australia). Con el objetivo de identificar los principales procesos biológicos representados en la biblioteca se realizó un análisis de enriquecimiento de datos con la herramienta de anotación funcional por agrupamiento (del inglés “*Functional Annotation Clustering*”) del programa web DAVID (Huang y cols., 2009).

3.11.3 PCR cuantitativo en tiempo real

Para realizar el análisis de expresión de los genes seleccionados, 3×10^6 células NCI-H125 se incubaron con 100 µM del péptido CIGB-300 o PBS durante 30 min. A continuación se procedió a purificar el ARN total y sintetizar el ADNc como se describió en el **acápito 3.11.1**. Los oligonucleótidos cebadores se diseñaron empleando el programa web Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Rozen y Skaletsky, 2000) para hibridar en exones diferentes con el objetivo de minimizar la contaminación con ADN genómico (**Anexo 1**).

Se realizaron reacciones controles de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) para descartar la posible contaminación con ADN genómico (cebadores *snrpa*) y la presencia de inhibidores de la reacción, así como evaluar la eficiencia y la especificidad de amplificación en cada reacción de qPCR. Los genes *snrpa*, *ywhaz*, *hmbs* y *hprt1* se evaluaron preliminarmente mediante el programa geNorm v3.5 (Southampton University's School of Medicine, Reino Unido) que utiliza el método descrito por Vandesompele y cols. (2002) para seleccionar la mejor pareja de genes de referencia. Los genes de referencia seleccionados se utilizaron para el posterior análisis estadístico utilizando el programa REST 2009 v2.0.13 (Pfaffl y cols., 2002). Dicho programa permite, a partir de los valores de Ct (del inglés “*Concentration threshold*”) y eficiencia de la reacción de qPCR, estimar los cambios en los niveles de expresión de un gen de interés relativo a los genes de referencia en diferentes condiciones experimentales según la fórmula:

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{Ptarget}}(\text{control} - \text{muestra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{\text{Pref}}(\text{control} - \text{muestra})}}$$

donde R representa el valor de expresión relativa, E_{target} : la eficiencia de amplificación del gen de interés, E_{ref} : la eficiencia de amplificación del gen de referencia y ΔC_{P} : la variación de Ct medida como la diferencia entre el control y cada muestra tanto para el gen de interés como para los genes de referencia.

Las reacciones de qPCR se realizaron en un equipo Rotor-Gene 6000 (Qiagen, EUA) con el kit QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen, EUA) empleando los siguientes parámetros: 95°C durante 15 min, 40 ciclos de amplificación a 95°C por 15 s, 60°C durante 30 s y 72°C por 30 s. El análisis de las corridas se realizó empleando el programa Rotor Gene 6000 v1.7 Software (Qiagen, Alemania).

3.12 Microscopía electrónica de transmisión

Para determinar el desensamblaje nucleolar se procesaron muestras de células provenientes de cultivos NCI-H125 tratados durante 1 h con PBS o los péptidos CIGB-300 y CIGB-300mut, ambos utilizados a 100 μM . Las muestras se fijaron a 4°C durante 2,5 h en

solución de fijación (4% paraformaldehído (v/v), 0,2% glutaraldehído (v/v), 0,1 M tampón fosfato pH 7,3) y a continuación se lavaron con tampón fosfato. Las muestras fijadas se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, se incluyeron en Resina Spurr y se polimerizaron durante 24 h a 37°C. Las secciones ultrafinas obtenidas se colocaron sobre rejillas de cobre, se contrastaron y observaron en un microscopio electrónico de transmisión MET JEOL JEEM 2000EX. Se analizaron un total de 20 microfotografías electrónicas por cada muestra y se determinó el porcentaje de desensamblaje nucleolar en cada campo visual por conteo directo de células de acuerdo a la fórmula: % desensamblaje= # células desensamblaje/# total de células x 100.

3.13 Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos se empleó el programa SPSS v15.0 (LEAD Technologies, EUA) y la representación gráfica se realizó mediante el editor de gráficos GraphPad Prism v4.00 (GraphPad Software, EUA). En la determinación de la homogeneidad de varianza y normalidad de los datos se utilizó la prueba de Bartlett y Kolmogorov-Smirnov, respectivamente. Después de demostrar la normalidad en la distribución de la variable volumen tumoral, se realizó una prueba t (una cola) en aquellos ensayos donde se compararon dos grupos experimentales o una prueba ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey en los ensayos con tres o más grupos experimentales. Las curvas de sobrevida de Kaplan-Meier se compararon mediante la prueba de Log-rank (Mantel-Cox). Para la comparación de los valores de porcentaje de nucléolo positivo, una vez demostrada la normalidad y homogeneidad de varianza de los datos, se realizó un ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. La correlación entre dicha variable y el porcentaje de inhibición de la proliferación que ejerce el péptido CIGB-300 en cada línea celular se realizó mediante una prueba de Spearman (una cola).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización del perfil de respuesta antineoplásico del péptido CIGB-300

4.1.1 Evaluación del efecto antiproliferativo del péptido CIGB-300 en células tumorales y no tumorigénicas

Con el objetivo de evaluar el efecto antiproliferativo del CIGB-300 se estimó la potencia o concentración de péptido que inhibe el 50% de la proliferación celular (CI_{50}) a partir de las curvas dosis (concentración)-respuesta (% inhibición) en un panel de líneas celulares derivadas de cuatro tipos de tumores sólidos (Figura 3A y B; Anexo 2).

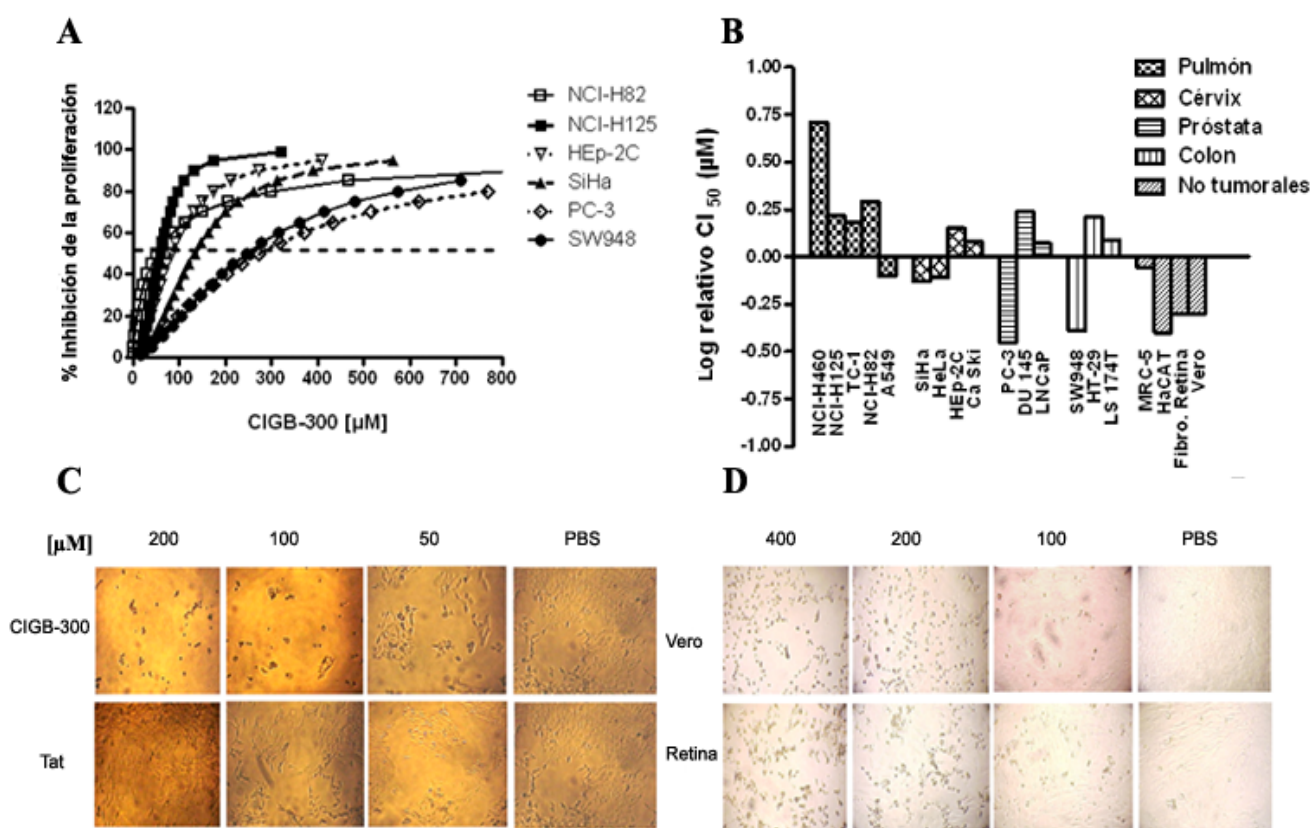


Figura 3. Efecto antiproliferativo del CIGB-300 en líneas celulares tumorales y no tumorigénicas. (A) Curvas dosis-respuesta representativas del efecto antiproliferativo del péptido en seis líneas celulares tumorales. Las curvas se generaron empleando el programa CalcuSyn a partir de los datos de inhibición de la proliferación obtenidos del ensayo de sulforrodamina B. (B) Perfil de respuesta antiproliferativo construido usando la CI_{50} media del panel (120 μ M) como línea de referencia (log relativo CI_{50} =0,0). Las líneas celulares representadas por debajo de la línea de referencia se consideran de menor sensibilidad al péptido mientras que los valores positivos representan una mayor sensibilidad al CIGB-300. (C) Efecto al microscopio óptico del péptido CIGB-300 y el PPC Tat sobre la proliferación de células NCI-H125. (D) Efecto del CIGB-300 sobre cultivos celulares de las líneas no tumorigénicas Vero y Fibroblastos de Retina a las concentraciones de péptido típicamente empleadas en los ensayos antiproliferativos.

El péptido CIGB-300 ejerció un potente efecto inhibitorio en el rango micromolar (20-280 μM) sobre la proliferación de células tumorales derivadas de pulmón, cérvix, próstata, y colon. En dichos experimentos, las células tumorales de pulmón resultaron particularmente sensibles al tratamiento con el CIGB-300 (CI_{50} media=64 μM , rango: 20-125 μM), mientras que la proliferación de las líneas celulares derivadas de cérvix resultó menos afectada (CI_{50} media=103 μM , rango 70-134 μM). Sin embargo, las células tumorales de próstata y colon mostraron una mayor heterogeneidad en la respuesta antiproliferativa al péptido.

Por otra parte, la incubación de células tumorales con el péptido penetrador Tat en similares condiciones experimentales mostró que el efecto citotóxico del PPC *per se* se manifiesta principalmente a concentraciones superiores a 200 μM (> 10% inhibición) (**Figura 3C; Anexo 3**). Sin embargo, las células HEp-2C y SW948 resultaron particularmente sensibles al efecto antiproliferativo del Tat incluso a concentraciones inferiores a 150 μM del PPC (**Anexo 3**). Finalmente, la evaluación del CIGB-300 en líneas celulares no tumorigénicas evidenció que se requieren concentraciones de péptido prácticamente dos veces superiores para inhibir el 50% de la proliferación celular (CI_{50} media=188 μM) en estas células con relación a las células tumorales (CI_{50} media= 102 μM) (**Figura 3B y D; Anexo 2**).

4.1.2 Determinación del efecto antitumoral del péptido CIGB-300 en modelos animales de cáncer derivados de líneas celulares

Para determinar si el efecto del péptido CIGB-300 sobre la proliferación celular pudiera manifestarse también *in vivo* se evaluó su efecto antitumoral en modelos animales derivados de líneas celulares de cáncer. La inyección directa del CIGB-300 en los tumores prendidos a partir de la inoculación de células NCI-H82 y SiHa en ratones atímicos, mostró que el péptido induce un retardamiento significativo del crecimiento tumoral (NCI-H82 día 29: T/C óptimo=0,34 $p<0,001$; SiHa día 55: T/C óptimo=0,29 $p<0,001$) e incremento de la supervivencia de los animales (NCI-H82: 11 días $p<0,01$; SiHa: 17 días $p<0,01$) en ambos modelos experimentales (**Figura 4**).

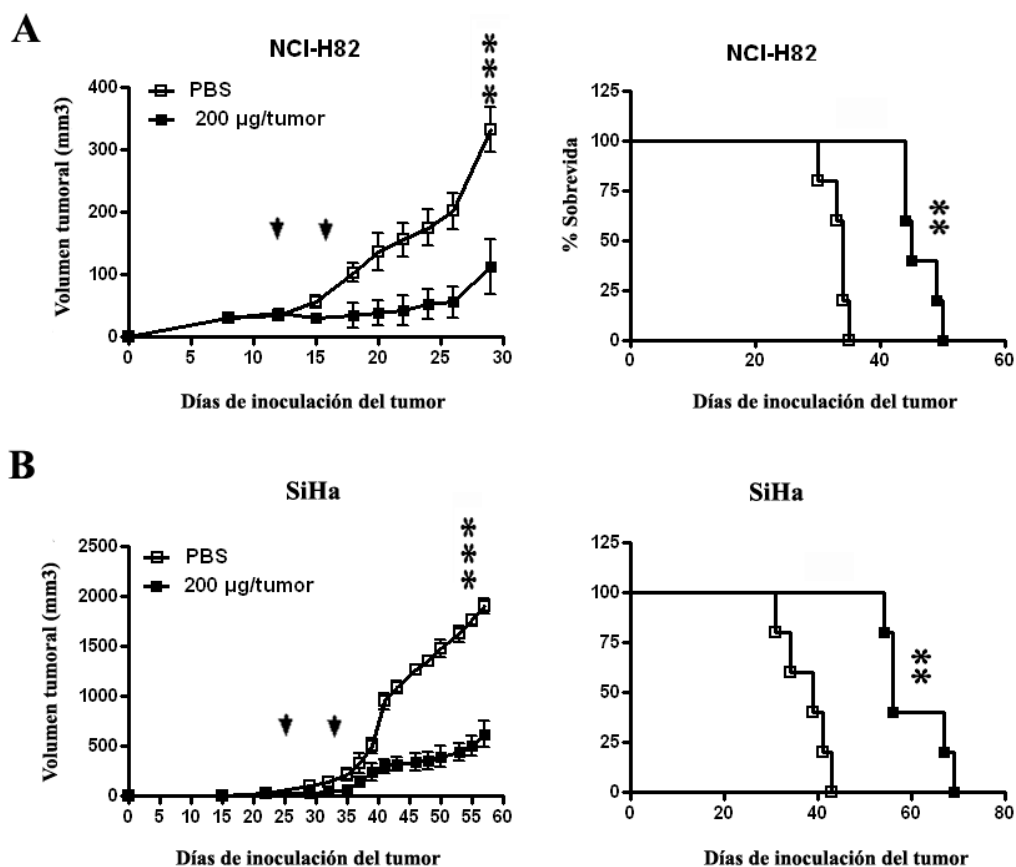


Figura 4. Efecto antitumoral del péptido CIGB-300 cuando se administra directamente en tumores preñidos a partir de la inoculación de células NCI-H82 (A) y SiHa (B) en ratones atímicos. Se muestran los gráficos correspondientes a las curvas de crecimiento tumoral (media \pm DE) y supervivencia (curvas de Kaplan-Meier) de los animales tratados con el péptido CIGB-300 o PBS (placebo) en cada modelo experimental. Las flechas marcan el inicio y fin de un ciclo de administración de CIGB-300 que consiste en una inyección diaria durante cinco días consecutivos. *, grado de significación estadística alcanzado en las comparaciones entre los volúmenes tumorales en el T/C óptimo (prueba t de una cola) y en el análisis de la supervivencia de los animales (prueba Log-rank). ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$. DE, desviación estándar.

De manera similar, la administración del CIGB-300 mediante la ruta intraperitoneal indujo un efecto antitumoral significativo en los modelos singénico y de xenotransplante (**Figura 5**). La aplicación consecutiva de cinco inyecciones de péptido en el rango de dosis de 2,5-40 mg/kg redujo el volumen tumoral entre un 61% (día 28: T/C óptimo=0,39 $p < 0,01$) y 94% (día 28: T/C óptimo=0,06 $p < 0,001$) en el modelo TC-1/C57/BL6. En correspondencia con dicha reducción, las tres dosis ensayadas produjeron incrementos significativos de la supervivencia de los animales tratados (2,5 mg/kg vs placebo: 9 días $p < 0,05$; 10 mg/kg vs placebo: 21 días $p < 0,01$; 40 mg/kg vs placebo: 15 días; $p < 0,001$). Por esta misma vía de administración los resultados obtenidos en el modelo de xenotransplante NCI-H125/ratón atímico evidenciaron

que el CIGB-300 reduce el crecimiento tumoral en al menos un 50% (día 20: T/C óptimo=0,43 $p<0,01$) con el subsiguiente aumento de la supervivencia de los ratones tratados (2 mg/kg vs placebo: 11 días $p<0,001$; 10 mg/kg vs placebo: 15 días $p<0,001$).

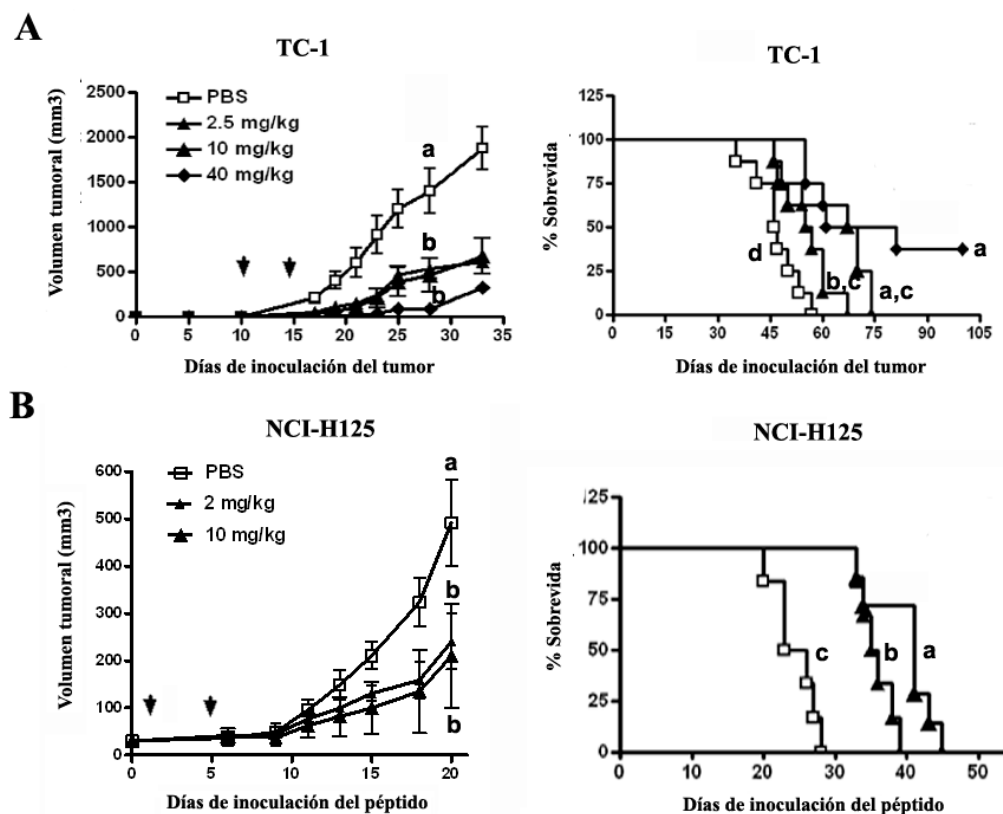


Figura 5. Efecto antitumoral del péptido CIGB-300 administrado por vía intraperitoneal en el modelo singénico de cáncer TC-1/C57/BL6 (A) y de xenotransplante NCI-H125/ratón atímico (B). Se muestran los gráficos correspondientes a las curvas de crecimiento tumoral (media \pm DE) y supervivencia (curvas de Kaplan-Meier) de los animales tratados con diferentes dosis de péptido CIGB-300 o PBS (placebo). Las flechas marcan el inicio y fin de un ciclo de administración de CIGB-300 que consiste en una inyección diaria durante cinco días consecutivos. Letras diferentes indican significación estadística ($p<0,05$) en las comparaciones realizadas entre los grupos mediante una prueba ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey en el T/C óptimo. El análisis de la supervivencia se realizó mediante la prueba Log-rank. DE, desviación estándar.

4.1.3 Estudio del efecto del péptido CIGB-300 sobre la supervivencia celular y la progresión en el ciclo celular

Con el propósito de analizar si el efecto antiproliferativo del CIGB-300 en células tumorales puede ser consecuencia de la disminución de la viabilidad celular, se analizaron los marcadores de apoptosis exposición de fosfatidil-serina (Anexina V), fragmentación del ADN genómico (método radioactivo) y pérdida del potencial de membrana mitocondrial (reactivo JC-1) (Figura 6).

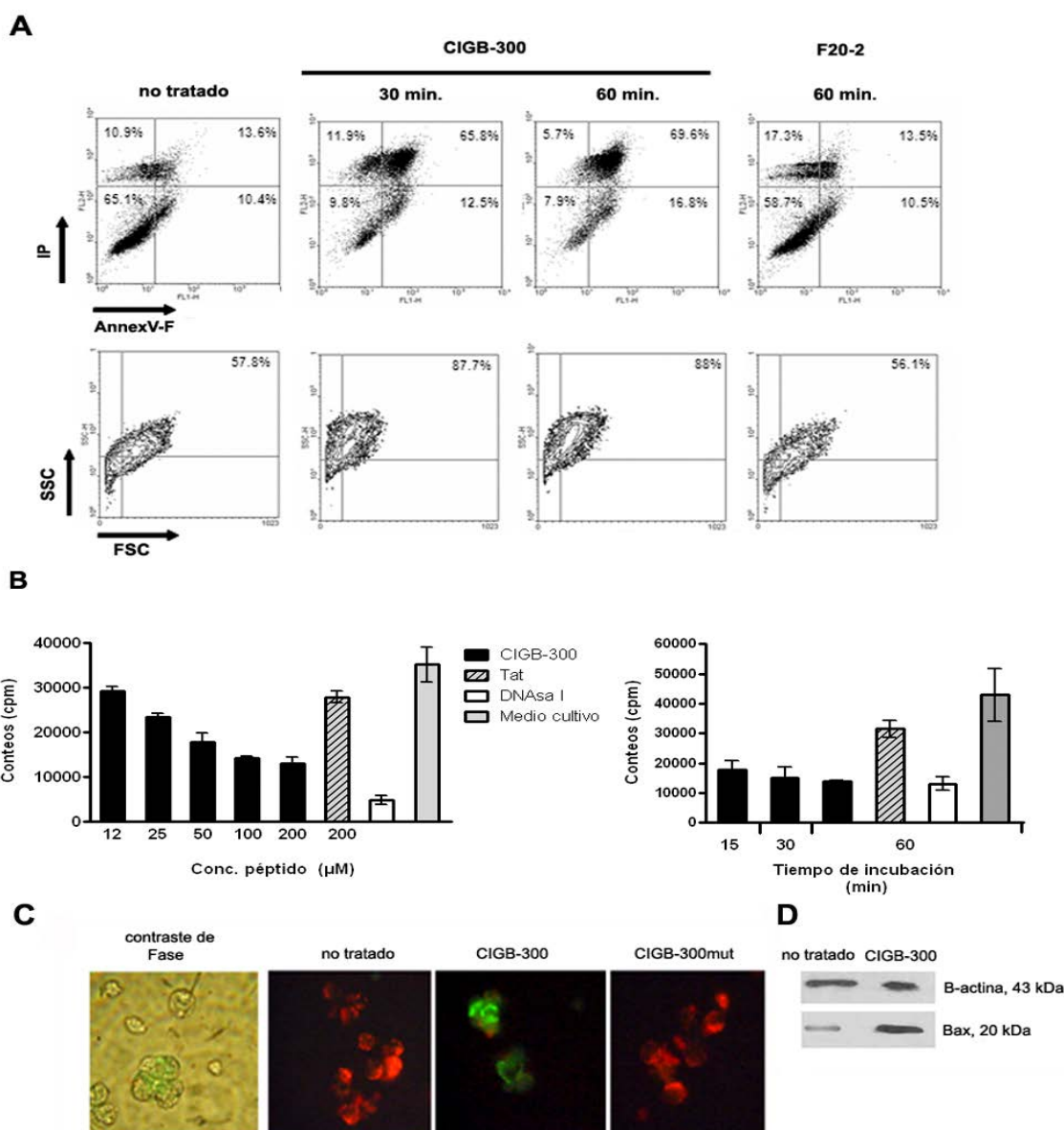


Figura 6. Evaluación de los marcadores de apoptosis exposición de fosfatidil-serina, fragmentación del ADN genómico y pérdida del potencial de membrana mitocondrial en células NCI-H82 incubadas con el péptido CIGB-300. (A) Las células se incubaron con $100 \mu\text{M}$ de CIGB-300 o el péptido control F20-2 durante 30 min ó 1 h, se marcaron con AnnexV-F y se analizaron por citometría de flujo (panel superior). Adicionalmente, se analizaron los perfiles SSC vs FSC para evidenciar cambios en la morfología y tamaño de las células (panel inferior). (B) Células NCI-H82 se incubaron con concentraciones de CIGB-300 en el rango 12-200 μM durante 2 h o con 200 μM de péptido durante 15, 30 ó 60 min y se estimó la fragmentación del ADN mediante el método radioactivo ($\text{media} \pm \text{DE}$). La digestión con DNAsa I se utilizó como control positivo de fragmentación y la incubación en presencia de medio de cultivo para estimar la apoptosis espontánea. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes (3 réplicas cada uno). (C) Observación al microscopio de fluorescencia de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en células incubadas durante 30 min con $100 \mu\text{M}$ de CIGB-300 (fluorescencia verde) pero no con la variante mutada CIGB-300mut (fluorescencia roja) utilizando el reactivo JC-1. (D) Verificación por WB del aumento en los niveles intracelulares de la proteína pro-apoptótica Bax en idénticas condiciones experimentales a (C). Los niveles de β -actina se usaron como referencia para normalizar la carga de proteínas por carril.

La estimación del porcentaje de células en apoptosis en la línea celular de pulmón NCI-H82 mediante el ensayo de Anexina V reveló que el péptido CIGB-300 induce apoptosis en el 50% de las células tratadas a los 30 min de incubación (**Figura 6A, panel superior**). En correspondencia, el análisis de los perfiles de FSC (del inglés “*forward scatter*”) vs SSC (del inglés “*side scatter*”) reveló cambios importantes en la morfología de las células tratadas con el péptido CIGB-300 (**Figura 6A, panel inferior**). Los cambios morfológicos consistieron en el aumento de la granulosidad (aumento en el parámetro SSC) de las células en un 30% de la población. Sin embargo, el análisis de las poblaciones celulares incubadas con idéntica concentración del péptido control negativo F20-2 no evidenció dichos cambios morfológicos, mientras que solamente se observó un 7% de marcaje con AnnexV-F después de 1 h de incubación. Por otra parte, la inducción de apoptosis asociada a la dosis fue documentada a través de la estimación de la fragmentación del ADN en las células tratadas (**Figura 6B**). La adición de 100 y 200 μM de CIGB-300 a los cultivos celulares produjo un máximo de 60% de fragmentación del ADN después de 2 h de incubación con el péptido, efecto que se manifestó desde los 15 min para la dosis de 200 μM . Esta misma concentración del PPC Tat solo indujo un 15-20% de fragmentación después de 1 h de incubación en idénticas condiciones experimentales. Finalmente, el péptido CIGB-300 indujo la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en las células NCI-H82 después de 30 min de incubación, evento bioquímico asociado a la activación de la vía intrínseca de apoptosis y que se corresponde con el aumento en los niveles intracelulares de la proteína proapoptótica de inserción en la membrana mitocondrial Bax (**Figura 6C y D**).

De manera análoga a lo observado en la línea celular NCI-H82, la evaluación del marcador temprano de apoptosis Anexina V en las líneas celulares NCI-H125, HEP-2C, SiHa, PC-3 y SW948 evidenció la inducción de apoptosis 30 min después de la incubación con dosis equipotentes (CI_{50}) de CIGB-300 (**Figura 7A**).

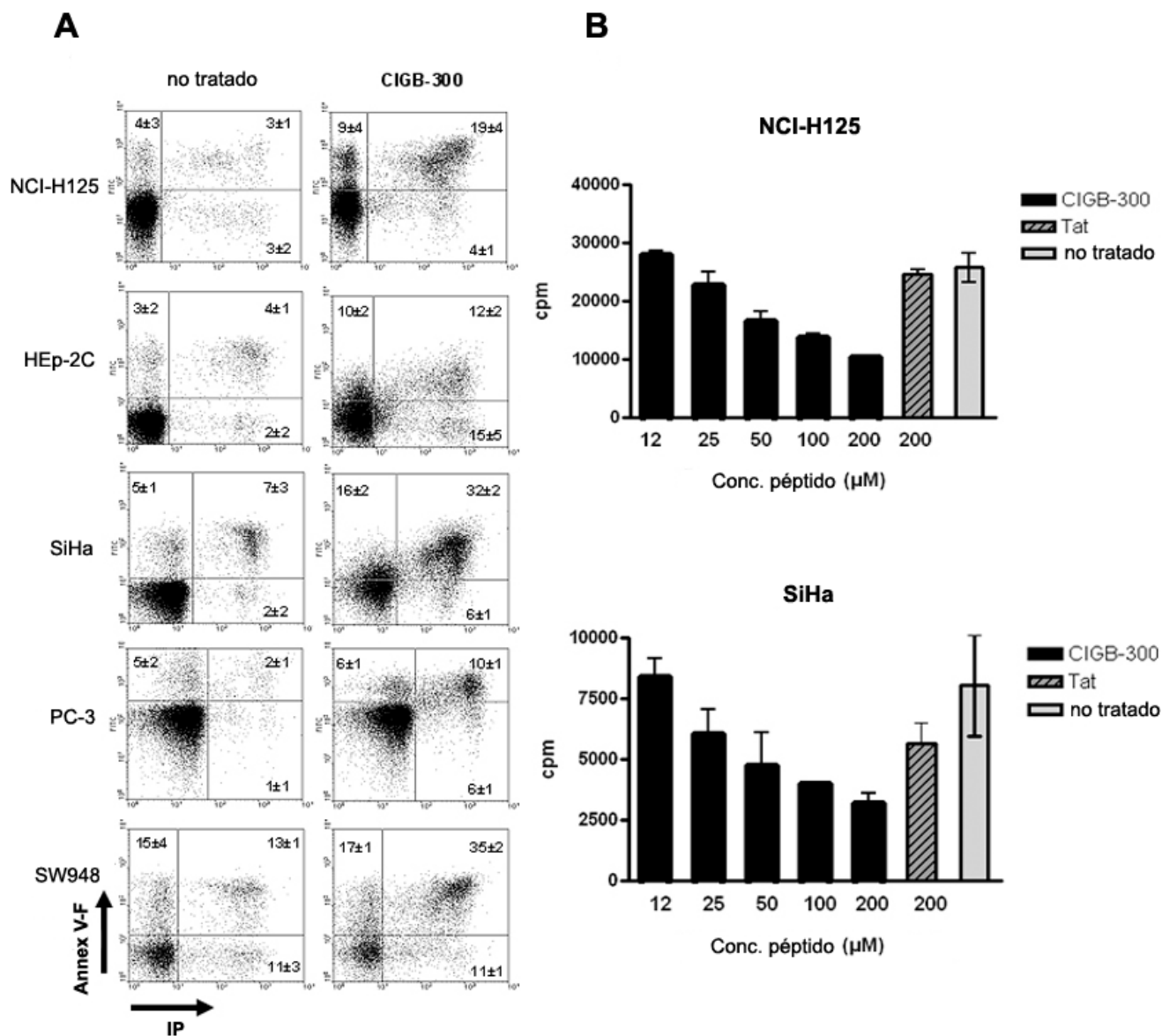


Figura 7. Inducción de apoptosis por el péptido CIGB-300 y su relación con la dosis en las células tumorales. (A) Las células se incubaron con dosis equipotentes de CIGB-300 (CI_{50} , Anexo 2) durante 30 min, se procedió al marcaje con AnnexV-F y seguidamente se realizó el análisis mediante citometría de flujo empleando IP como marcador de necrosis (AnnexV-F- / IP+). Las poblaciones celulares en apoptosis se consideraron como AnnexV-F+ / IP- y AnnexV-F+ / IP+. Los gráficos y estimados (media±DE) corresponden a un experimento representativo de dos experimentos independientes (3 réplicas cada uno). Se adquirieron 10 000 eventos por muestra. (B) Fragmentación del ADN genómico inducida en células NCI-H125 y SiHa por incubación con CIGB-300 (12-200 μ M) durante 2 h (media±DE). Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes (3 réplicas cada uno). La digestión con DNAsa I se utilizó como control positivo y la fragmentación espontánea se determinó en presencia de medio de cultivo solamente.

Los resultados mostraron que el péptido CIGB-300 induce muerte celular en un 10-35% de las poblaciones celulares tratadas. Para las líneas celulares PC-3 y SW948 estos valores de marcaje se incrementaron hasta un 26 y 47% respectivamente, cuando se prolongó la incubación con el péptido CIGB-300 hasta 6 h. La relación entre la magnitud de la apoptosis y la dosis del péptido fue documentada mediante un ensayo de fragmentación del ADN genómico en las líneas celulares NCI-H125 y SiHa (**Figura 7B**). Después de 2 h de incubación con el péptido CIGB-300 a 200 μ M hasta un 60% de fragmentación del ADN fue registrado en ambas líneas celulares.

Con el propósito de evaluar si el péptido CIGB-300 pudiera afectar también la progresión en el ciclo celular de las células tumorales, se analizó el contenido de ADN de células tratadas con dosis equipotentes (CI_{50}) de péptido mediante citometría de flujo. El efecto sobre el ciclo celular en cinco de las seis líneas celulares se manifestó fundamentalmente después de 5 h de incubación con el CIGB-300, mientras que el péptido no produjo cambios en la progresión del ciclo en las células SW948 en ninguno de los intervalos de tiempo analizados (**Figura 8A y B**). Sin embargo, no se observó un patrón de arresto en una fase particular del ciclo celular entre las poblaciones celulares incubadas con el péptido CIGB-300, registrándose la acumulación de células tumorales en las tres fases del ciclo celular G_0/G_1 , S y G_2/M .

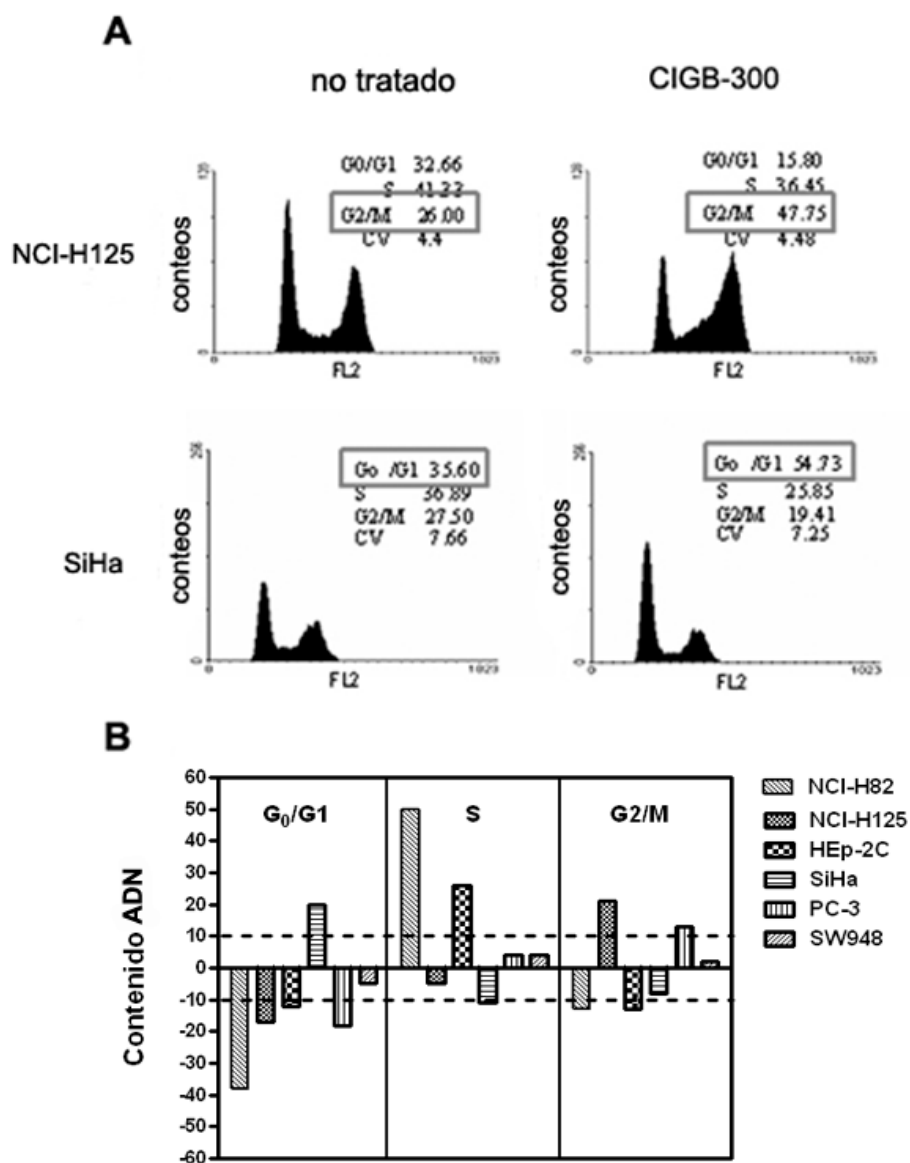


Figura 8. Efecto de dosis equipotentes de péptido CIGB-300 (CI₅₀) sobre la progresión del ciclo celular en células tumorales. (A) Histogramas representativos del análisis mediante citometría de flujo del contenido de ADN en células NCI-H125 y SiHa tratadas con CIGB-300 durante 5 h. El % de células en cada fase del ciclo celular se estimó mediante el programa FloMax. (B) Gráfica resumen de la distribución en el ciclo celular de las seis líneas tumorales incubadas con el CIGB-300 durante 5 h. El contenido de ADN normalizado se determinó de acuerdo a la fórmula: contenido ADN= % población fase X (células tratadas) - % población fase X (células no tratadas) donde un valor positivo representa un arresto en la fase X del ciclo celular. Las barras representan la media de 3 réplicas experimentales.

En correspondencia con los hallazgos *in vitro*, la inducción de apoptosis *in vivo* se verificó mediante la detección *in situ* de la fragmentación del ADN en el tumor después de la administración intraperitoneal del péptido CIGB-300 en el modelo singénico de cáncer TC-1/C57/BL6.

Posterior a la quinta inyección de péptido se evidenció por la técnica de TUNEL la fragmentación del ADN en los tumores de los ratones tratados con una dosis de CIGB-300 que induce más de un 90% de inhibición del crecimiento tumoral en este modelo experimental (**Figura 9**). Dicho efecto no fue observado en los animales inyectados con PBS usando el mismo régimen y vía de administración.

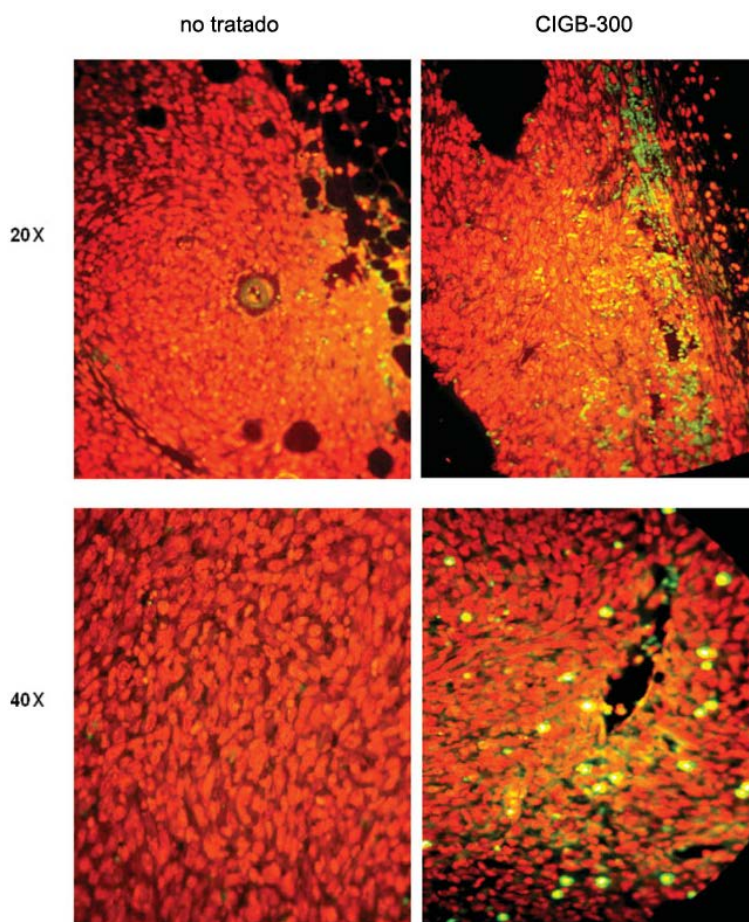


Figura 9. Detección *in situ* de apoptosis en la masa tumoral mediante la evaluación de la fragmentación del ADN genómico por la técnica de TUNEL en el modelo singénico TC-1/C57/BL6. Se sacrificaron dos animales de cada grupo experimental 2 h después de la quinta inyección intraperitoneal del péptido CIGB-300 (40 mg/kg) o PBS (no tratado) y se procedió como se describe en el acápite 3.6.1 de la sección **Materiales y Métodos**. La fluorescencia verde se corresponde con las células en apoptosis (fragmentación del ADN), mientras que en las células marcadas con IP (fluorescencia roja) no se registra dicha fragmentación. Se muestra la magnificación empleada para la observación al microscopio de fluorescencia de dos cortes representativos de los tumores analizados.

4.2 Identificación de B23/NPM como blanco molecular del péptido CIGB-300 en líneas celulares tumorales de diferente origen y fenotipo de respuesta al péptido

4.2.1 Identificación de proteínas que interactúan *in vivo* con el péptido CIGB-300 en la línea celular NCI-H82

Para identificar las proteínas que interactúan *in vivo* con el péptido CIGB-300 en células tumorales se realizaron experimentos de interacción en solución (del inglés “*pull-down*”) en la línea celular NCI-H82 con el empleo de una variante de CIGB-300 conjugada a biotina (CIGB-300-B). Dicha línea celular se seleccionó como modelo experimental en correspondencia con su marcada sensibilidad al péptido tanto *in vitro* como *in vivo* (**Figura 3A y 4A**). Las proteínas que interactuaron con el CIGB-300 se aislaron, se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE, y posteriormente se identificaron por espectrometría de masas (**Figura 10A**).

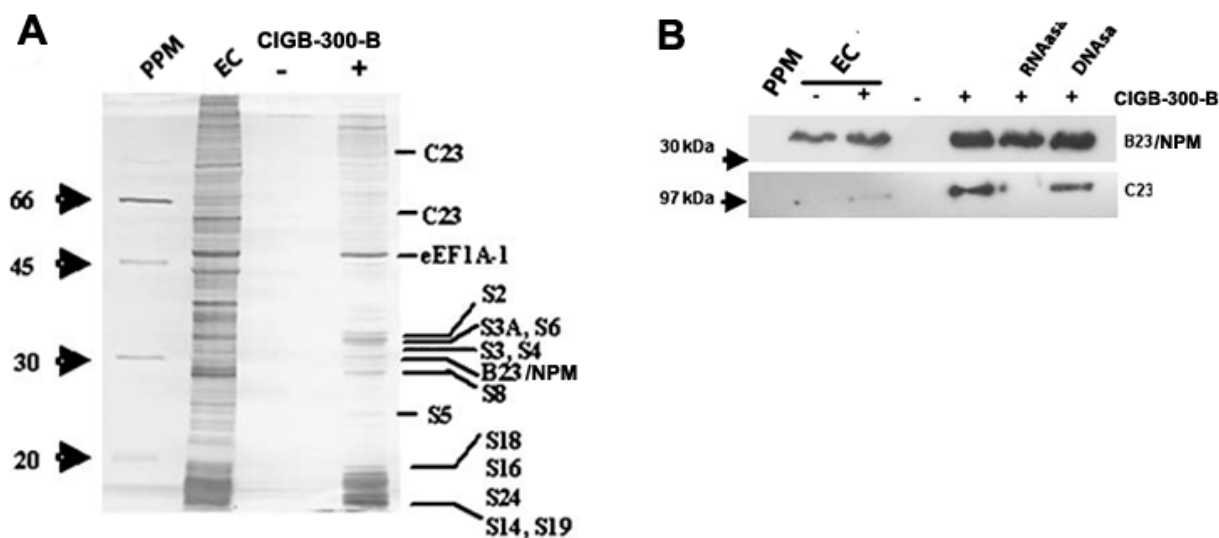


Figura 10. Identificación de las proteínas que interactúan *in vivo* con el CIGB-300 en la línea celular NCI-H82. (A) Cultivos celulares de NCI-H82 se incubaron con el conjugado CIGB-300-biotina (100 μ M) o PBS durante 30 min. Posteriormente, las células se lisaron y los extractos de proteínas totales derivados se incubaron con la matriz estreptavidina-sefarosa. Las proteínas unidas fueron separadas mediante SDS-PAGE 12.5%, extraídas del gel e identificadas por espectrometría de masas. (B) Verificación mediante WB de las proteínas sustratos de la CK2 B23/NPM y C23 que interactúan *in vivo* con el CIGB-300-B en presencia de RNAsa, DNAsa, o en ausencia de ambas nucleasas. PPM, patrón de peso molecular; EC, extracto celular inicial.

A partir del análisis por espectrometría de masas de los péptidos extraídos del gel una vez realizada la digestión enzimática, se identificaron un total 20 proteínas que participan en diversos procesos biológicos, fundamentalmente la traducción de proteínas y biogénesis ribosomal (**Anexo 4**). Entre dichas proteínas se identificaron dos sustratos validados de la enzima CK2, B23/NPM y C23 (Meggio y Pinna, 2003).

La interacción entre el péptido CIGB-300 y ambos sustratos de la enzima CK2 se corroboró mediante experimentos adicionales de *pull-down* y posterior identificación por WB. En dichos experimentos, se constató la presencia de ambas proteínas en los extractos celulares iniciales y la fracción unida al CIGB-300-B, pero no entre las proteínas unidas a la matriz de estreptavidina-sefarosa de manera inespecífica (**Figura 10B**). Considerando que las proteínas B23/NPM y C23 se identificaron previamente como componentes de partículas de ribonucleoproteínas en el núcleo de la célula (Piñol-Roma, 1999), se realizaron experimentos de interacción en solución posterior a la incubación con exceso de nucleasas de ARN y ADN. La pre-incubación de los extractos celulares con RNAsa no afectó la interacción entre el péptido CIGB-300 y B23/NPM, sin embargo eliminó completamente el reconocimiento del anticuerpo policlonal específico a la proteína C23 (**Figura 10B**). Dicho hallazgo indica que el péptido CIGB-300 interactúa de manera directa (*i.e.* péptido-proteína) solamente con la proteína B23/NPM a pesar de que ambas proteínas constituyen sustratos validados de la enzima CK2.

Para corroborar la proximidad física entre el péptido CIGB-300 y la proteína B23/NPM en el contexto celular, se realizaron experimentos de colocalización por microscopía confocal. La colocalización del CIGB-300 con B23/NPM en el nucléolo fue revelada después de 5 min de incubación por la presencia de fluorescencia naranja en la región nucleolar de la mayoría de las células (**Figura 11**). Dicha colocalización se evidenció aun después de 30 min de incubación, aunque transcurrido este tiempo también se registró un incremento de la señal fluorescente derivada del péptido en el resto del área nuclear. Este hallazgo se corresponde con la principal localización subcelular descrita para B23/NPM.

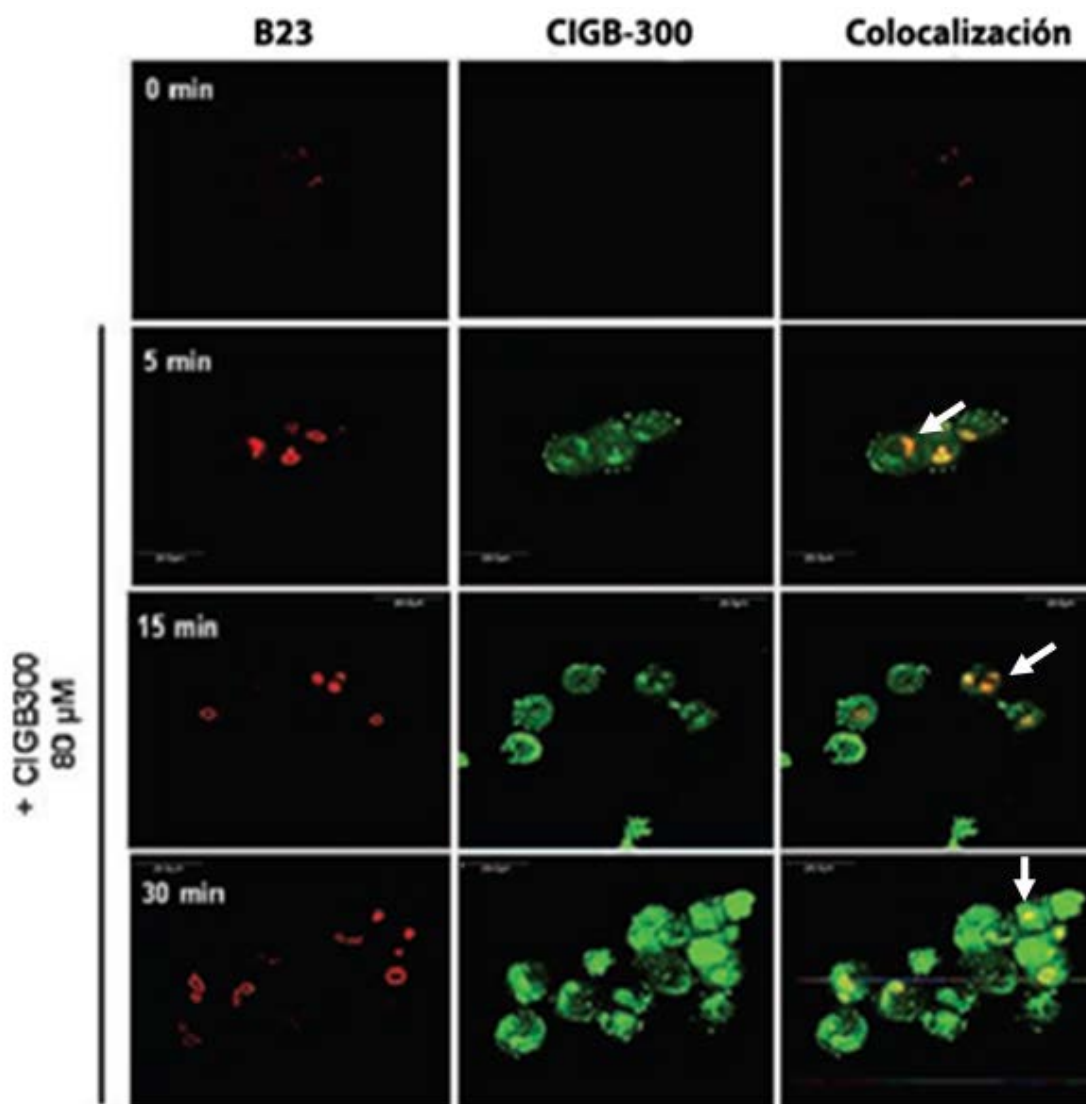


Figura 11. Colocalización del péptido CIGB-300 con la proteína sustrato de la enzima CK2 B23/NPM en el nucléolo de células NCI-H82 evidenciada por microscopía confocal. Las células se incubaron con 80 μM de CIGB-300-B durante 5, 15 ó 30 min, se fijaron, permeabilizaron e incubaron con el conjugado estreptavidina-fluoresceína para revelar la localización del CIGB-300 (fluorescencia verde). La distribución de B23/NPM en la célula se evidenció mediante el uso del anticuerpo anti-B23/NPM y el conjugado a rodamina correspondiente (fluorescencia roja). La colocalización CIGB-300-B23/NPM se corresponde con la fluorescencia naranja. Se muestran resultados representativos de dos experimentos independientes. Barra, 20 μm .

4.2.2 Evaluación del efecto del péptido CIGB-300 sobre la fosforilación *in vitro* e *in vivo* de B23/NPM

Para determinar si la interacción CIGB-300-B23/NPM en el nucléolo de las células NCI-H82 conlleva a la inhibición de la fosforilación de B23/NPM, se realizaron experimentos de marcaje metabólico *in vivo*. Considerando que la fosforilación catalizada por la enzima CK2

sobre B23/NPM ocurre principalmente durante la interfase del ciclo celular (G1-S-G2), se evaluaron dos variantes experimentales. En la primera se enriqueció la proporción de células en la fase G1-S por disminución del contenido de suero con relación a cultivos celulares mantenidos en condiciones estándares de crecimiento (segunda variante) (**Figura 12A y B**).

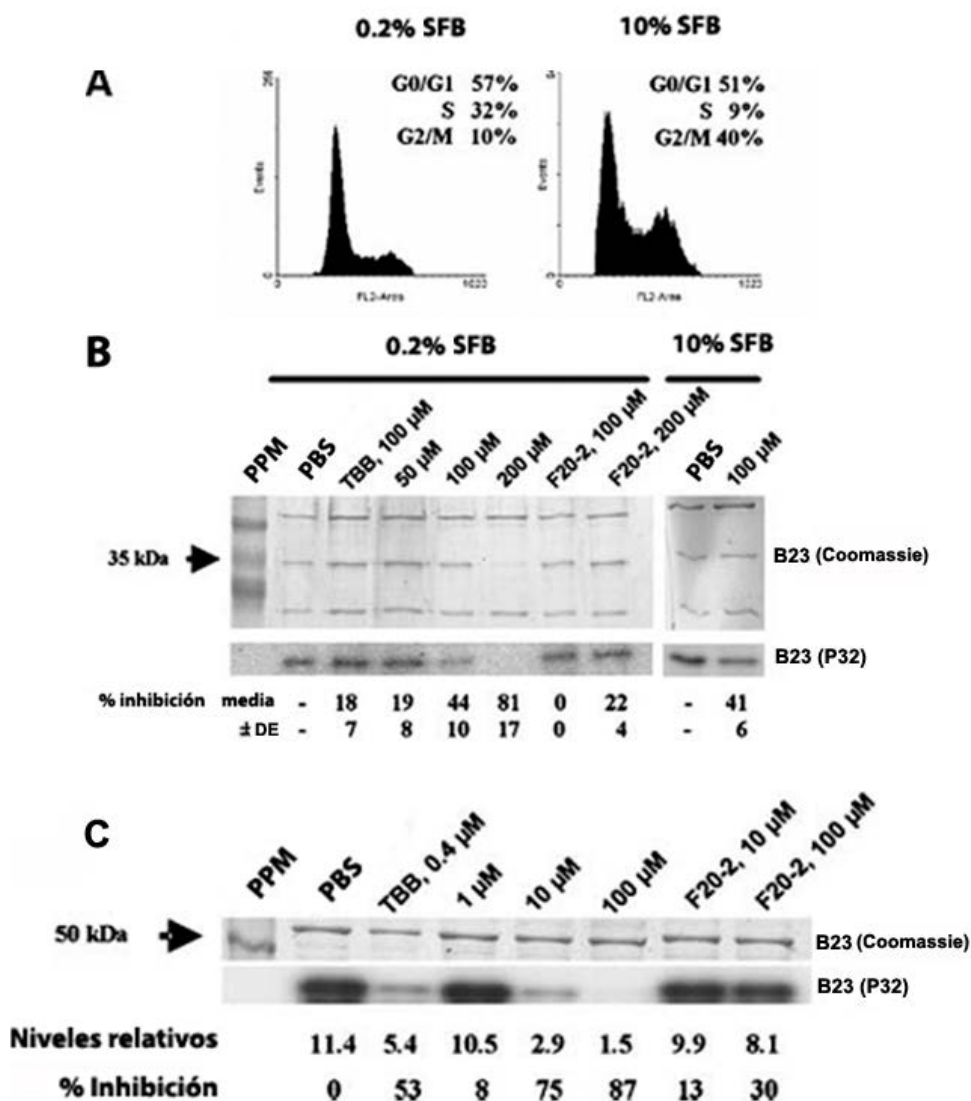


Figura 12. Efecto *in vitro* e *in vivo* del péptido CIGB-300 sobre la fosforilación de B23/NPM por la enzima CK2. (A) Efecto de la disminución del contenido de suero sobre la progresión en el ciclo celular de células NCI-H82. (B) Inhibición de la fosforilación de B23/NPM en presencia del péptido CIGB-300 mediante marcaje metabólico (P^{32}) y posterior inmunoprecipitación en las condiciones experimentales descritas en (A). Los cultivos celulares suplementados con P^{32} se incubaron durante 30 min con los péptidos CIGB-300 y F20-2 o durante 1 h con el inhibidor comercial de la enzima CK2 (TBB). Los porcentajes de inhibición correspondientes a cada uno de los tratamientos se estimaron tomando como referencia las células incubadas con PBS (100% fosforilación) (acápita 3.9.1). Los valores mostrados representan la media de dos experimentos independientes (media \pm DE). (C) Ensayo de fosforilación *in vitro* empleando la proteína recombinante GST-B23 y una fuente comercial de enzima CK2.

Los resultados del marcaje metabólico evidenciaron que el CIGB-300 inhibe de manera dosis-dependiente la fosforilación de la proteína B23/NPM después de 30 min de incubación. En estas condiciones experimentales la concentración que produjo el 50% de inhibición de la fosforilación (CI_{50} -P32) fue de 104 μ M de CIGB-300, mientras que el péptido F20-2 que carece del dominio inhibidor de la fosforilación solo mostró un 20% de inhibición a la mayor dosis ensayada (**Figura 12B**). Por otra parte, el inhibidor de la enzima CK2 (TBB) mostró solamente un efecto discreto (<20%) sobre la fosforilación de B23/NPM. Finalmente, la dosis de 100 μ M de CIGB-300 produjo similar inhibición sobre la fosforilación de B23/NPM tanto en las células cultivadas a baja concentración de suero (0,2%) como en aquellas mantenidas en condiciones estándares de crecimiento (10%).

Con el propósito de corroborar la interacción directa CIGB-300-B23/NPM y la subsiguiente inhibición de la fosforilación, se evaluó el efecto del péptido en un ensayo *in vitro* usando la proteína recombinante de fusión Glutación-S-transferasa-B23 (GST-B23, **Anexo 5**) y la enzima CK2. La incubación del CIGB-300 a diferentes concentraciones con la mezcla de reacción produjo una inhibición dosis-dependiente de la fosforilación catalizada por CK2 sobre la proteína GST-B23 con un valor de CI_{50} -P32 estimado de 8 μ M (**Figura 12C**). Dicha inhibición fue 6 y 2,5 veces mayor que la obtenida para el péptido control F20-2 a 10 y 100 μ M, respectivamente. Por otra parte, el inhibidor TBB mostró una potente inhibición de la fosforilación a una concentración inferior a 1 μ M en estas condiciones experimentales *in vitro*.

4.2.3 Verificación de la interacción CIGB-300-B23/NPM *in vivo* en líneas celulares tumorales diversas

Para verificar si el efecto antiproliferativo del péptido CIGB-300 en celulares tumorales de diferente origen y fenotipo de respuesta puede ser mediado por la inhibición de la fosforilación de B23/NPM de manera análoga a lo observado en la línea NCI-H82, se realizaron experimentos de *pull-down* en cinco líneas celulares derivadas de pulmón, cervix, próstata y colon. Experimentos preliminares de WB realizados para corroborar la presencia de la proteína B23/NPM en los extractos celulares iniciales demostraron que los niveles de dicha proteína son comparables (**Figura 13, panel superior**).

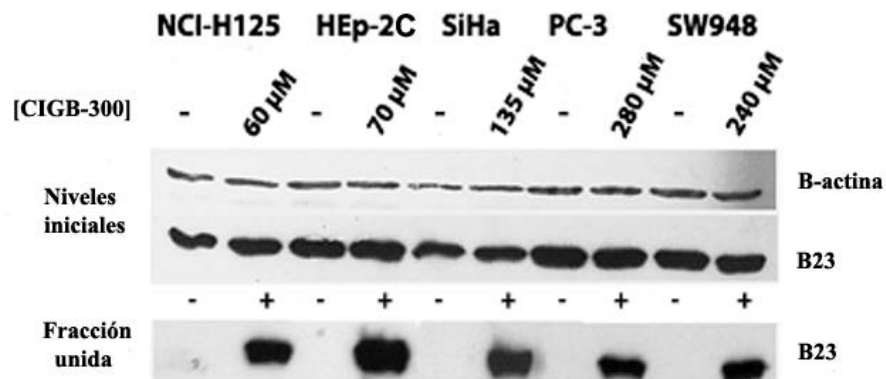


Figura 13. Interacción del CIGB-300 con B23/NPM en las líneas celulares NCI-H125, HEp-2C, SiHa, PC-3 y SW948 después de 10 min de incubación con dosis equipotentes de péptido (CI_{50}). Panel superior, identificación de B23/NPM mediante WB en los extractos iniciales de células tratadas con CIGB-300-B (+) o PBS (-). Los niveles de β -actina se usaron como referencia para normalizar la carga de proteínas por carril. Panel inferior, identificación de B23/NPM mediante WB en las fracciones precipitadas con el conjugado CIGB-300-B. Resultados representativos de dos experimentos de *pull-down* independientes.

La incubación con dosis equipotentes (CI_{50}) de péptido permitió evidenciar que el CIGB-300 interactúa rápidamente (10 min) con la proteína B23/NPM en las cinco líneas celulares evaluadas (**Figura 13, panel inferior**). Dicha interacción solo fue observada en presencia del CIGB-300-B y no como resultado de una adsorción inespecífica de la proteína a la matriz de estreptavidina-sefarosa.

4.2.4 Evaluación del efecto del péptido CIGB-300 sobre la fosforilación *in vivo* de B23/NPM en líneas celulares tumorales diversas.

Para determinar si el péptido CIGB-300 inhibe la fosforilación de B23/NPM por la enzima CK2 en las líneas celulares seleccionadas, se realizaron experimentos de marcaje metabólico *in vivo* en presencia de concentraciones equipotentes de péptido (CI_{50}) e incubando durante 30 min (**Figura 14A**).

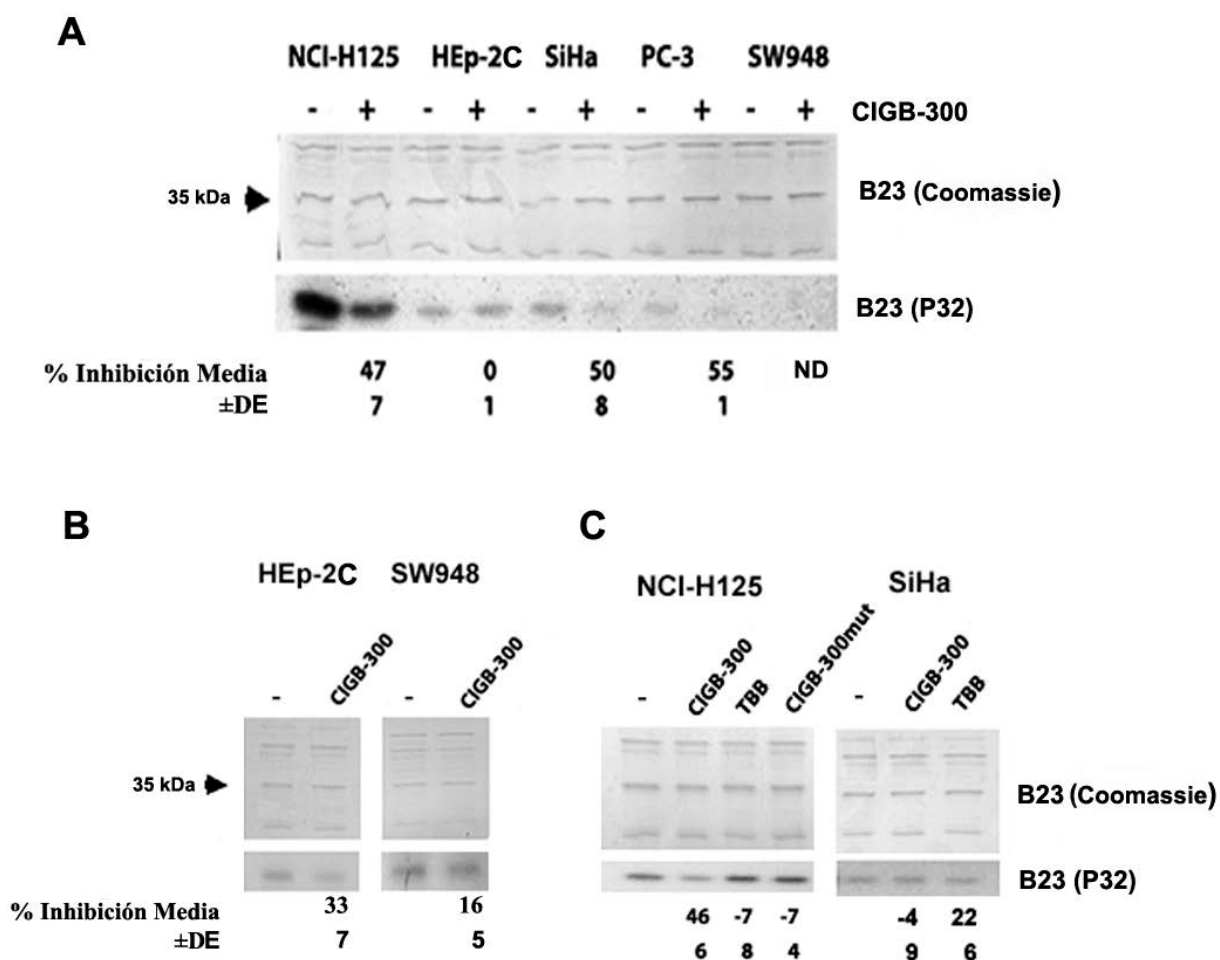


Figura 14. Marcaje metabólico *in vivo* e inmunoprecipitación de B23/NPM en cinco líneas celulares. (A) Efecto inhibitorio sobre la fosforilación de B23/NPM de dosis equipotentes de CIGB-300 (CI_{50}) después de 30 min de incubación (carriles +). El porcentaje de inhibición de la fosforilación fue estimado usando como referencia la fosforilación máxima observada en células incubadas con PBS (-). (B) Para las líneas celulares HEp-2C y SW948 se realizaron experimentos adicionales de marcaje metabólico incrementando el tiempo de incubación con CIGB-300 hasta 2 h y el marcaje con P^{32} hasta 2,30 h (SW948). (C) Efecto inhibitorio sobre la fosforilación de B23/NPM de una concentración de 100 μ M de CIGB-300, TBB o CIGB-300mut después de 30 min de incubación en las líneas celulares NCI-H125 y SiHa. ND, no determinado. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

Los resultados demostraron que el péptido CIGB-300 inhibe aproximadamente un 50% la fosforilación de B23/NPM en tres de las líneas celulares evaluadas (NCI-H125, SiHa y PC-3), mientras que no se observó inhibición en la línea celular HEp-2C a pesar de que la eficiencia de inmunoprecipitación fue comparable (**Figura 14A**). En esta condición experimental, no se

detectaron niveles de fosforilación endógena de B23/NPM en la línea celular SW948. Sin embargo, en condiciones donde se incrementó el tiempo de marcaje con P^{32} en SW948, así como el tiempo de incubación con el péptido en HEp-2C y SW948, se logró evidenciar que el péptido CIGB-300 también inhibe la fosforilación de B23/NPM en estas dos líneas celulares (**Figura 14B**). De manera interesante, se encontraron diferencias importantes en cuanto a los niveles de fosforilación endógena de B23/NPM entre las líneas celulares evaluadas (**Figura 14A**, carriles -).

En experimentos similares se exploró el efecto inhibitorio sobre la fosforilación de una concentración subóptima de CIGB-300 para las células SiHa en correspondencia con su efecto antiproliferativo (CI_{40}). Los resultados demostraron que dicha concentración no inhibe la fosforilación de B23/NPM en esta línea celular pero sí en las células más sensibles NCI-H125 donde la concentración de 100 μ M de CIGB-300 produce un 80% de inhibición de la proliferación celular (CI_{80}) (**Figura 14C**). Por otra parte, la evaluación en esta última línea celular de una variante mutada del péptido que carece de efecto antiproliferativo (CIGB-300mut, **Anexo 2**) no resultó en la inhibición de la fosforilación de B23/NPM.

4.3 Caracterización del proceso de internalización del péptido CIGB-300 y su relación con el perfil de respuesta antiproliferativa en células tumorales

4.3.1 Caracterización de la cinética de internalización del péptido CIGB-300 en células tumorales

Con el objetivo de analizar si la magnitud del efecto inhibitorio del CIGB-300 sobre la proliferación celular está asociada con la cantidad de péptido internalizado, se registró mediante citometría de flujo la acumulación intracelular de una variante de péptido conjugada a fluoresceína (CIGB-300-F). El CIGB-300-F se internalizó rápida (3 min) y eficientemente (75-95%) en las poblaciones celulares correspondientes a las cinco líneas celulares evaluadas. No obstante la magnitud (Y_{max}) y velocidad (K) de internalización difirieron notablemente (**Figura 15, Tabla 1**).

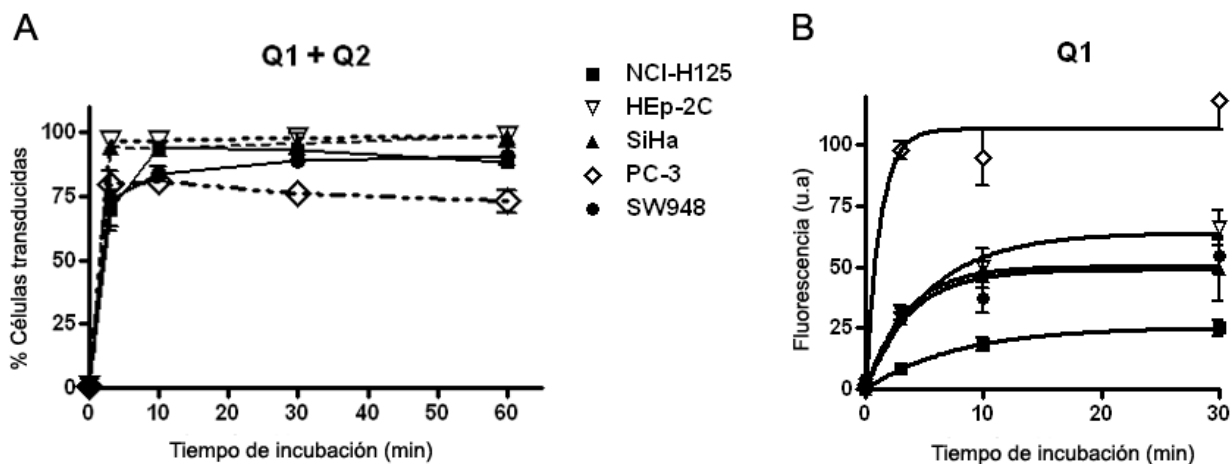


Figura 15. Cinética de internalización del conjugado CIGB-300-F en células tumorales. Las células tumorales se incubaron con 100 μ M de CIGB-300-F durante 3, 10, 30 y 60 min y seguidamente se analizaron mediante citometría de flujo empleando IP para excluir las células con daño en la membrana celular. (A) Porcentaje de células transducidas por el CIGB-300-F que incluye las células comprendidas en los cuadrantes Q1+Q2 (Anexo 6). (B) Cinética de acumulación intracelular del CIGB-300-F en las células tumorales. Para la construcción de las curvas y la estimación de los parámetros de internalización se utilizaron los valores de media geométrica de la fluorescencia (media $G \pm DE$) en el cuadrante Q1. Dichos valores experimentales fueron ajustados al modelo de internalización “*One Phase Exponential Association Model*” descrito para los PPCs. La emisión correspondiente a la fluoresceína y el IP fue registrada en el canal FL1 y FL3, respectivamente. Q1: células positivas a CIGB-300-F, Q2: células transducidas por el péptido y membrana celular dañada (doble-positivas). u.a, unidades arbitrarias. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

Tabla 1. Parámetros estimados a partir de las curvas de internalización del CIGB-300-F en las células tumorales.

Línea Celular	CI ₅₀ (μ M)	Ymax	95% CI	K	95% CI	T 1/2	R ²
NCI-H125	59	26	21-30	0.13	0.1-0.2	5.33	0.99
HEp-2C	70	64	45-83	0.19	0.1-0.4	3.74	0.98
SiHa	134	50	46-55	0.29	0.2-0.4	2.37	1.00
PC-3	280	107	72-142	0.82	0.0-3.0	0.84	0.97
SW948	239	49	19-79	0.27	0.0-0.9	2.58	0.90

Ymax, máxima acumulación intracelular del péptido (unidades arbitrarias, u.a.); K, constante de velocidad del proceso de internalización (min); T 1/2, tiempo en que se alcanza la Ymax/2 (min); CI, intervalos de confianza; R², coeficiente de regresión.

Los parámetros de internalización estimados mostraron que no existe una asociación directa entre la magnitud de la internalización y la sensibilidad de la línea al péptido CIGB-300. Por el contrario, la mayor acumulación de péptido y velocidad de internalización fue registrada en la línea menos respondedora (PC-3), mientras que la menor acumulación fue obtenida en la línea celular más sensible del panel (NCI-H125). Por otra parte, para las líneas celulares SiHa y SW948, que difieren notablemente en cuanto a su respuesta al CIGB-300, se registraron similares valores de acumulación máxima y velocidad de internalización (**Figura 15, Tabla 1**). No obstante, de manera interesante en las líneas celulares más sensibles al péptido NCI-H125 y HEp-2C el proceso de internalización del CIGB-300-F fue más lento de acuerdo a los parámetros K y T1/2.

4.3.2 Estudio de la localización subcelular del péptido CIGB-300 en células tumorales

Para analizar si las diferencias observadas en cuanto a potencia antiproliferativa del péptido CIGB-300 en células tumorales pudieran estar relacionadas con la capacidad del péptido de alcanzar el nucléolo celular, se estudió la distribución intracelular del CIGB-300-F mediante microscopía de fluorescencia. La observación directa al microscopio de las células tumorales incubadas con una concentración única de CIGB-300-F evidenció el marcaje de la región nucleolar en todas las células tratadas a los diferentes tiempos de incubación (**Figura 16A**). De manera interesante, se observaron diferencias notables entre las líneas celulares en cuanto al número de células con marcaje nucleolar que fueron documentadas mediante conteo directo al microscopio (células nucléolo+) (**Figura 16B**). Adicionalmente, en las líneas celulares NCI-H125 y SiHa se evidenció que el marcaje nucleolar está relacionado directamente con la concentración de CIGB-300-F (**Figura 16C**)

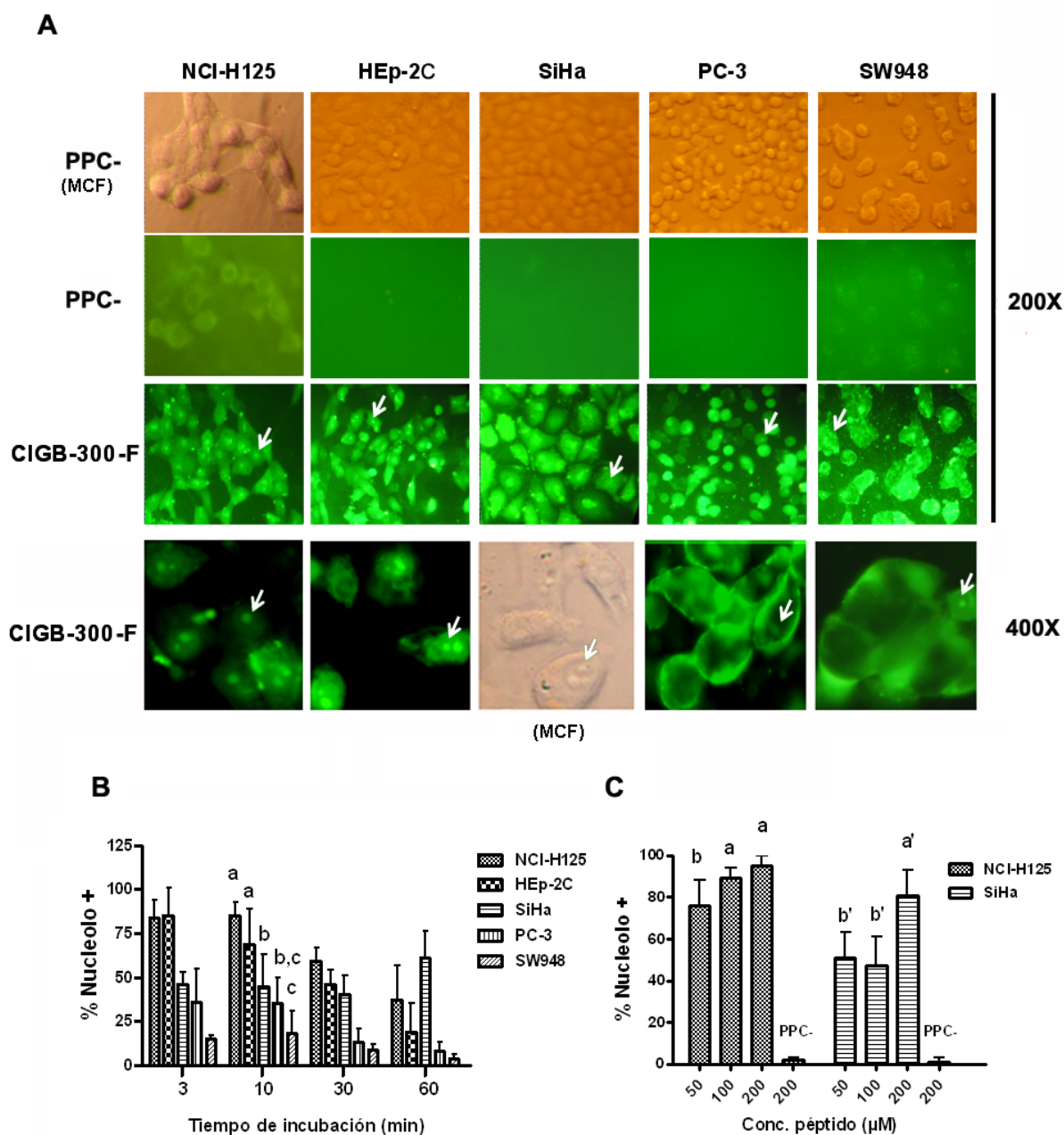


Figura 16. Localización subcelular del péptido CIGB-300-F en células tumorales y cuantificación del porcentaje de células con señal nucleolar en cada población. (A) Localización subcelular del conjugado CIGB-300-F (100 μ M) mediante microscopía de fluorescencia después de 10 min de incubación. Las flechas blancas denotan la localización nucleolar del péptido, ampliada en el panel inferior para cuatro de las líneas celulares (400X). Los nucléolos celulares se distinguen claramente al microscopio de contraste de fase (MCF) como se muestra para la línea celular HEp-2C (400X). (B) Cuantificación del porcentaje de células con señal fluorescente en el nucléolo (% nucléolo+) mediante conteo directo después de 3, 10, 30 y 60 min de incubación (media \pm DE). Para determinar el % células nucléolo+ los conteos se relativizaron al número total de células transducidas por el CIGB-300-F en cada campo visual (n=10). (C) Cuantificación del % células nucléolo+ en células NCI-H125 y SiHa incubadas durante 10 min con 50, 100 y 200 μ M de CIGB-300-F (media \pm DE). Letras diferentes indican significación estadística en las comparaciones realizadas entre los grupos mediante una prueba ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0,05$). PPC-, péptido control conjugado a fluoresceína (carece del PPC Tat). Las imágenes se obtuvieron empleando 200 y 400X de aumento.

Para determinar si existía una asociación directa entre el efecto antiproliferativo del péptido CIGB-300 y su localización nucleolar, se realizó una correlación entre estas dos variables (**Figura 17A y B**). Los resultados demostraron que el % de inhibición de la proliferación celular que produce el péptido CIGB-300 en las cinco líneas celulares correlaciona directamente con el % de células nucleólo+ en cada población celular. Por otra parte, el incremento de la dosis de péptido en las células NCI-H125 y SiHa produjo un aumento en la localización nucleolar del CIGB-300-F que correlacionó directamente con el % de inhibición de la proliferación que producen dichas concentraciones en ambas líneas celulares (**Figura 17A y B**).

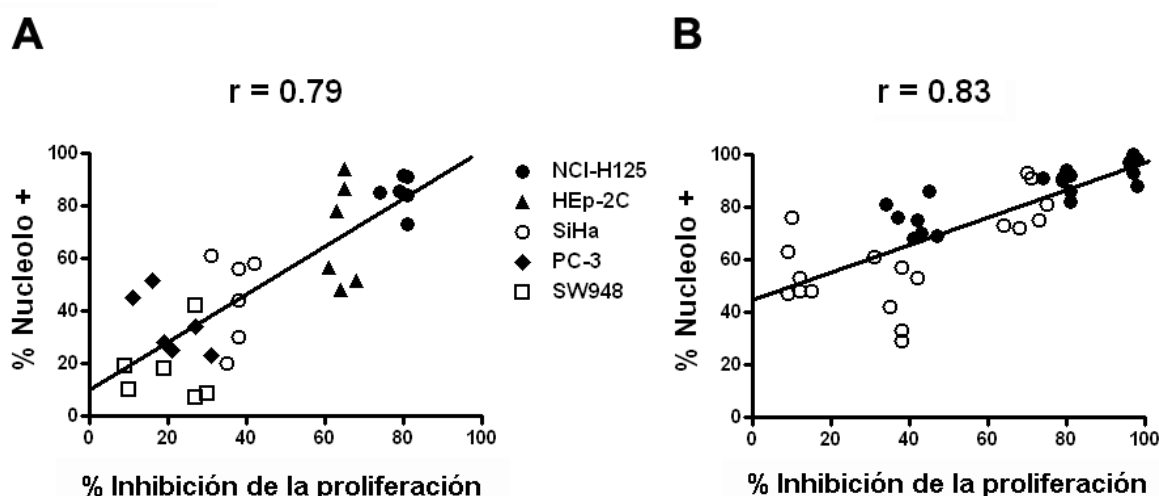


Figura 17. Correlación entre el porcentaje de células con señal nucleolar (% nucleólo+) y el efecto antiproliferativo del péptido CIGB-300 en células tumorales. (A) La inhibición de la proliferación (%) que ejerce la concentración de 100 μM de CIGB-300 en las cinco líneas celulares se determinó a partir de las curvas dosis-respuesta correspondientes (Figura 3A) y se correlacionó mediante una prueba de correlación de Spearman con el % nucleólo+ estimado a idéntica concentración del conjugado CIGB-300-F (100 μM , 10 min). (B) Correlación entre el % de inhibición de la proliferación celular que ejercen las concentraciones de 50, 100 y 200 μM de CIGB-300 en las líneas celulares NCI-H125 y SiHa y el % nucleólo+ a iguales concentraciones de conjugado CIGB-300-F (10 min). La significación estadística en ambas correlaciones fue $p < 0,001$; r, coeficiente de correlación de Spearman.

4.3.3 Evaluación del efecto antiproliferativo, la deposición nuclear y la inhibición de la fosforilación *in vivo* de una variante de péptido CIGB-300 conjugada a ácido decanoico

Con el objetivo de corroborar la relevancia del proceso de internalización para el efecto biológico del CIGB-300, se evaluó la potencia antiproliferativa de una variante del péptido que incluye una molécula de ácido decanoico acoplada al extremo N-terminal del PPC (L-

CIGB-300). Adicionalmente, se determinó el efecto sobre la proliferación celular de tres moléculas derivadas del CIGB-300 que presentan modificaciones en la secuencia correspondiente al PPC (PPCmut-P15, L-PPCmut-P15) o que carecen de PPC (PPC-) (**Figura 18, Tabla 2**).

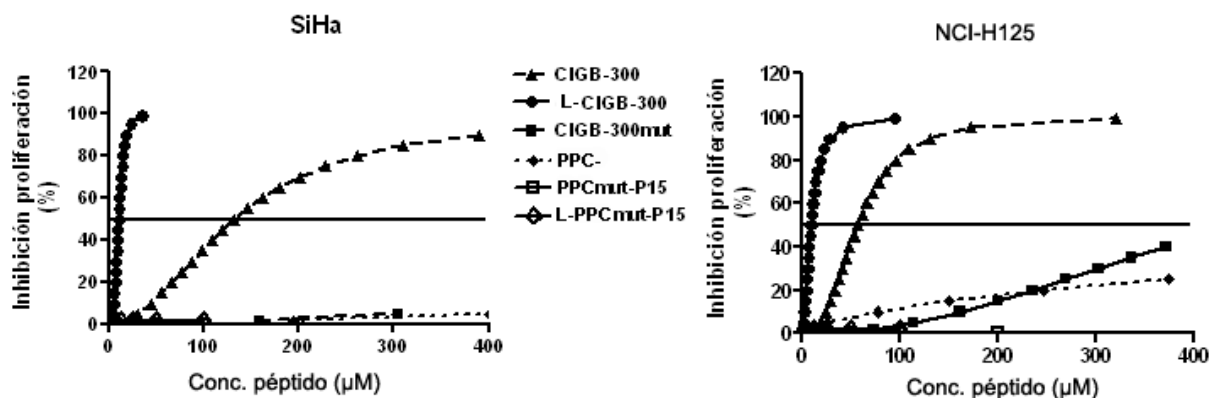


Figura 18. Curvas dosis-respuesta representativas del efecto antiproliferativo ejercido por el CIGB-300 y moléculas derivadas en las líneas celulares NCI-H125 y SiHa. Las curvas se generaron empleando el programa CalcuSyn a partir de los datos de inhibición de la proliferación obtenidos del ensayo de sulforrodamina B descrito en el acápite 3.3.

El efecto antiproliferativo del L-CIGB-300 fue 6 y 12 veces superior al registrado para el péptido CIGB-300 en las células tumorales NCI-H125 y SiHa, respectivamente. Las tres restantes moléculas derivadas del CIGB-300 no inhibieron significativamente la proliferación celular a concentraciones inferiores a 400 µM, mientras que la variante mutada CIGB-300mut produjo aproximadamente un 45% de inhibición en la línea celular NCI-H125 a dicha concentración (**Figura 18, Tabla 2**).

Tabla 2. Secuencia y potencia antiproliferativa de moléculas derivadas del CIGB-300 en las líneas celulares NCI-H125 y SiHa.

Molécula	Secuencia	Línea celular	
		NCI-H125	SiHa
CIGB-300	GRKKRRQRRRFPQ-βA-CWMSPRHLGTC	59 ± 4	134 ± 3
L-CIGB-300	CH3 (CH2) 8CO-GRKKRRQRRRFPQ-βA-CWMSPRHLGTC	10 ± 0	11 ± 2
CIGB-300mut	GRKKRRQRRRFPQ-βA-CAMSPRHAGTC	>400	>> 400
PPC-	(AG) 6-βA-CWMSPRHLGTC	> 400	>> 400
PPCmut-P15	GRKEGGAERRFPQ-βA-CWMSPRHLGTC	>> 400	>> 400
L-PPCmut-P15	CH3 (CH2) 8CO-GRKEGGAERRFPQ-βA-CWMSPRHLGTC	>> 100	>> 100

Los valores de potencia o CI_{50} corresponden a la media±DE (µM) (Anexo 2).

Para determinar si el aumento de la potencia antiproliferativa del L-CIGB-300 pudiera estar asociado con un mayor depósito nuclear, se analizó la localización nuclear o citosólica del péptido CIGB-300 y el L-CIGB-300 radiomarcados con Tc99 mediante experimentos de fraccionamiento subcelular. La cuantificación del depósito de los radiopéptidos en cada una de las fracciones evidenció que el L-CIGB-300 se acumula de manera más eficiente en el núcleo celular con relación al citoplasma (relación FN/FC) incluso a concentraciones cinco veces inferiores a las utilizadas para el CIGB-300 (**Figura 19A y B**).

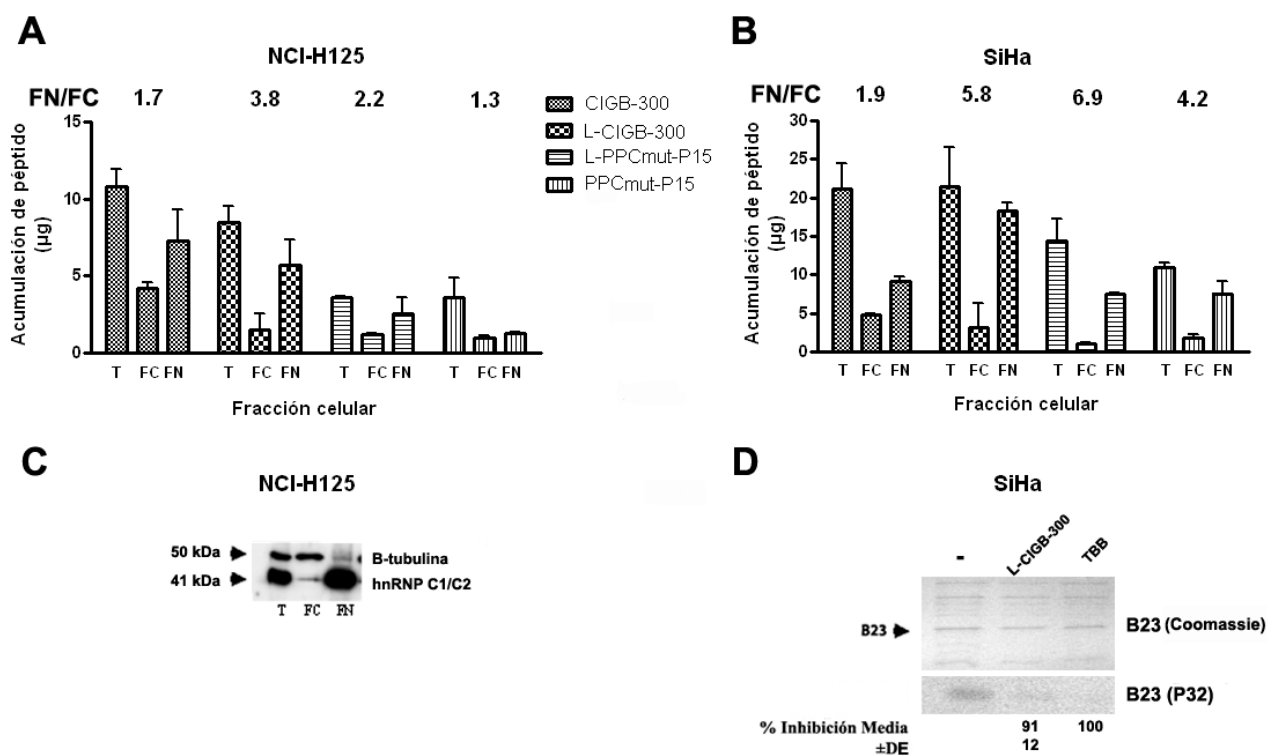


Figura 19. Cuantificación de la acumulación del CIGB-300 y moléculas derivadas en la fracción nuclear o citosólica de células NCI-H125 (A) y SiHa (B) después de 10 min de incubación. Los péptidos se conjugaron a Tc99, se incubaron con las células correspondientes y se procedió a la obtención de las fracciones celulares y cuantificación de las cantidades de péptido utilizando la actividad específica para cada molécula (media±DE). Las variantes de radiopéptidos conjugadas a ácido decanoico se evaluaron a 20 µM mientras el resto de los radiopéptidos a 100 µM. Se muestra la relación entre el depósito en la fracción nuclear (FN) y en el citosol (FC) de los radiopéptidos. T, depósito intracelular total. Resultados representativos de dos experimentos independientes. (C) Análisis de la eficiencia en la separación de la FN y FC empleando como marcadores las proteínas hnRNPC1/c2 (FN) y β-tubulina (FC) en experimentos de WB. (D) Evaluación del efecto inhibitorio sobre la fosforilación de B23/NPM del péptido L-CIGB-300 (20 µM) y el inhibidor TBB (100 µM) después de 30 y 180 min de incubación, respectivamente.

En ambas líneas celulares, la relación entre el depósito FN/FC fue al menos dos veces superior para el L-CIGB-300 comparado con el péptido no modificado, mientras que la

cantidad total de radiopéptido acumulado en las células (T) fue similar. Por otra parte, la sustitución de cuatro residuos de aminoácidos en el PPC (PPCmut-P15, L- PPCmut-P15) disminuyó la acumulación intracelular de los péptidos entre un 30-60% cuando se compara con la molécula no mutada a concentraciones equivalentes (*i.e.* PPCmut-P15 vs CIGB-300; L- PPCmut-P15 vs L-CIGB-300). En correspondencia con el mayor depósito nuclear registrado para el L-CIGB-300 en la línea celular SiHa, la variante lipidada inhibió en más de un 90% la fosforilación de B23/NPM en experimentos de marcaje metabólico realizados a una concentración de L-CIGB-300 cinco veces inferior al CIGB-300 (20 vs 100 μ M) (**Figura 19D vs. Figura 14C**). En estas condiciones experimentales la acumulación del L-CIGB-300 en el núcleo celular fue dos veces superior a la registrada para el péptido no modificado (FN: 18 vs 9 μ g).

Finalmente, la mayor potencia antiproliferativa del L-CIGB-300 en las líneas celulares NCI-H125 y SiHa se correspondió con el incremento del efecto apoptótico para esta variante. El marcaje con AnnexV-F de las poblaciones celulares tratadas con el L-CIGB-300 evidenció un aumento entre un 10 y 17% en la exposición de fosfatidil-serina en las líneas celulares NCI-H125 y SiHa respectivamente, después de 30 min de incubación (**Figura 20**).

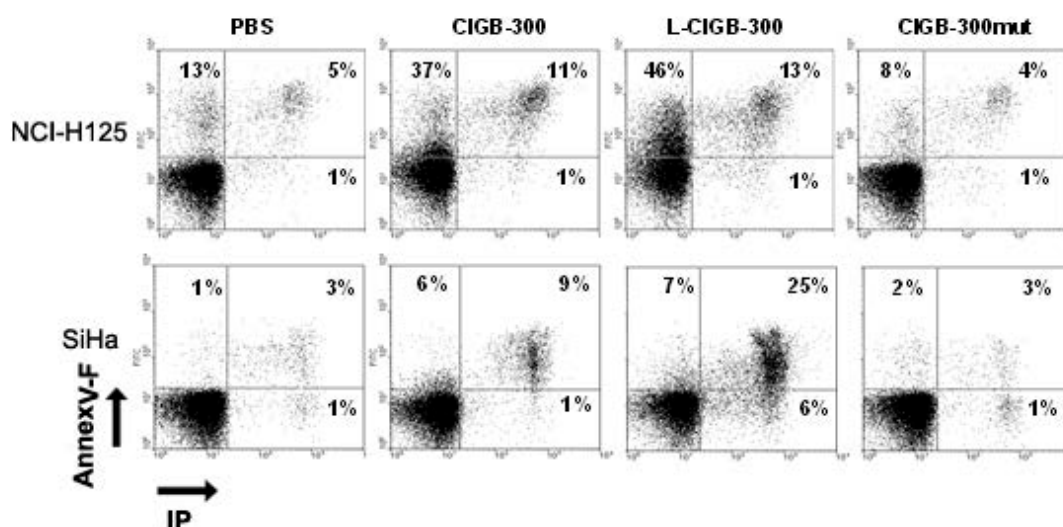


Figura 20. Inducción de apoptosis en células NCI-H125 y SiHa tratadas con el péptido L-CIGB-300 evidenciada mediante marcaje con AnnexV-F. Las células se trataron durante 30 min con 20 μ M de L-CIGB-300 o con 100 μ M del resto de los péptidos, se marcaron con AnnexV-F y se analizaron mediante citometría de flujo. Los gráficos y valores mostrados corresponden a un experimento representativo de dos experimentos independientes (dos réplicas cada uno). Se adquirieron 10 000 eventos por muestra.

4.4 Identificación de los procesos celulares afectados por el péptido CIGB-300 en células tumorales

4.4.1 Identificación de los genes regulados diferencialmente en presencia del péptido CIGB-300 en la célula tumoral NCI-H125

Con el propósito de identificar los procesos biológicos afectados por el péptido CIGB-300 se seleccionó la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H125 como modelo experimental y se analizaron los genes expresados diferencialmente empleando la metodología de hibridación substractiva por supresión (del inglés “SSH”). Como resultado de esta estrategia se obtuvo una biblioteca de 378 clones con insertos de ADNc de tamaños moleculares comprendidos en el rango entre 100-1600 pares de bases (**Anexo 7**). El análisis de las secuencias correspondientes permitió la identificación de 48 genes regulados diferencialmente en presencia del péptido CIGB-300 (**Anexo 8**). Entre dichos genes, 10 se encontraron representados por al menos cuatro clones diferentes en la biblioteca (4-24 clones), mientras que siete secuencias de ADN presentaron homología con proteínas hipotéticas sin nombre oficial asignado.

Para realizar la anotación funcional de los genes e identificar los procesos biológicos sobre-representados en la biblioteca SSH se empleó la herramienta de anotación funcional por agrupamiento (del inglés “*Functional Annotation Clustering*”) del programa DAVID. Aproximadamente la mitad de los genes identificados fueron agrupados en tres procesos biológicos (grupos 1-3) con puntuaciones de enriquecimiento superiores al valor de significación recomendado (1,3) (Huang y cols., 2009). De manera interesante, dichos genes participan directamente en la traducción de proteínas como componentes estructurales del ribosoma, en la síntesis mitocondrial del ATP y en la biogénesis ribosomal (**Figura 21, Anexo 9**).

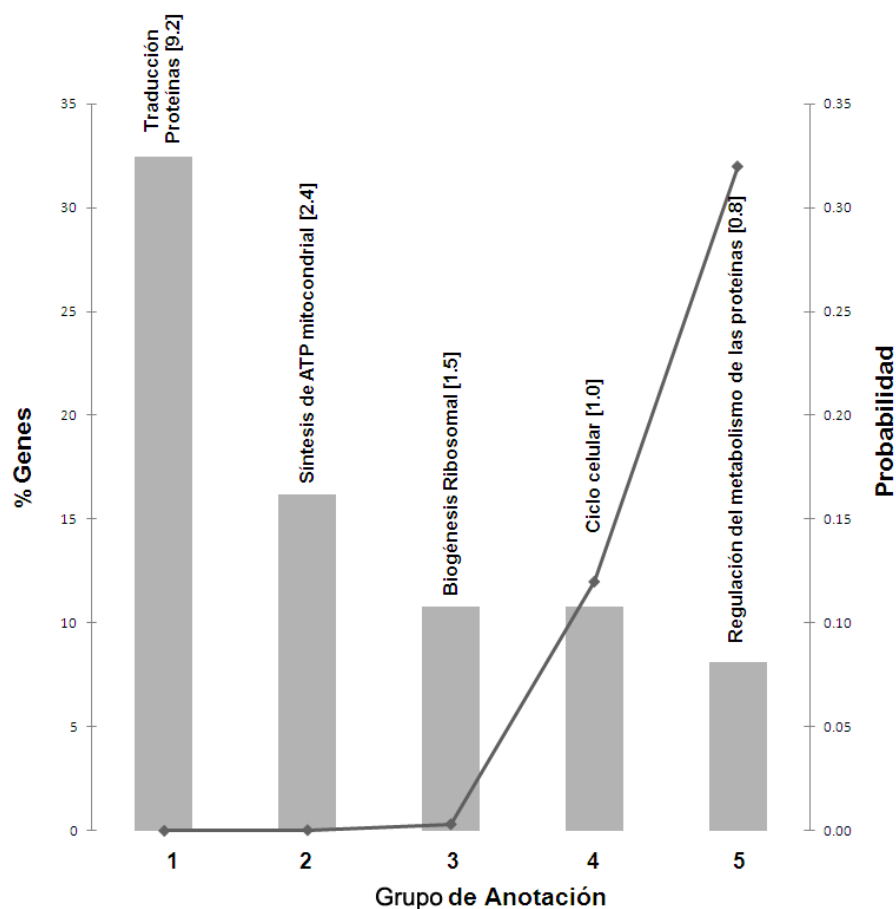


Figura 21. Procesos biológicos sobre-representados en la biblioteca SSH de acuerdo al análisis de anotación funcional por agrupamiento de los genes identificados (programa web DAVID). La línea se corresponde con el valor de probabilidad asignado a cada grupo de anotación. Un valor de $p < 0,1$ indica un agrupamiento significativo (prueba exacta de Fisher modificada). [9,2], puntuación de enriquecimiento de cada grupo en la anotación. Los valores superiores a 1,3 indican que en la lista de genes existe una mayor concurrencia hacia dicho término de anotación. % genes, % de genes incluidos en cada grupo del total de genes anotados.

4.4.2 Análisis de expresión y validación de genes regulados diferencialmente

Para corroborar los cambios en los niveles de ARNm correspondientes a los genes identificados mediante SSH, se seleccionaron nueve genes en representación de los cuatro primeros grupos de la anotación funcional y cinco genes involucrados en otros procesos biológicos y se analizaron mediante qPCR (**Figura 22**).

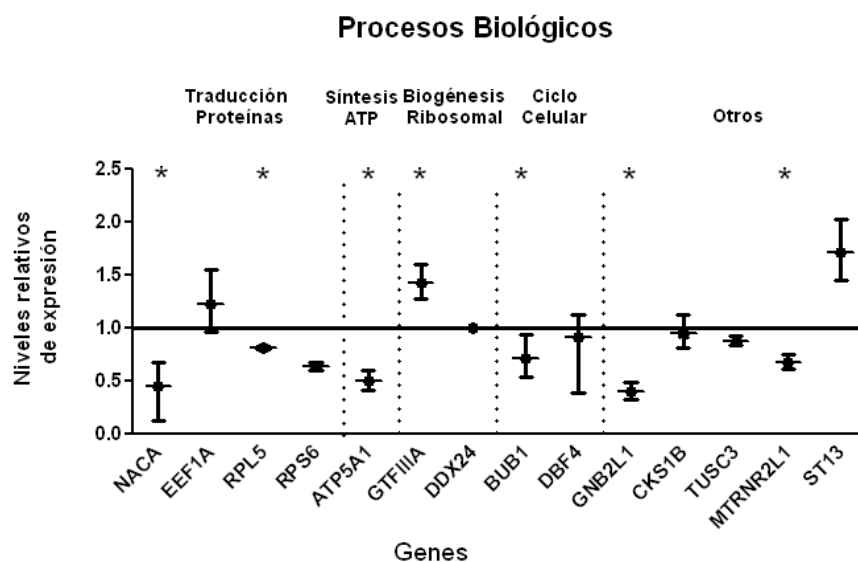


Figura 22. Análisis de expresión mediante qPCR de genes seleccionados en representación de los grupos 1-4 de la anotación funcional por agrupamiento (n=9) y otros procesos biológicos (n=5). Se muestran los cambios en los niveles relativos de ARNm correspondientes a cada gen después del tratamiento con el péptido CIGB-300 con relación a las células incubadas con PBS (media±EE). Se utilizaron los genes *ula* y *ywhaz* como genes de referencia para la determinación de los niveles relativos de expresión y el análisis estadístico mediante el programa REST. Los asteriscos denotan la significación estadística en los cambios observados ($p < 0,05$). Resultados representativos de tres experimentos independientes. EE, error estándar.

Los resultados mostraron cambios significativos en los niveles de ARNm correspondientes a siete de los 14 genes evaluados (*naca*, *rpl5*, *atp5A1*, *gtfIII A*, *bub1*, *gnb2l1*, y *mtrnr2l1*) (**Figura 22**). Para otros tres genes (*rps6*, *tusc3*, *st13*), solo se observó una tendencia al aumento o disminución después de incubar con el CIGB-300 en las mismas condiciones experimentales de generación de la biblioteca SSH. Finalmente, los niveles de ARNm correspondientes a seis de los siete genes con cambios significativos variaron consistentemente en magnitud y dirección en tres experimentos biológicos independientes (excepto *rpl5*).

4.4.3 Análisis de evidencias celulares y moleculares sobre la afectación de procesos biológicos relacionados con los genes identificados

Para evidenciar a nivel celular la afectación de los procesos biológicos de biogénesis ribosomal y traducción de proteínas se analizó la estructura nucleolar en células de cáncer de pulmón tratadas con el péptido CIGB-300 (**Figura 23**). Ambos procesos se identificaron como procesos sobre-representados en la biblioteca SSH y comparten un grupo de genes en la anotación (**Anexo 9**).

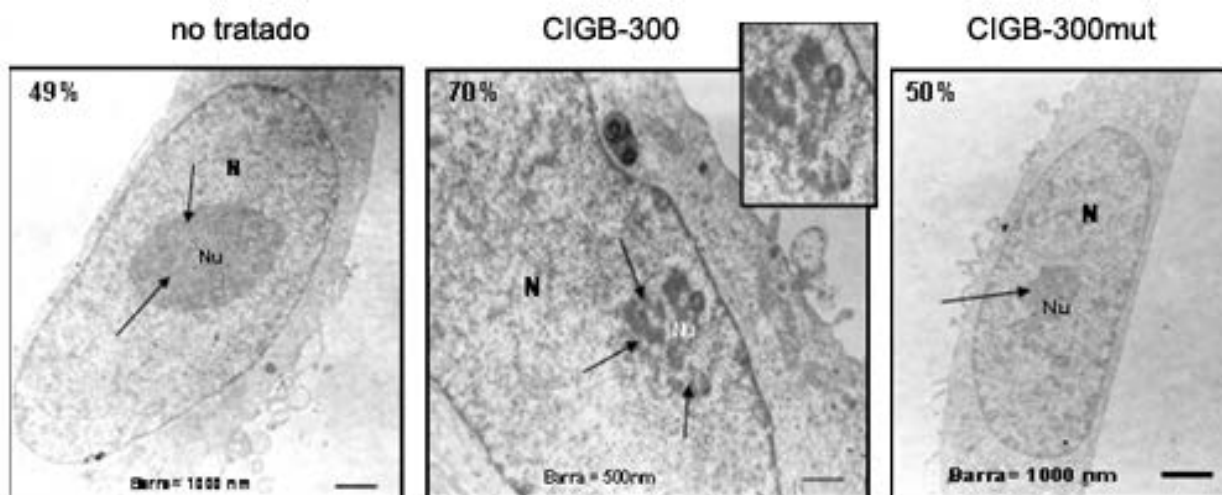


Figura 23. Análisis de la estructura nucleolar en células tumorales de pulmón incubadas con el péptido CIGB-300 mediante microscopía electrónica de transmisión. Observación al microscopio electrónico de la región nucleolar de células NCI-H125 incubadas durante 1 h con 100 μ M de CIGB-300 o CIGB-300mut. Se muestra el porcentaje de desensamblaje nucleolar estimado a partir del análisis de 20 microfotografías electrónicas por cada variante experimental. No tratado, células incubadas con PBS.

El análisis de la región nucleolar en las células NCI-H125 evidenció cambios significativos en la morfología y organización del nucléolo en aproximadamente un 20% de las células incubadas con el péptido CIGB-300 con relación a las células incubadas con PBS o idéntica concentración de CIGB-300mut. Dichos cambios consistieron en la pérdida de la apariencia compacta del nucléolo producto de la reorganización de sus componentes fibrilares y granulares, con regiones de menor densidad y contraste relativo hacia el interior del organelo.

Por otro lado, la fragmentación nucleolar inducida por el CIGB-300 en las células tumorales se verificó mediante la observación al microscopio confocal de marcadores moleculares típicos de la región granular (B23/NPM, fluorescencia roja) y fibrilar (fibrilarina, fluorescencia verde) del nucléolo. Ambos marcadores colocan en el nucléolo de las células tumorales NCI-H82 antes del tratamiento con el péptido (fluorescencia naranja), sin embargo en presencia del CIGB-300 se observó la segregación de las señales fluorescentes correspondientes a cada marcador, revelando la pérdida de la estructura compacta del nucléolo. Dicho efecto no se observó al evaluar el péptido control negativo F20-2 en idénticas condiciones experimentales (**Figura 24, panel superior**).

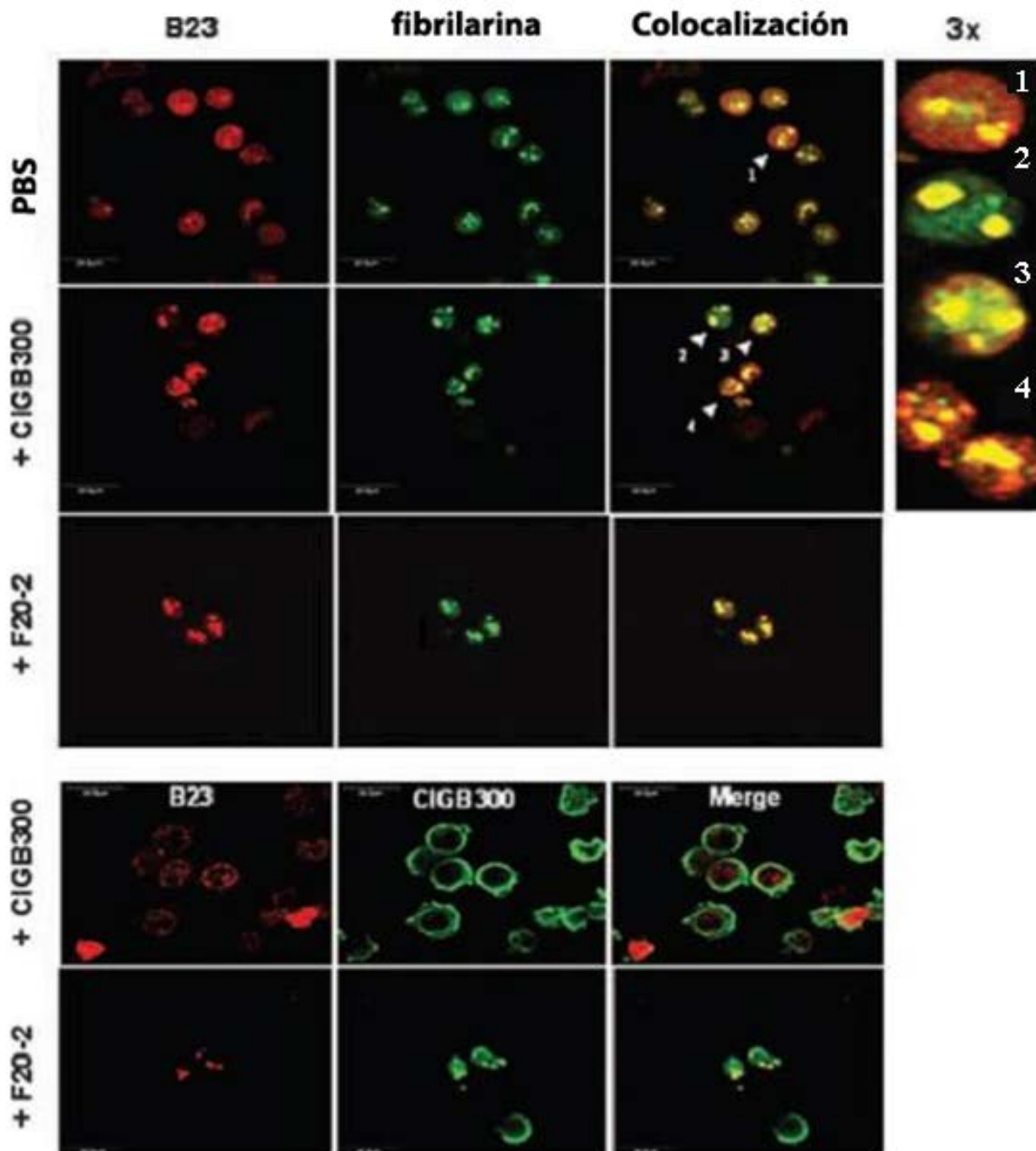


Figura 24. Evaluación del efecto del péptido CIGB-300 sobre la estructura nucleolar mediante microscopía confocal. Panel superior, colocalización típica B23-fibrilarina en el nucléolo de la célula tumoral (color naranja, flecha 1). La incubación con 200 μ M de CIGB-300 durante 30 min induce un cambio en la distribución de ambos marcadores (flechas de 2-4) evidenciado por la segregación de la fluorescencia roja (B23/NPM) y verde (fibrilarina) (magnificación 3X panel derecho). Panel inferior, localización de B23/NPM y el péptido CIGB-300 después del tratamiento con idéntica concentración durante 1 h. Los resultados obtenidos para el péptido control negativo F20-2 se muestran en ambos casos. Barra, 20 μ m.

Finalmente, el análisis de los experimentos de colocalización del CIGB-300 con B23/NPM evidenció que 1 h de incubación con idéntica concentración de péptido induce la total descomposición de la estructura nucleolar en la mayoría de las células cuando se emplea solamente el marcador B23/NPM como criterio de integridad nucleolar (**Figura 24, panel inferior**). En estos experimentos se observó la localización del CIGB-300 en la periferia del núcleo y un patrón punteado rojo dentro del mismo que pudiera corresponderse con la señal derivada de B23/NPM después de la desintegración nucleolar.

Para obtener evidencias moleculares directas del impacto del CIGB-300 sobre la biogénesis ribosomal, se analizaron los niveles de ARNr precursor mediante qPCR en células NCI-H125 incubadas con el péptido. El péptido CIGB-300 redujo de manera significativa los niveles del transcripto *45S ARNr* a los 30 min de incubación, evento que no fue observado en las células tratadas con el péptido control negativo CIGB-300mut en idénticas condiciones experimentales (**Figura 25**).

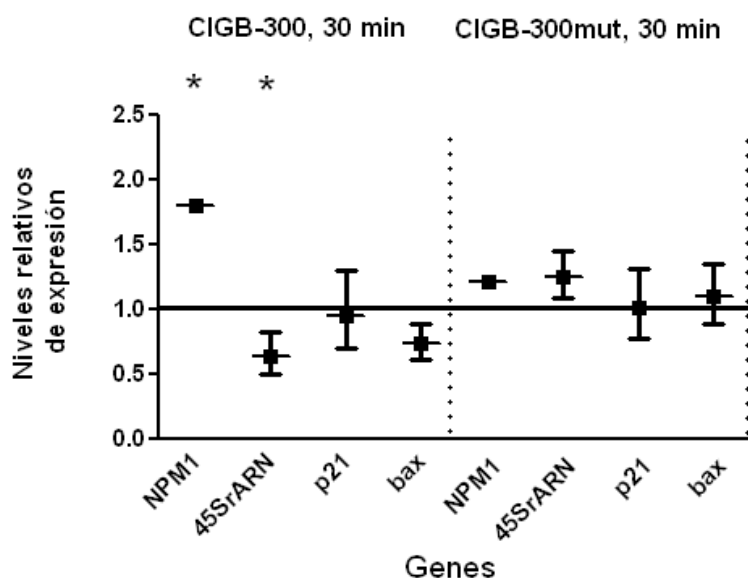


Figura 25. Análisis de expresión mediante qPCR de los ARNm o ARNr correspondientes a genes relacionados con la biogénesis ribosomal y la regulación del ciclo celular. Las células NCI-H125 se incubaron durante 30 min con 100 μ M de los péptidos CIGB-300 o CIGB-300mut y posteriormente se analizaron los cambios en los niveles relativos de expresión de los genes *npm1*, *45S ARNr*, *p21* y *bax* con relación a células incubadas con PBS (media \pm EE). Se utilizaron los genes *u1a* y *ywhaz* como genes de referencia para la determinación de los niveles relativos de expresión en cada condición experimental y el análisis estadístico mediante el programa REST. Los asteriscos denotan la significación estadística en los cambios observados ($p < 0,05$). EE, error estándar.

Por otra parte, el péptido CIGB-300 incrementó los niveles de ARNm correspondientes a su propio blanco molecular B23/NPM (*npm1*), aumento que no fue registrado cuando se incubó con su variante mutada CIGB-300mut. Finalmente, no se registró un aumento significativo en los niveles de ARNm de los genes *p21* y *bax* que contienen en su promotor elementos respuesta a la proteína supresora de tumores p53. Dicha proteína participa en un punto de control del ciclo celular que se activa cuando ocurre la afectación del proceso de biogénesis ribosomal en la célula (Opferman y Zambetti, 2006).

5. DISCUSIÓN

El CIGB-300 es una quimera peptídica diseñada con el objetivo de bloquear el evento de fosforilación catalizado por la enzima CK2 a través de su interacción directa con el sitio fosfoaceptor (Perea y cols., 2004). En este sentido, el péptido CIGB-300 constituye un nuevo tipo de molécula con acción farmacológica sobre la señalización catalizada por dicha enzima, que difiere de las estrategias terapéuticas más convencionales dirigidas a inhibir la actividad quinasa mediante interacción con las subunidades catalíticas o regulatorias de la enzima (Prudent y Cochet, 2009). Hallazgos preliminares demostraron que el péptido CIGB-300 es capaz de inhibir la proliferación *in vitro* de líneas celulares tumorales de pulmón (n=3) y cérvix (n=3) en ensayos de baja densidad celular (Perea y cols., 2004). Dicho péptido también ejerció un efecto antitumoral significativo cuando se inyectó directamente en el tumor en un modelo singénico de cáncer (Perea y cols., 2004). Sin embargo, las bases moleculares y celulares que explican el amplio efecto antineoplásico del péptido CIGB-300 en líneas celulares derivadas de diferentes tipos de tumores y en los modelos animales de cáncer necesitan ser esclarecidas.

Con el propósito de identificar dichas bases moleculares y celulares, primeramente se realizó la evaluación extensiva del efecto antineoplásico del péptido CIGB-300 *in vitro* en líneas celulares derivadas de tumores de sólidos e *in vivo* en modelos animales de cáncer basados en la inoculación de dichas células en ratones inmunocompetentes o atímicos. Los resultados obtenidos demostraron que el péptido CIGB-300 inhibe en el rango micromolar la proliferación de líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón (n=5), cérvix (n=4), colon (n=3) y próstata (n=3), cuando se emplea un ensayo estándar de alta densidad celular (Boyd, 1997). Entre las ventajas de este ensayo con relación al utilizado previamente por Perea y cols. (2004) se encuentran el ajuste de las densidades celulares iniciales al tiempo de doblaje de las poblaciones, la disminución del tiempo de incubación con la droga minimizando la citotoxicidad inespecífica y el empleo de un método colorimétrico estable basado en la tinción con sulforrodamina B (Monks y cols., 1991; Boyd, 1997). Además, dicho ensayo demostró ser predictivo de eficacia clínica para diferentes drogas anti-cáncer en análisis correlativos previos (Voskoglou-Nomikos y cols., 2003).

El efecto antitumoral del péptido CIGB-300 *in vivo* fue corroborado en los modelos animales singénico (TC-1) y de xenotransplante (NCI-H82, NCI-H125, SiHa) utilizando cuatro de las líneas celulares tumorales evaluadas *in vitro*. En ambos escenarios preclínicos, *in vitro* e *in vivo*, se demostró que el péptido CIGB-300 es capaz de inducir apoptosis en las células tumorales, inhibiendo la proliferación celular *in vitro* y retardando el crecimiento del tumor en los modelos animales. Además, resultó relevante la demostración robusta del efecto antitumoral del CIGB-300 en los modelos animales de xenotransplante ya que dichos modelos, y no los modelos singénicos de cáncer, han resultado predictivos de eficacia antitumoral en estudios clínicos fase II (Voskoglou-Nomikos y cols., 2003).

La caracterización del efecto antineoplásico del péptido CIGB-300 permitió seleccionar un subgrupo de seis líneas celulares con diferente fenotipo de respuesta (CI₅₀: 50-280 µM) y en representación de cuatro localizaciones tumorales (pulmón, cérvix, colon y próstata), con el objetivo de identificar las bases moleculares de su mecanismo de acción. Al mismo tiempo, dicha selección posibilitaría el análisis de las variables moleculares y/o celulares que pudieran explicar la diferente sensibilidad al péptido manifestada por las células tumorales *in vitro*.

Para la identificación de los blancos moleculares del péptido CIGB-300 se realizaron experimentos de interacción en solución o *pull-down* en una línea celular de marcada sensibilidad al péptido. Dicha metodología es ampliamente utilizada para la caracterización de interacciones moleculares *in vivo* (Zhang y cols., 2008). Los experimentos de *pull-down in vivo* permitieron la identificación de dos sustratos validados de la enzima CK2, B23/NPM y C23 (Meggio y Pinna, 2003), cuya principal localización subcelular es el nucléolo (Lischwe y cols., 1979; Biggiogera y cols., 1989). Sin embargo, experimentos de incubación con nucleasas de ARN previos al *pull-down* demostraron que solo la proteína B23/NPM interactúa directamente con el péptido CIGB-300 *in vivo*. Evidencias independientes de la interacción CIGB-300-B23/NPM se obtuvieron mediante microscopía confocal donde se observó la colocalización entre el péptido CIGB-300 y la proteína B23/NPM *in situ* en el contexto celular. La colocalización fue evidente en el nucléolo de la célula tumoral puesto que B23/NPM *per se* constituye un marcador nucleolar (Lischwe y cols., 1979). Además, este resultado se corresponde con que al menos 17 de las 20 proteínas identificadas en los

experimentos de *pull-down* se localizan en este compartimento celular (Andersen y cols., 2002).

Los resultados de los experimentos de inhibición de la fosforilación *in vitro* e *in vivo* validan a la proteína B23/NPM como blanco molecular del péptido CIGB-300 en la célula tumoral NCI-H82. La inhibición de la fosforilación *in vivo* ocurre de manera dosis-dependiente y se verificó transcurridos 30 min de incubación con el péptido, momento en que ambas moléculas interactúan de manera significativa de acuerdo a los resultados de los experimentos de *pull-down* y su colocalización *in situ* en la región nucleolar de la célula. La inhibición de la fosforilación en ambas condiciones de cultivo celular (10 y 0,2% SFB) fue similar, hallazgo que corrobora que el evento de fosforilación catalizado por la enzima CK2 sobre B23/NPM es mayoritario con relación al resto de los eventos catalizados por las CDKs (Chan y cols., 1990; Jiang y cols., 2000).

Por otra parte, experimentos subsiguientes de *pull-down in vivo* e inmunodetección de B23/NPM en líneas celulares de diferente origen y fenotipo de respuesta al CIGB-300, permitieron corroborar a B23/NPM como blanco molecular del péptido en células tumorales diversas. En dichos experimentos se utilizaron dosis equipotentes de CIGB-300 con el objetivo de demostrar la interacción CIGB-300-B23/NPM y evaluar su repercusión sobre la fosforilación y viabilidad de las células tumorales. Los experimentos de marcaje metabólico indicaron que el péptido CIGB-300 inhibe la fosforilación de B23/NPM en las cinco líneas celulares, aunque en HEP-2C y SW948 una menor inhibición fue registrada solamente después de incubar 2 h con el péptido. Adicionalmente, el empleo de una concentración de CIGB-300 que produce un efecto antiproliferativo distinto en las líneas celulares NCI-H125 (CI₈₀) y SiHa (CI₄₀), se correspondió con un nivel diferente de inhibición de la fosforilación de B23/NPM. Dichos hallazgos sugieren la posible relación directa entre la dosis de péptido, la inhibición de la fosforilación, y el nivel de efecto antiproliferativo, similar a la observada en la línea celular NCI-H82. Sin embargo, los resultados del marcaje metabólico también revelan una dependencia del tiempo de incubación o factor cinético para la inhibición de la fosforilación (*e.g.* HEP-2C, SW948).

La rápida cinética de interacción del péptido CIGB-300 con el blanco molecular B23/NPM y la subsiguiente inhibición de su fosforilación, se corresponden con la temprana inducción de apoptosis en las células tumorales. De manera interesante, en las líneas celulares HEp-2C y SW948 se documentó este fenómeno transcurridos los 30 min de incubación con el péptido, momento en que aun no se registra inhibición de la fosforilación de B23/NPM. Sin embargo, dichas células resultaron particularmente sensibles a la incubación con Tat en ensayos antiproliferativos realizados para evaluar la citotoxicidad del PPC *per se*, hallazgo que pudiera explicar la inducción temprana de apoptosis en ausencia de inhibición de la fosforilación. El efecto citotóxico de los PPCs ha sido asociado con la desestabilización de las membranas celulares a elevadas concentraciones ($> 100 \mu\text{M}$) y su magnitud generalmente varía con la estirpe celular (Jones y cols., 2005).

La evaluación del impacto del CIGB-300 sobre el ciclo celular indicó que el péptido a dosis equipotentes también afecta la distribución de la población en las diferentes fases del ciclo celular. Dicho efecto se verificó fundamentalmente después de 5 h de incubación con el péptido, evidenciándose la relación causa-efecto entre la inhibición de la fosforilación de B23/NPM (30-120 min) y el arresto en una fase particular del ciclo celular (5 h). La acumulación de las poblaciones celulares en diferentes fases del ciclo celular pudiera estar asociada con la relevancia particular del evento de fosforilación en cada contexto celular, el estatus de proteínas supresoras de tumores (Montanaro y cols., 2007), y/o de las vías de señalización asociadas a los mecanismos de control del ciclo celular (Viallard y cols., 2001). De conjunto, el impacto sobre el ciclo celular y la supervivencia celular permiten explicar el efecto inhibitorio del péptido CIGB-300 sobre la proliferación celular *in vitro*.

La cinética y magnitud de internalización del péptido CIGB-300 se corresponde con resultados antes descritos sobre la eficiencia del proceso de penetración de los PPCs en estirpes celulares diversas (Polyakov y cols., 2000; Hallbrink y cols., 2001; Suzuki y cols., 2002; Richard y cols., 2003). Sin embargo, para que se manifieste el efecto inhibitorio del cargo las concentraciones de péptido deben ser suficientes para alcanzar de manera efectiva el blanco molecular venciendo las dos principales barreras celulares adscritas a los PPCs: el escape vesicular y su estabilidad intracelular (Patel y cols., 2007). Las particularidades del proceso de internalización de los PPCs imponen una gran heterogeneidad al proceso de

entrada y por tanto pudieran explicar las diferencias observadas en la capacidad del CIGB-300 de inhibir la proliferación de estirpes celulares diversas. Para el péptido CIGB-300 se obtuvo una correlación directa entre la localización nucleolar (principal localización del blanco molecular B23/NPM) y su potencia antiproliferativa en las cinco líneas celulares estudiadas. Dicha localización subcelular está directamente asociada a la concentración de CIGB-300 de acuerdo a los resultados obtenidos en las líneas celulares NCI-H125 y SiHa. La relación concentración-deposición nucleolar pudiera explicar el por qué algunas líneas como SiHa, SW948, y PC-3 necesitan mayores concentraciones de péptido para alcanzar la CI_{50} .

Con el propósito de verificar la relevancia del proceso de internalización para el efecto biológico del CIGB-300, el péptido se conjugó a ácido decanoico. El acoplamiento de moléculas de naturaleza lipídica con una longitud de cadena variable (*i.e.* C8-C16) se utilizó anteriormente para aumentar la eficiencia de internalización de cargos conjugados a PPCs (Wang y cols., 2000; Koppelhus y cols., 2008; patente WO 2008/043366). Dicho aumento está asociado a la capacidad del lípido de atravesar las membranas biológicas, promoviendo el escape endosomal y/o la translocación directa a través de las membranas celulares (Koppelhus y cols., 2008; Katayama y cols., 2011). En correspondencia con estos hallazgos, la acumulación intracelular del L-CIGB-300 fue superior al péptido no modificado, dicha molécula se depositó preferencialmente en la fracción nuclear y manifestó un mayor efecto inhibitorio sobre la fosforilación de B23/NPM y la proliferación celular. A pesar de que el protocolo de fraccionamiento empleado no permitió aislar los nucléolos celulares para analizar la posible localización preferencial del L-CIGB-300 en dicho compartimento, la evaluación de la molécula modificada si corroboró de manera independiente que las principales barreras celulares que limitan la disponibilidad del CIGB-300 para interactuar con su blanco molecular B23/NPM se encuentran en el citoplasma.

La evaluación del efecto antiproliferativo de las variantes peptídicas que presentan mutaciones en el PPC no solo permitió corroborar la relevancia del elemento penetrador para la internalización del péptido CIGB-300, sino que además confirma de manera indirecta el papel de B23/NPM como principal blanco molecular del CIGB-300 en células tumorales. Los amino ácidos reemplazados en la secuencia del Tat participan en la interacción directa de dicho PPC con B23/NPM (Li, 1997). Por tanto, en la línea celular SiHa el fallo en la

interacción de las variantes mutadas del CIGB-300 con B23/NPM pudiera explicar el por qué la ausencia de efecto antiproliferativo para estas variantes aún cuando se obtienen similares depósitos nucleares. La identificación de la proteína B23/NPM como blanco molecular del CIGB-300 en dichas células argumenta la importancia del estudio de las bases moleculares del mecanismo de acción del péptido aun en células tumorales que expresan la proteína sustrato modelo E7 (Scheffner y cols., 1991).

El estudio previo del perfil proteómico modulado por el CIGB-300 en la línea celular NCI-H125 evidenció que el tratamiento con el péptido cambia de manera significativa los niveles de un conjunto de 137 proteínas relacionadas con los procesos biológicos de traducción de proteínas (23%), la organización del citoesqueleto (18%), procesamiento de los ARN (11%) y la apoptosis celular (7%) (Rodríguez-Ulloa y cols., 2010). Similar resultado se obtuvo a nivel de expresión génica a partir del análisis de los genes regulados diferencialmente en presencia del CIGB-300 mediante la metodología de SSH. La anotación funcional por agrupamiento de dichos genes evidenció que la traducción de proteínas constituye el proceso biológico más regulado (33%), mientras que el metabolismo energético mitocondrial (14%) y la biogénesis ribosomal (12%), también se identificaron como procesos sobre-representados de manera significativa en la biblioteca SSH.

La validación de los cambios en los niveles de ARNm mediante qPCR evidenció que 6/7 genes incluidos en estas tres categorías aumentan o disminuyen en presencia del CIGB-300. Dos de los genes que se modularon significativamente codifican para proteínas que están involucradas en la traducción de proteínas y la biogénesis ribosomal, respectivamente. NACA (del inglés “*Nascent-polypeptide-Associated Complex*”) es una proteína que se une de manera transiente a los polipéptidos que emergen del ribosoma hasta que se expone completamente el péptido señal para ser reconocido por la partícula de reconocimiento de la señal (del inglés “*Signal Recognition Particle*”). NACA funciona como una proteína adaptadora que media la interacción correcta entre la proteína naciente del ribosoma, la maquinaria de plegamiento y el transporte intracelular (Wiedmann y cols., 1994). La disminución del transcripto correspondiente a *naca* y eventualmente de la proteína para la cual codifica, pudiera reflejar la disminución global de la biosíntesis de proteína como resultado del efecto del CIGB-300 sobre la biogénesis ribosomal. En cambio, el incremento en los niveles del ARNm

correspondiente al gen *gtfIIIa* pudiera interpretarse como la manifestación de un mecanismo compensatorio de retroalimentación positiva que se activa cuando se compromete el proceso de biogénesis ribosomal en la célula. El factor transcripcional general GTFIIIA forma parte del complejo de transcripción de la ARN polimerasa III que conjuntamente con los factores transcripcionales TFIIC and TFIIB transcribe el ARN ribosomal 5S componente de la subunidad mayor del ribosoma (Weser y cols., 2003).

Por otra parte, los niveles de ARNm correspondientes al gen *atp5a1* que codifica para la subunidad alfa del componente catalítico soluble F1 de la ATP sintetasa en la mitocondria, disminuyeron significativamente en las células tratadas con el péptido CIGB-300. Entre los genes regulados diferencialmente en presencia de dicho péptido también se identificó la subunidad 6 del componente F0 o canal de protones de la ATP sintetasa (*atp6*), así como cinco genes que codifican para diferentes componentes de la cadena de fosforilación oxidativa mitocondrial, sugiriendo una posible regulación sobre el metabolismo energético mitocondrial. Dicha regulación pudiera resultar del propio efecto del péptido sobre la biogénesis ribosomal, un proceso que consume cerca del 80% de la energía en la célula y que por tanto se encuentra estrictamente regulado a nivel transcripcional (Lewis y Tollervey, 2000; Leary y Huang, 2001), o simplemente ser consecuencia directa de la activación de la vía intrínseca de apoptosis por el péptido CIGB-300 (George y cols., 2010).

El análisis de la estructura nucleolar mediante microscopía electrónica y confocal, aportó las primeras evidencias celulares directas sobre la afectación del proceso de biogénesis ribosomal en las células incubadas con el péptido CIGB-300. La estructura compacta del nucléolo es solo visible cuando la transcripción de los ARNr está activa, puesto que el nucléolo es una estructura altamente dinámica conformada por la concurrencia temporo-espacial de factores moleculares sobre los genes que codifican para los ARNr (Melese y cols., 1995; Lewis y Tollervey, 2000; Olson y cols., 2002). Por tanto, la pérdida de dicha estructura compacta en presencia del CIGB-300 indica la afectación del proceso de biogénesis ribosomal en la célula. La repercusión sobre la estructura nucleolar de la inhibición farmacológica de la fosforilación de B23/NPM coincide con hallazgos previos que evidenciaron que la sustitución del residuo fosfoaceptor para la enzima CK2 en B23/NPM (Ser-125-Ala) resulta en una proteína deficiente en mantener la estructura nucleolar (Louvet y cols., 2006). En dichas células

también se registró una inhibición dosis-dependiente de la transcripción del ARNr precursor *45S ARNr* como evidencia directa de la afectación de la biogénesis ribosomal.

En correspondencia con los hallazgos a nivel celular, la cuantificación de los niveles de ARNr precursor (*45S ARNr*) en las células tumorales tratadas con el CIGB-300 aportó evidencias moleculares directas del impacto del péptido sobre la biogénesis ribosomal. La transcripción del *45S ARNr* por la enzima Pol I constituye un paso limitante que determina la velocidad de síntesis del resto de los componentes ribosomales mediante la acción coordinada con las polimerasas Pol II y Pol III, por lo que una disminución significativa de dicho transcripto refleja la afectación global del proceso de biogénesis ribosomal (Michels y Hernandez, 2006; Laferté y cols., 2006; Chedin y cols., 2007). La disminución del transcripto *45S ARNr* pudiera ser explicada por la formación de un agregado molecular B23/NPM-C23-ARNr deficiente en la remoción de las histonas sobre los genes que codifican para el ARNr y por tanto en el mantenimiento de una estructura en la cromatina favorable para su transcripción por la enzima Pol I (Okuwaki y cols., 2001; Murano y cols., 2008). Las proteínas B23/NPM y C23 se han identificado previamente en experimentos de interacción recíproca (Li y cols., 1996; Liu y Yung, 1999; Piñol-Roma, 1999; Yu y cols., 2006; Maggi y cols., 2008) y se conoce que forman parte de complejos moleculares de remodelación de la cromatina (Angelov y cols., 2006).

Por otra parte, se registró un aumento en los niveles del transcripto correspondiente a *npm* en las células tumorales incubadas con el péptido CIGB-300. Dicho hallazgo sugiere la existencia de un mecanismo de retroalimentación que a través de la inducción de la expresión de B23/NPM tiende a compensar el efecto inhibitorio del péptido sobre su blanco molecular. Mecanismos de retroalimentación similares se han descrito anteriormente para drogas con blancos moleculares diversos y pudiera manifestarse hasta en un 8% de todas las drogas (Iskar y cols., 2010). Sin embargo, en el caso particular del péptido CIGB-300 el incremento en los niveles de *npm* registrado en la línea celular NCI-H125 no se corresponde con un aumento en los niveles de la proteína, sino que por el contrario, la incubación con idéntica dosis de péptido disminuyó los niveles intracelulares de B23/NPM (Rodriguez-Ulloa y cols., 2010).

Las funciones celulares descritas para B23/NPM, los genes y proteínas regulados diferencialmente en presencia del péptido, y las evidencias moleculares y celulares contenidas en el presente documento, argumentan que el CIGB-300 a través de la interacción con el blanco molecular afecta el proceso de biogénesis ribosomal en la célula tumoral. Hallazgos previos involucran a la proteína B23/NPM en cuatro etapas diferentes de la biogénesis ribosomal: la maduración de los transcriptos primarios (Herrera y cols., 1995), el plegamiento de las proteínas estructurales ribosomales (Szebeni y Olson, 1999), el transporte núcleo-citoplasma de las subunidades ribosomales (Yu y cols., 2006; Maggi y cols., 2008) y la regulación de la transcripción del ARNr (Murano y cols., 2008). De manera interesante, la actividad chaperona de B23/NPM parece estar involucrada directa o indirectamente en las tres últimas etapas (Hingorani y cols., 2000). Dicha actividad chaperona es regulada mediante ciclos de fosforilación (CK2) y des-fosforilación (proteína fosfatasa) que modulan la afinidad de B23/NPM por sus sustratos (Szebeni y cols., 2003). Por tanto, la inhibición de la fosforilación catalizada por la enzima CK2 sobre B23/NPM pudiera afectar simultáneamente diferentes etapas de la biogénesis ribosomal a través de su impacto negativo sobre la actividad chaperona de B23/NPM.

Una evidencia experimental adicional de la afectación de la actividad chaperona de B23/NPM y su impacto sobre la biogénesis ribosomal constituye la acumulación en la fracción nuclear de células NCI-H125 incubadas con el péptido CIGB-300 de un conjunto de proteínas estructurales que forman parte de ambas subunidades ribosomales (Rodríguez-Ulloa y cols., 2010). B23/NPM opera como chaperona molecular que asiste en la exportación nuclear de las subunidades ribosomales a través de la interacción de su señal NES con el receptor del poro nuclear CRM1 (Trotta y cols., 2003; Yu y cols., 2006; Maggi y cols., 2008). Por tanto, la inhibición de la fosforilación de B23/NPM por la enzima CK2 pudiera afectar dicho proceso de transporte, dando lugar a la acumulación de las proteínas estructurales ribosomales observada en los experimentos de proteómica (Rodríguez-Ulloa y cols., 2010).

La ruptura del equilibrio dinámico en la interacción B23/NPM-sustrato como consecuencia de la inhibición de la actividad chaperona por el péptido CIGB-300 no solo afectaría directamente la biogénesis ribosomal, sino que además comprometería el funcionamiento de B23/NPM como superficie de interacción o estabilización de agregados moleculares.

B23/NPM es considerada un nodo molecular dinámico que a través de interacciones transientes garantiza la residencia temporo-espacial de diversos sustratos en las localizaciones adecuadas para sus funciones celulares, contribuyendo al mismo tiempo al mantenimiento de la estructura dinámica del nucléolo (Emmott y Hiscox, 2009). De manera interesante, la dinámica nuclear de B23/NPM parece depender considerablemente del evento de fosforilación catalizado por la enzima CK2 sobre el residuo Ser-125. La sustitución del residuo fosfoceptor en B23/NPM (Ser-125-Ala) y la subsiguiente medición de su movilidad nucleolar mediante experimentos de FRAP (del inglés “*Fluorescence Recovery After Photobleaching*”) evidenció que la población de moléculas mutantes para el sitio fosfoceptor requiere el doble del tiempo para restablecerse (40 s) con relación a las moléculas de B23/NPM nativas (20 s) (Negi y Olson, 2006). En correspondencia con el valor estimado para B23/NPM las poblaciones de moléculas con actividades funcionales en la biogénesis ribosomal son altamente dinámicas con tiempos de recobrado entre los 8-20 s (Chen y Huang, 2001). Por tanto, considerando que en una célula en activa proliferación aproximadamente 7500 subunidades ribosomales/min necesitan ser exportadas hacia el citoplasma, la afectación incluso transiente de este equilibrio dinámico para un nodo molecular como B23/NPM pudiera tener consecuencias drásticas para la fisiología de la célula tumoral (Louvet y cols., 2006).

La **Figura 26** resume en un modelo hipotético los principales eventos asociados al mecanismo de acción del péptido CIGB-300 en células tumorales. Dicho modelo integra los hallazgos experimentales del presente trabajo que incluyen la identificación de B23/NPM como principal blanco molecular del péptido, el impacto de la inhibición de su fosforilación sobre la biogénesis ribosomal, y la relevancia del proceso de internalización para el efecto antineoplásico del CIGB-300, así como los conocimientos previos sobre los PPCs, las funciones de B23/NPM en la biogénesis ribosomal y el papel de la fosforilación catalizada por CK2 en su actividad chaperona.

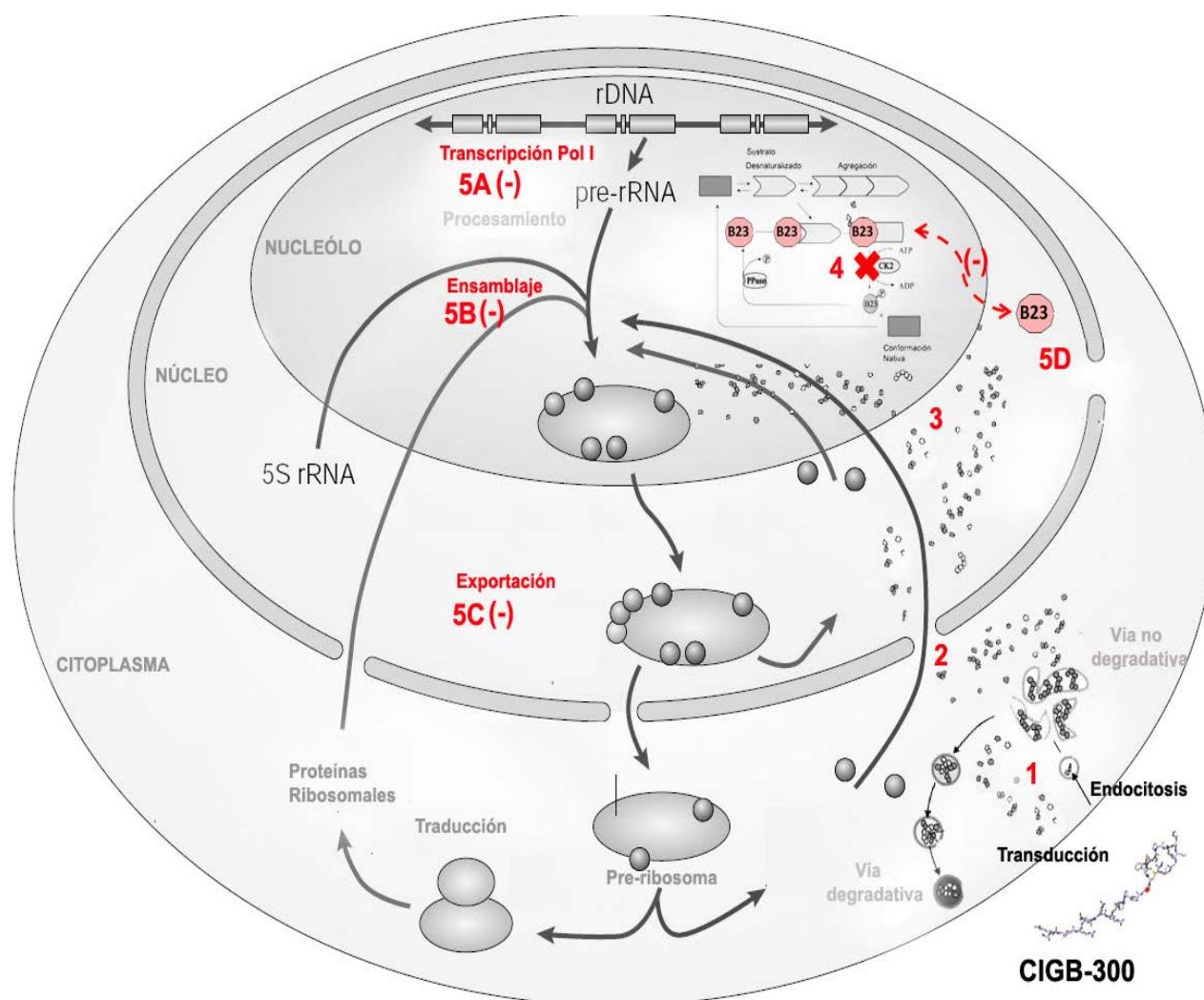


Figura 26. Modelo hipotético que resume los principales eventos asociados al mecanismo de acción del péptido CIGB-300 en células tumorales. 1, internalización del CIGB-300 mediante diferentes procesos de endocitosis o transducción directa de las membranas celulares (1-10 min); 2, paso a través del poro nuclear (3-10 min); 3, difusión en el núcleo/nucleólo (3-10 min); 4, interacción con el blanco molecular B23/NPM e inhibición de la fosforilación (10-120 min); 5, repercusión sobre las diferentes etapas de la biogénesis ribosomal de manera directa 5A-C o como resultado de la afectación de la dinámica nuclear de B23/NPM 5D (>30 min). Dicha secuencia de eventos conduce a la muerte celular por apoptosis y/o arresto en el ciclo celular (30min-6 h). El efecto del péptido CIGB-300 sobre la supervivencia y la división celular explica la inhibición de la proliferación celular observada a las 48 h.

La biogénesis ribosomal es un proceso biológico que demanda gran cantidad de recursos celulares y energía, por lo que se encuentra estrictamente regulada a diferentes niveles como la transcripción, el procesamiento del ARNr, el ensamblaje de las subunidades y el tráfico nuclear (Leary y Huang, 2001). La proteína supresora de tumores p53 participa en un punto de control del proceso que se activa cuando se afecta una de sus etapas o ante situaciones de

estrés nucleolar en la célula (Opferman y Zambetti, 2006; Deisenroth y Zhang, 2010). La activación del punto de control de la biogénesis ribosomal se inicia con el incremento en los niveles intracelulares de p53, desencadenando un conjunto de eventos moleculares que conducen finalmente al arresto en el ciclo celular o la apoptosis (Pestov y cols., 2001; Rubbi y Milner, 2003; Fumagalli y cols., 2009). En nuestras condiciones experimentales no fue posible detectar a la proteína p53 mediante WB ni tampoco se evidenció el incremento de sus niveles intracelulares cuando se utilizaron como marcadores de activación dos de los genes que contienen elementos respuesta a p53 en la línea celular NCI-H125 (*i.e.* *p21* y *bax*) (Feudis y cols., 2000). Sin embargo, dicho hallazgo probablemente esté relacionado con la ausencia de actividad transcripcional de p53 en esta línea celular y no a un “fallo” en la estabilización de la proteína en presencia del péptido CIGB-300 (Mitsudomi y cols. 1992). Además, estos resultados coinciden con la ausencia de arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular en las células NCI-H125 incubadas con CIGB-300.

De manera interesante, en cinco de las seis líneas celulares estudiadas el gen *p53* se encuentra deletado/mutado (Isaacs y cols., 1991; Mitsudomi y cols. 1992; Liu y Bodmer, 2006) o los niveles intracelulares de la proteína están disminuidos por la presencia de la proteína oncogénica E7 (Scheffner y cols., 1991; Kim y cols., 1993). Sin embargo, aun en células tumorales donde la funcionalidad de p53 está comprometida la afectación de la biogénesis ribosomal conduce a la muerte celular por apoptosis (Montanaro y cols., 2007). De confirmarse la no asociación entre el efecto antiproliferativo del péptido CIGB-300 y el estatus del gen *p53* representaría una ventaja importante para el CIGB-300 como compuesto terapéutico si tomamos en consideración que dicho gen se encuentra mutado en el 50% de los tumores (O'Connor y cols., 1997).

Numerosos hallazgos epidemiológicos y experimentales sugieren que B23/NPM es un blanco molecular atractivo en cáncer. La proteína B23/NPM se encuentra generalmente sobreexpresada en tumores sólidos de diferentes orígenes donde pudiera contribuir a la proliferación maligna mediante su participación en el proceso de biogénesis ribosomal (Grisendi y cols., 2006). El aumento en los niveles de B23/NPM ha sido asociado con el incremento de la proliferación celular y la inhibición de la diferenciación y la apoptosis,

características típicas de las transformaciones malignas, mientras que su disminución mediante ARN interferencia induce apoptosis en la célula tumoral (Itahana y cols., 2003). B23/NPM pudiera representar un nuevo ejemplo del fenómeno conocido como adicción no-oncogénica que postula que, producto de la reorganización de las vías de señalización y procesos biológicos, en las células tumorales se manifiesta una dependencia particular por determinadas proteínas que participan en procesos celulares “normales” pero que en el contexto tumoral contribuyen al mantenimiento del fenotipo maligno (Solimini y cols., 2007; Luo y cols., 2009). Sin embargo, el estudio de una posible adicción no oncogénica a la proteína B23/NPM como fenómeno que pudiera explicar la selectividad del péptido CIGB-300 hacia células tumorales demanda una robusta experimentación adicional.

Paralelamente a la identificación en este trabajo de B23/NPM como principal blanco molecular del CIGB-300 en células tumorales, al menos dos grupos independientes han reportado datos preclínicos sobre moléculas dirigidas contra esta proteína (Qi y cols., 2008; Jian y cols., 2009). Ambas moléculas, un compuesto químico y un aptámero ARN, a través de la inhibición de la oligomerización de B23/NPM inducen apoptosis en células tumorales, validando de manera independiente la inhibición farmacológica de B23/NPM como estrategia con potencial terapéutico en cáncer. El compuesto químico NSC348884, diseñado *in silico* para bloquear la interacción entre los monómeros en la estructura oligomérica de B23/NPM, demostró un potente efecto antiproliferativo en células tumorales derivadas de mama y próstata (CI_{50} : 1-10 μ M) (Qi y cols., 2008). Dicho evento fue precedido por la estabilización de la proteína p53 y la inducción de apoptosis en las células tumorales. Por otra parte, la expresión estable de un aptámero de ARN seleccionado para bloquear la oligomerización de B23/NPM a través de su interacción con la región central de la proteína, indujo la deslocalización de B23/NPM, la estabilización de p53 y la subsiguiente muerte celular por apoptosis en células de cérvix y mama (Jian y cols., 2009). Sin embargo, la apoptosis inducida en la población celular transfectada fue discreta (< 27%), evidenciando una de las principales limitaciones de esta novedosa estrategia terapéutica cuando se dirige a blancos intracelulares (Ray y White, 2010; Meyer y cols., 2011).

De manera general, la información disponible sobre la caracterización preclínica de ambos inhibidores de B23/NPM se limita a su evaluación *in vitro* en un reducido número de líneas

celulares, mientras se desconoce si dichos compuestos manifiestan propiedades antitumorales *in vivo*. Tampoco existen datos sobre la selectividad de ambas moléculas hacia las células tumorales *in vitro* o su toxicidad *in vivo* en modelos animales. La evaluación del CIGB-300 en células no tumorigénicas evidenció que se requieren concentraciones de péptido prácticamente dos veces superiores para inhibir de manera significativa su proliferación *in vitro*. Dicho índice terapéutico *in vitro* es similar o incluso superior al descrito para otras drogas antitumorales actualmente utilizadas en la terapéutica del cáncer (Brouty-Boye y cols., 1995; Badisa y cols., 2009; Abdullah y cols., 2009). Además, estos resultados se corresponden con la ausencia de signos de toxicidad *in vivo* en los tejidos sanos de ratones tratados con dosis elevadas de péptido (30 mg/kg), así como con el perfil de seguridad y tolerabilidad al péptido registrado en los ensayos clínicos previos (Solares y cols., 2009).

Un número creciente de inhibidores farmacológicos de la enzima CK2 se han evaluado durante la última década en modelos preclínicos de cáncer (Prudent y Cochet, 2009). La mayoría de estos compuestos inhiben en el rango nanomolar la proliferación celular *in vitro* (Duncan y Litchfield, 2008), mientras solo dos inhibidores que compiten por el sitio de unión a ATP en dicha enzima demostraron efecto antitumoral *in vivo* (*i.e.* compuesto 18, CX-4945) (Prudent y cols., 2010; Siddiqui-Jain y cols., 2010). La inhibición farmacológica de la señalización mediada por la enzima CK2 a través de las dos estrategias terapéuticas, bloqueo del sitio fosfoceptor en el sustrato (CIGB-300) o bloqueo directo de la actividad enzimática (*e.g.* compuesto 18, CX-4945), ejerce efectos celulares similares como el impacto diferencial sobre el ciclo celular (*i.e.* contexto específico) y la inducción de apoptosis. Sin embargo, la experimentación pre-clínica también revela importantes diferencias en cuanto al perfil de respuesta antineoplásica, la eficacia antitumoral y la toxicidad, en correspondencia con las diferencias en los mecanismos de acción postulados para el péptido CIGB-300 y los inhibidores de la enzima CK2.

Los resultados de caracterización del perfil de respuesta antineoplásico del CIGB-300 indican que las localizaciones tumorales de pulmón y cérvix son particularmente atractivas para evaluar la eficacia antitumoral del péptido en el escenario clínico. El estudio de las bases moleculares de dicho efecto provee además de un conjunto de marcadores moleculares que

necesitan ser explorados en los modelos animales para determinar si los hallazgos son extrapolables al escenario *in vivo*. Entre estos marcadores, resultan particularmente atractivos por su implicación directa en el mecanismo de acción los genes *naca* y *gtfIIIa*, así como el transcrito correspondiente al ARN precursor ribosomal (*45S ARNr*), productos génicos que pudieran ser utilizados como marcadores farmacodinámicos o subrogados de efecto después de una robusta validación experimental. Dichos marcadores moleculares contribuirán de manera significativa al diseño, evaluación y exploración racional del péptido CIGB-300 en el terreno clínico.

De conjunto, los resultados experimentales contenidos en el presente documento develan por primera vez la identidad del principal blanco molecular del péptido CIGB-300 en células tumorales, así como aportan un grupo de conocimientos sobre las bases moleculares y celulares que contribuyen a explicar su amplio y variable efecto antineoplásico en modelos preclínicos de cáncer. Estos hallazgos validan al mismo tiempo la hipótesis que dio origen al péptido CIGB-300 sobre la factibilidad de inhibir el evento de fosforilación catalizado por la enzima CK2 por interacción directa con sus sustratos como estrategia con potencial terapéutico en cáncer.

6. CONCLUSIONES

- 1- La afectación directa de la supervivencia celular y el impacto sobre la progresión en el ciclo celular fundamentan el efecto antineoplásico del CIGB-300 en células tumorales con diferente fenotipo de respuesta al péptido.
- 2- El efecto antineoplásico del CIGB-300 en células tumorales de diferente origen y fenotipo de respuesta es mediado por su interacción con la proteína B23/NPM y la subsiguiente inhibición de su fosforilación, constituyendo dicho sustrato de la enzima CK2 el principal blanco molecular del péptido.
- 3- El efecto antiproliferativo del CIGB-300 en las células tumorales no depende de la cinética ni de la magnitud de la internalización del péptido pero si correlaciona directamente con su localización en la región nucleolar, principal localización subcelular de la proteína B23/NPM.
- 4- El análisis de los genes regulados diferencialmente por el CIGB-300 y su efecto sobre la estructura nucleolar indica que el péptido a través de la inhibición de la fosforilación de B23/NPM afecta el proceso de biogénesis ribosomal, evento cuya repercusión sobre la supervivencia y proliferación celular explica el efecto antineoplásico observado en células tumorales.

7. RECOMENDACIONES

- 1- Corroborar mediante experimentos de recobrado de la fluorescencia la disminución de la movilidad nuclear de la proteína B23/NPM como consecuencia de la inhibición de la fosforilación catalizada por la enzima CK2.
- 2- Verificar el efecto del CIGB-300 sobre la exportación de las subunidades ribosomales al citoplasma empleando un método directo como la determinación del perfil ribosomal.
- 3- Verificar, empleando los marcadores moleculares identificados, la ejecución del mecanismo de acción propuesto *in vivo* en el escenario preclínico y clínico.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullah NM, Rosania GR, y Shedden K. Selective targeting of tumorigenic cancer cell lines by microtubule inhibitors. *PLoS One* (2009) 4:e4470.
- Ahmed K, Gerber DA, y Cochet C. Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2. *Trends Cell Biol.* (2002) 12: 226-230.
- Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, Leung AK, Lam YW, Steen H, Mann M, y Lamond AI. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr. Biol.* (2002) 12: 1-11.
- Angelier N, Tramier M, Louvet E, Coppey-Moisan M, Savino TM, De Mey JR, y Hernandez-Verdun D. Tracking the Interactions of rRNA Processing Proteins during Nucleolar Assembly in Living Cells. *Mol. Biol. Cell* (2005) 16: 2862-2871.
- Angelov D, Bondarenko VA, Almagro S, Menoni H, Mongelard F, Hans F, Mietton F, Studitsky VM, Hamiche A, Dimitrov S, y Bouvet P. Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J.* (2006) 25:1669–1679.
- Asada S, Choi Y, Yamada M, Wang SC, Hung MC, Qin J, y Uesugi M. External control of Her2 expression and cancer cell growth by targeting a Ras-linked coactivator. *PNAS* (2002) 99: 12747- 12752.
- Astriab-Fisher A, Sergueev D, Fisher M, Shaw BR, y Juliano RL. Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and antennapedia cell-penetrating peptides: Effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions. *Pharm. Res.* (2002) 19: 744-754.
- Auclair C. Multimodal action of antitumor agents on DNA: the ellipticine series. *Arch. Biochem. Biophys.* (1987) 259: 1-14.
- Badisa RB, Darling-Reed SF, Joseph P, Cooperwood JS, Latinwo LM, y Goodman CB. Selective Cytotoxic Activities of Two Novel Synthetic Drugs on Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells. *Anticancer Res.* (2009) 29: 2993-2996.
- Barz T, Ackermann K, Dubois G, Eils R, y Pyerin W. Genome-wide expression screens indicate a global role for protein kinase CK2 in chromatin remodeling. *J. Cell Sci.* (2003) 116: 1563-1577.
- Begley R, Liron T, Baryza J, y Mochly-Rosen D. Biodistribution of intracellularly acting peptides conjugated reversibly to Tat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004) 318: 949-954.
- Bergstralh DT, Conti BJ, Moore CB, Brickey WJ, Taxman DJ, y Ting JP. Global functional analysis of nucleophosmin in Taxol response, cancer, chromatin regulation, and ribosomal DNA transcription. *Exp. Cell Res.* (2007) 313: 65-76.
- Biggiogera M, Fakan S, Kaufmann SH, Black A, Shaper JH, y Busch H. Simultaneous immunoelectron microscopic visualization of protein B23 and C23 distribution in the HeLa cell nucleolus. *J. Histochem. Cytochem.* (1989) 37: 1371-1374.
- Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, y Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* (1989) 56: 379-390.
- Boyd MR (ed) (1997). The NCI in vitro anticancer drug discovery screen: concept, implementation, and operation, 1985-1995, in *Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval*. Humana Press, Totowa, NJ USA.
- Brooks H, Lebleu B, y Vives E. Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2005) 57: 559-577.
- Brouty-Boye D, Kolonias D, y Lampidis TJ. Antiproliferative activity of taxol on human tumor and normal breast cells vs. effects on cardiac cells. *Int. J. Cancer* (1995) 60: 571-575.
- Buchou T, Vernet M, Blond O, Jensen HH, Pointu H, Olsen BB, Cochet C, Issinger OG, y Boldyreff B. Disruption of the regulatory {beta} subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol. Cell Biol.* (2003) 23: 908–915.

- Busch H, Byvoet P, y Smetana K. The Nucleolus of the Cancer Cell: A Review. *Cancer Res.* (1963) 23: 313-339.
- Cai SR, Xu G, Becker-Hapak M, Ma M, Dowdy SF, y McLeod HL. The kinetics and tissue distribution of protein transduction in mice. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2006) 27: 311-319.
- Chan PK, Liu QR, y Durban E. The major phosphorylation site of nucleophosmin (B23) is phosphorylated by a nuclear kinase II. *Biochem. J.* (1990) 270: 549-552.
- Chan PK, Chan FY, Morris SW, y Xie Z. Isolation and Characterization of the Human Nucleophosmin/B23 (NPM) Gene: Identification of the YY1 Binding Site at the 5' Enhancer Region. *Nucleic Acids Res.* (1997) 25: 1225-1232.
- Chauhan A, Tikoo A, Kapur AK, y Singh M. The taming of the cell penetrating domain of the HIV Tat: myths and realities. *J. Control. Release* (2007) 117: 148-162.
- Chedin S, Laferte A, Hoang T, Lafontaine DL, Riva M, y Carles C. Is ribosome synthesis controlled by pol I transcription?. *Cell Cycle* (2007) 6: 11-15.
- Chen D y Huang S. Nucleolar Components Involved in Ribosome Biogenesis Cycle between the Nucleolus and Nucleoplasm in Interphase Cells. *J. Cell Biol.* (2001) 153: 169-176.
- Chen L y Harrison SD. Cell-penetrating peptides in drug development: enabling intracellular targets. *Biochem. Soc. Trans.* (2007) 35: 821-825.
- Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, y Pelicci PG. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat. Cell Biol.* (2002) 4: 529-533.
- Cornelissen B, McLarty K, Kersemans V, Scollard DA, y Reilly RM. Properties of [(111)In]-labeled HIV-1 tat peptide radioimmunoconjugates in tumor-bearing mice following intravenous or intratumoral injection. *Nucl. Med. Biol.* (2008) 35: 101-110.
- Cornelissen B, Hu M, McLarty K, Costantini D, y Reilly RM. Cellular penetration and nuclear importation properties of 111In-labeled and 123I-labeled HIV-1 tat peptide immunoconjugates in BT-474 human breast cancer cells. *Nucl. Med. Biol.* (2007) 34: 37-46.
- Datta K, Sundberg C, Karumanchi SA, y Mukhopadhyay D. The 104–123 Amino Acid Sequence of the β -domain of von Hippel-Lindau Gene Product Is Sufficient to Inhibit Renal Tumor Growth and Invasion. *Cancer Res.* (2001) 61: 1768-1775.
- Daya-Makin M, Sanghera JS, Mogentale T, Lipp M, Parchomchuk J, Hogg J, y Pelech S. Activation of a tumour-associated protein kinase (p40TAK) and casein kinase II in human squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res.* (1994) 54: 2262–2268.
- Deisenroth C y Zhang Y. Ribosome biogenesis surveillance: probing the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway. *Oncogene* (2010) 29: 4253-4260.
- Dhar SK, Lynn BC, Daosukho C, y St. Clair DK. Identification of Nucleophosmin as an NF-B Co-activator for the Induction of the Human SOD2 Gene. *J. Biol. Chem.* (2004) 279: 28209-28219.
- Di Maira G, Salvi M, Arrigoni G, Marin O, Sarno S, Brustolon F, Pinna LA, y Ruzzene M. Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death Differ.* (2005) 12: 668-677.
- Dietz GP y Bahr M. Delivery of bioactive molecules into the cell: The Trojan horse approach. *Mol. Cell Neurosci.* (2004) 27: 85-131.
- Dingwall C y Laskey RA. Nucleoplasm: the archetypal molecular chaperone. *Semin. Cell Biol.* (1990) 1: 11-17.
- Duncan JS y Litchfield DW. Too much of a good thing: the role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2. *Biochim. Biophys. Acta* (2008) 1784: 33-47.
- Emmott E y Hiscox JA. Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep.* (2009) 10: 231-238.
- Faust M y Montenarh M. Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function?. *Cell Tissue Res.* (2000) 301: 329-340.

- Faust RA, Gapany M, Tristani P, Davis AT, Adams GL, y Ahmed K. Elevated protein kinase CK2 activity in chromatin of head and neck tumors: association with malignant transformation. *Cancer Lett.* (1996) 101:31-35.
- Faust RA, Tawfic S, Davis AT, Bubash LA, y Ahmed K. Antisense oligonucleotides against protein kinase CK2-a inhibit growth of squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro. *Head and Neck* (2000) 22: 341-346.
- Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen L, Pepinsky B, y Barsoum J. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1994) 91: 664-668.
- Felici F, Castagnoli L, Musacchio A, Jappelli R, y Cesareni G. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J. Mol. Biol.* (1991) 222: 301-310.
- Ferrari A, Pellegrini V, Arcangeli C, Fittipaldi A, Giacca M, y Beltram F. Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time. *Molec. Ther.* (2003) 8: 284-294.
- Feudis PD, Vignati S, Rossi C, Mincioni T, Giavazzi R, D'Incalci M, y Brogginini M. Driving p53 response to Bax activation greatly enhances sensitivity to taxol by inducing massive apoptosis. *Neoplasia* (2000) 2: 202-207.
- Feuerstein N, Chan PK, y Mond JJ. Identification of numatrin, the nuclear matrix protein associated with induction of mitogenesis, as the nucleolar protein B23. Implication for the role of the nucleolus in early transduction of mitogenic signals. *J. Biol. Chem.* (1988) 263: 10608–10612.
- Filhol O, Nueda A, Martel V, Gerber-Scokaert D, Benitez MJ, Souchier C, Saoudi Y, y Cochet C. Live-Cell Fluorescence Imaging Reveals the Dynamics of Protein Kinase CK2 Individual Subunits. *Mol. Cell Biol.* (2003) 23: 975-987.
- Fischer R, Kohler K, Fotin-Mleczek M, y Brock R. A Stepwise Dissection of the Intracellular Fate of Cationic Cell-penetrating Peptides. *J. Biol. Chem.* (2004) 279: 12625-12635.
- Fulda S, Wick W, Weller M, y Debatin KM. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat. Med.* (2002) 8: 808-815.
- Fumagalli S, Di Cara A, Neb-Gulati A, Natt F, Schwemberger S, Hall J, Babcock GF, Bernardi R, Pandolfi PP, y Thomas G. Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat. Cell Biol.* (2009) 11: 501-508.
- George NM, Targy N, Evans JD, Zhang L, y Luo X. Bax Contains Two Functional Mitochondrial Targeting Sequences and Translocates to Mitochondria in a Conformational Change- and Homo-oligomerization-driven Process. *J. Biol. Chem.* (2010) 285: 1384-1392.
- Ghavidel A y Schultz MC. TATA binding protein associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA polymerase III transcriptional machinery. *Cell* (2001) 106: 575-584.
- Gius DR, Ezhevsky SA, Becker-Hapak M, Nagahara H, Wei MC, y Dowdy SF. Transduced p16INK4a Peptides Inhibit Hypophosphorylation of the Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Progression Prior to Activation of Cdk2 Complexes in Late G1. *Cancer Res.* (1999) 59: 2577-2580.
- Glover CVI. On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* (1998) 59: 95-133.
- Gordon MD y Nusse R. Wnt Signaling: Multiple Pathways, Multiple Receptors, and Multiple Transcription Factors. *J. Biol. Chem.* (2006) 281: 22429-22433.
- Grisendi S, Mecucci C, Falini B, y Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nature* (2006) 6: 493-505.
- Guo C, Yu S, Davis AT, Wang H, Green JE, y Ahmed K. A potential role of nuclear matrix-associated protein kinase CK2 in protection against drug-induced apoptosis in cancer cells. *J. Biol. Chem.* (2001) 276: 5992–5999.
- Hallbrink M, Floren A, Elmquist A, Pooga M, Bartfai T, y Langel U. Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta* (2001) 1515: 101-109.

- Harada H, Hiraoka M, y Kizaka-Kondoh S. Antitumor Effect of TAT-Oxygen-dependent Degradation-Caspase-3 Fusion Protein Specifically Stabilized and Activated in Hypoxic Tumor Cells. *Cancer Res.* (2002) 62: 2013-2018.
- Hauber J, Malim MH, y Cullen BR. Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol.* (1989) 63: 1181-1187.
- Herrera JE, Savkur R, y Olson MO. The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic Acids Res.* (1995) 23: 3974-3980.
- Hingorani K, Szebeni A, y Olson MO. Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J. Biol. Chem.* (2000) 275: 24451-24457.
- Huang DW, Sherman BT, y Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* (2009) 4: 44-57.
- Huang S. Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus? *J. Cell Biol.* (2002) 157: 739-741.
- Inouye CJ y Seto E. Relief of YY1-induced transcriptional repression by protein-protein interaction with the nucleolar phosphoprotein B23. *J. Biol. Chem.* (1994) 269: 6506-6510.
- Isaacs WB, Carter BS, y Ewing CM. Wild-Type p53 Suppresses Growth of Human Prostate Cancer Cells Containing Mutant p53 Alleles. *Cancer Res.* (1991) 51: 4716 - 4720.
- Iskar M, Campillos M, Kuhn M, Jensen LJ, van Noort V, y Bork P. Drug-induced regulation of target expression. *PLoS Comput. Biol.* (2010) 6: e1000925.
- Itahana K, Bhat KP, Jin A, Itahana Y, Hawke D, Kobayashi R, y Zhang Y. Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol. Cell* (2003) 12: 1151-1164.
- Jiang PS, Chang JH, y Yung YB. Different kinases phosphorylate nucleophosmin/B23 at different sites during G(2) and M phases of the cell cycle. *Cancer Lett.* (2000) 153: 151-160.
- Jian Y, Gao Z, Sun J, Shen Q, Feng F, Jing Y, y Yang C. RNA aptamers interfering with nucleophosmin oligomerization induce apoptosis of cancer cells. *Oncogene* (2009) 28: 4201-4211.
- Jones SW, Christison R, Bundell K, Voyce CJ, Brockbank SM, Newham P, y Lindsay MA. Characterization of cell-penetrating peptide mediated peptide delivery. *Br. J. Pharmacol.* (2005) 45: 1093-1102.
- Kaplan IM, Wadia JS, y Dowdy SF. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J. Control. Release* (2005) 102: 247-253.
- Katayama S, Hirose H, Takayama K, Nakase I, y Futaki S. Acylation of octaarginine: Implication to the use of intracellular delivery vectors. *J Control. Release* (2011) 149: 29-35.
- Kim MS, Li SL, Bertolami CN, Cherrick HM, y Park NH. State of p53, Rb and DCC tumor suppressor genes in human oral cancer cell lines. *Anticancer Res.* (1993) 13:1405-1413.
- Kim RH y Mak TW. Tumours and tremors: how PTEN regulation underlies both. *Br. J. Cancer* (2006) 94: 620-624.
- Kondo T, Minamino N, Nagamura-Inoue T, Matsumoto M, Taniguchi T, y Tanaka N. Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity. *Oncogene* (1997) 15: 1275-1281.
- Koppelhus U y Nielsen PE. Three-domain compounds for transmembrane delivery. WO 2008/043366
- Koppelhus U, Shiraishi T, Zachar V, Pankratova S, y Nielsen PE. Improved cellular activity of antisense peptide nucleic acids by conjugation to a cationic peptide-lipid (CatLip) domain. *Bioconjugate Chem.* (2008) 19: 1526-1534.
- Laferté A, Favry E, Sentenac A, Riva M, Carles C, y Chédin S. The transcriptional activity of RNA polymerase I is a key determinant for the level of all ribosome components. *Genes & Dev.* (2006) 20: 2030-2040.

- Landesman-Bollag E, Channavajhala PL, Cardiff RD, y Seldin DC. p53 deficiency and misexpression of protein kinase CK2 α collaborate in the development of thymic lymphomas in mice. *Oncogene* (1998) 16: 2965-2974.
- Landesman-Bollag E, Romieu-Mourez R, Song DH, Sonenshein GE, Cardiff RD, y Seldin DC. Protein kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis. *Oncogene* (2001) 20: 3247-3257.
- Langel U (ed) (2006). *Handbook of Cell-Penetrating Peptides*. Taylor & Francis Group, Stockholm, Sweden.
- Laudet B, Barette C, Dulery V, Renaudet O, Dumy P, Metz A, Prudent R, Deshiere A, Dideberg O, Filhol O, y Cochet C. Structure-based design of small peptide inhibitors of protein kinase CK2 subunit interaction. *Biochem. J.* (2007) 408: 363-373.
- Laudet B, Moucadel V, Prudent R, Filhol O, Wong YS, Royer D, y Cochet C. Identification of chemical inhibitors of protein-kinase CK2 subunit interaction. *Mol. Cell. Biochem.* (2008) 316: 63–69.
- Leary DJ y Huang S. Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *FEBS Lett.* (2001) 509: 145-150.
- Le Panse S, Masson C, Heliot L, Chassery JM, Junera HR, y Hernandez-Verdun D. 3-D organization of ribosomal transcription units after DRB inhibition of RNA polymerase II transcription. *J. Cell Sci.* (1999) 112: 2145- 2154.
- Le PU y Nabi IR. Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* (2003) 116: 1059-1071.
- Lewin M, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, Scadden DT, y Weissleder R. Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat. Biotechnol.* (2000) 18: 410–414.
- Lewis JD y Tollervey D. Like Attracts Like: Getting RNA Processing Together in the Nucleus. *Science* (2000) 288:1385-1389.
- Li J, Zhang X, Sejas DP, Bagby GC, y Pang Q. Hypoxia-induced Nucleophosmin Protects Cell Death through Inhibition of p53. *J. Biol. Chem.* (2004) 279: 41275- 41279.
- Li YP. Protein B23 is an important human factor for the nucleolar localization of the human immunodeficiency virus protein Tat. *J. Virol.* (1997) 71:4098-4102.
- Li YP, Busch RK, Valdezny BC, y Busch H. C23 interacts with B23, a putative nucleolar-localization-signal-binding protein. *Eur. J. Biochem.* (1996) 237:153-158.
- Lim JKC, Padgett CS, Marschke RF, Northfelt DW, Andreopoulou E, Von Hoff DD, Anderes K, Chen TK, y O'Brien SE. Utility of clinical biomarkers for detecting protein kinase CK2 inhibition: A report from the phase I trial of CX-4945. *Cancer Res.* (2010) 70: 2763-2766.
- Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, y Wu TC. Treatment of Established Tumors with a Novel Vaccine That Enhances Major Histocompatibility Class II Presentation of Tumor Antigen. *Cancer Res.* (1996) 56: 21-26.
- Lischwe MA, Smetana K, Olson MO, y Busch H. Proteins B23 and C23 are the major nucleolar silver staining proteins. *Life Sci.* (1979) 25:701-708.
- Liu HT y Yung BY. In vivo interaction of nucleophosmin/B23 and protein C23 during cell cycle progression in HeLa cells. *Cancer Lett.* (1999) 144:45–54.
- Liu X, Liu Z, Jang SW, Ma Z, Shinmura K, Kang S, Dong S, Chen J, Fukasawa K, y Ye K. Sumoylation of nucleophosmin/B23 regulates its subcellular localization, mediating cell proliferation and survival. *PNAS* (2007) 104: 9679-9684.
- Liu Y y Bodmer WF. Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *PNAS* (2006) 103: 976-981.
- Lorenz P, Pepperkok R, Ansorge W, y Pyerin W. Cell biological studies with monoclonal and polyclonal antibodies against human casein kinase II subunit beta demonstrate participation of the kinase in mitogenic signaling. *J. Biol. Chem.* (1993) 268: 2733–2739.

- Louvet E, Junera HR, Le Panse S, y Hernandez-Verdun D. Dynamics and compartmentation of the nucleolar processing machinery. *Exp. Cell Res.* (2005) 304: 457-470.
- Louvet E, Junera HR, Berthuy I, y Hernandez-Verdun D. Compartmentation of the nucleolar processing proteins in the granular component is a CK2-driven process. *Mol. Biol. Cell.* (2006) 17: 2537-2546.
- Luo J, Solimini NL, y Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* (2009) 136: 823-837.
- Maggi LB, Kuchenruether M, Dadey DYA, Schwoppe RM, Grisendi S, Townsend RR, Pandolfi PP, y Weber JD. Nucleophosmin Serves as a Rate-Limiting Nuclear Export Chaperone for the Mammalian Ribosome. *Mol. Cell. Biol.* (2008) 28: 7050-7065.
- Mai JC, Shen H, Watkins SC, Cheng T, y Robbins PD. Efficiency of Protein Transduction Is Cell Type-dependent and Is Enhanced by Dextran Sulfate. *J. Biol. Chem.* (2002) 277: 30208-30218.
- Marin O, Meggio F, Marchiori F, Borin G, y Pinna LA. Site specificity of casein kinase-2 (TS) from rat liver cytosol. A study with model peptide substrates. *Eur. J. Biochem.* (1986) 160: 239-244.
- Martel V, Filhol O, Nueda A, y Cochet C. Dynamic localization/association of protein kinase CK2 subunits in living cells: a role in its cellular regulation?. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2002) 973: 272-277.
- Martel V, Filhol O, Colas P, y Cochet C. p53-dependent inhibition of mammalian cell survival by a genetically selected peptide aptamer that targets the regulatory subunit of protein kinase CK2. *Oncogene* (2006) 25: 7343-7353.
- Meggio F y Pinna LA. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2. *FASEB J.* (2003) 17: 349-368.
- Meggio F, Pagano MA, Moro S, Zagotto G, Ruzzene M, Sarno S, Cozza G, Bain J, Elliott M, Deana AD, Brunati AM, y Pinna LA. Inhibition of protein kinase CK2 by condensed polyphenolic derivatives. An in vitro and in vivo study. *Biochemistry* (2004) 43: 12931-12936.
- Melese T y Xue Z. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr. Opin. Cell Biol.* (1995) 7: 319-324.
- Meyer C, Hahn U, y Rentmeister A. Cell-specific aptamers as emerging therapeutics. *J. Nucleic Acids* (2011) 2011: 904750.
- Michels AA y Hernandez N. Does Pol I talk to Pol II? Coordination of RNA polymerases in ribosome biogenesis. *Genes & Dev.* (2006) 20: 1982-1985.
- Mitchell DJ, Kim DT, Steinman L, Fathman CG, y Rothbard JB. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J. Pept. Res.* (2000) 56: 318-325.
- Mitsudomi T, Steinberg SM, Nau MM, Carbone D, D'Amico D, Bodner S, Oie HK, Linnoila RI, Mulshine JL, y Minna JD. p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* (1992) 7:171-180.
- Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, y Boyd M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *J. Natl. Cancer Inst.* (1991) 83: 757-766.
- Montanaro L, Mazzini G, Barbieri S, Vici M, Nardi-Pantoli A, Govoni M, Donati G, Trere D, y Derenzini M. Different effects of ribosome biogenesis inhibition on cell proliferation in retinoblastoma protein- and p53-deficient and proficient human osteosarcoma cell lines. *Cell Prolif.* (2007) 40: 532-549.
- Muehlbauer PA y Schuler MJ. Detection of numerical chromosomal aberrations by flow cytometry: a novel process for identifying aneuploidic agents. *Mutat. Res.* (2005) 585: 156-169.
- Munstermann U, Fritz G, Seitz G, Lu YP, Schneider HR, y Issinger OG. Casein kinase II is elevated in solid human tumours and rapidly proliferating non-neoplastic tissue. *Eur. J. Biochem.* (1990) 189: 251-257.
- Murano TK, Okuwaki M, Hisaoka M, y Nagata K. Transcription regulation of the rRNA gene by a multifunctional nucleolar protein, B23/nucleophosmin, through its histone chaperone activity. *Mol. Cell Biol.* (2008) 28: 3114-3126.

- Namboodiri VN, Akey IV, Schmidt-Zachmann MS, Head JF, y Akey CW. The structure and function of Xenopus NO38-core, a histone chaperone in the nucleolus. *Structure* (2004) 12: 2149-2160.
- Negi S y Olson MO. Effects of interphase and mitotic fosforilación on the mobility and location of nucleolar protein B23. *J. Cell Science* (2006) 401: 616-620.
- Niefind K, Guerra B, Ermakowa I, y Issinger OG. Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J.* (2001) 20: 5320-5331.
- Nozawa Y, Van Belzen N, Van der Made AC, Dinjens WN, y Bosman FT. Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa. *J. Pathol.* (1996) 178: 48-52.
- O'Connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M, Scudiero DA, Monks A, Sausville EA, Weinstein JN, Friend S, Fornace AJ, y Kohn KW. Characterization of the p53 Tumor Suppressor Pathway in Cell Lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen and Correlations with the Growth-Inhibitory Potency of 123 Anticancer Agents. *Cancer Res.* (1997) 57: 4285- 4300.
- Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, Knudsen ES, Hofmann IA, Snyder J D, Bove KE, y Fukasawa K. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* (2000) 103: 127-140.
- Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M, y Nagata K. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett.* (2001) 506: 272-276.
- Okuwaki M. The Structure and Functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a Multifunctional Nucleolar Acidic Protein. *J. Biochem.* (2007) 222: 1-7
- Okuwaki M, Tsujimoto M y Nagata K. The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by fosforilación with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype. *Mol. Biol. Cell* (2002) 13: 2016-2030.
- Olson MO, Hingorani K, y Szebeni A. Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int. Rev. Cytol.* (2002) 219: 199-266.
- Olsten ME, Weber JE, y Litchfield DW. CK2 interacting proteins: emerging paradigms for CK2 regulation?. *Mol. Cell. Biochem.* (2005) 274: 115-124.
- Opferman JT y Zambetti GP. Translational research? Ribosome integrity and a new p53 tumor suppressor checkpoint. *Cell Death Differ.* (2006) 13: 898-901.
- Pagano MA, Andrzejewska M, Ruzzene M, Sarno S, Cesaro L, Bain J, Elliott M, Meggio F, Kazimierczuk Z, y Pinna LA. Optimization of protein kinase CK2 inhibitors derived from 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole. *J. Med. Chem.* (2004) 47: 6239-6247.
- Patel LN, Zaro JL, y Shen WC. Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. *Pharm. Res.* (2007) 24: 1977-1992.
- Pei SJ, Chang JH, y Yung BYM. Different kinases phosphorylate nucleophosmin/B23 at different sites during G2 and M phases of the cell cycle. *Cancer Lett.* (2000) 153: 151-160.
- Pepperkok R, Lorenz P, Ansorge W, y Pyerin W. Casein kinase II is required for transition of G0/G1, early G1, and G1/S phases of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* (1994) 269:6986-6991.
- Perea SE, Reyes O, Puchades Y, Mendoza O, Vispo NS, Torrens I., Santos A, Silva R, Acevedo B, López E, Falcón V, y Alonso DF. Antitumor Effect of a Novel Proapoptotic Peptide that Impairs the Fosforilación by the Protein Kinase 2 (Casein Kinase 2). *Cancer Res.* (2004) 64: 7127-7129.
- Pestov DG, Strezoska Z, y Lau LF. Evidence of p53-Dependent Cross-Talk between Ribosome Biogenesis and the Cell Cycle: Effects of Nucleolar Protein Bop1 on G1/S Transition. *Mol. Cell. Biol.* (2001) 21: 4246-4255.
- Pfaffl MW, Horgan GW, y Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* (2002) 30: e36.
- Piñol-Roma S. Association of nonribosomal nucleolar proteins in ribonucleoprotein complexes during interphase and mitosis. *Mol. Biol. Cell* (1999) 10: 77-90.

- Polyakov V, Sharma V, Dahlheimer JL, Pica CM, Luker GD, y Piwnica-Worms D. Novel Tat-peptide chelates for direct transduction of technetium-99m and rhenium into human cells for imaging and radiotherapy. *Bioconjug. Chem.* (2000) 11: 762-771.
- Potocky TB, Menon AK, y Gellman SH. Cytoplasmic and Nuclear Delivery of a TAT-derived Peptide and a Peptide after Endocytic Uptake into HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* (2003) 278: 50188-50194.
- Prudent R, Moucadel V, Laudet B, Barette C, Lafanechere L, Hasenknopf B, Li J, Bareyt S, Lacote E, Thorimbert S, Malacria M, Gouzerh P, y Cochet C. Identification of polyoxometalates as nanomolar noncompetitive inhibitors of protein kinase CK2. *Chem. Biol.* (2008) 15: 683-692.
- Prudent R y Cochet C. New Protein Kinase CK2 Inhibitors: Jumping out of the Catalytic Box. *Chem. Biol.* (2009) 16: 112-120.
- Prudent R, Moucadel V, Nguyen CH, Barette C, Schmidt F, Florent JC, Lafanechère L, Sautel CF, Duchemin-Pelletier E, Spreux E, Filhol O, Reiser JB, y Cochet C. Antitumor Activity of Pyridocarbazole and Benzopyridindole Derivatives that Inhibit Protein Kinase CK2. *Cancer Res.* (2010) 70: 9865-9874.
- Qi W, Shakalya K, Stejskal A, Goldman A, Beeck S, Cooke L, y Mahadevan D. NSC348884, a nucleophosmin inhibitor disrupts oligomer formation and induces apoptosis in human cancer cells. *Oncogene* (2008) 27: 4210-4220.
- Ray P y White RR. Aptamers for Targeted Drug Delivery. *Pharmaceuticals* (2010) 3: 1761-1778.
- Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait MJ, Chernomordik LV, y Lebleu B. Cell-penetrating Peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* (2003) 278: 585-590.
- Richard JP, Melikov K, Brooks H, Prevot P, Lebleu B, y Chernomordiket LV. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrindependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J. Biol. Chem.* (2005) 280: 15300-15306.
- Rodriguez-Ulloa A, Ramos Y, Gil J, Perera Y, Castellanos-Serra L, Garcia Y, Betancourt L, Besada V, Gonzalez LJ, Fernandez-de-Cossio J, Sanchez A, Serrano JM, Farina H, Alonso DF, Acevedo BE, Padron G, Musacchio A, y Perea SE. Proteomic profile regulated by the anticancer peptide CIGB-300 in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. *J Proteome Res.* (2010) 9: 5473-5483.
- Romieu-Mourez R, Landesman-Bollag E, Seldin DC, y Sonenshein GE. Protein Kinase CK2 Promotes Aberrant Activation of Nuclear Factor-B, Transformed Phenotype, and Survival of Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* (2002) 62: 6770-6778.
- Rozen S y Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* (2000) 132:365-386.
- Rubbi CP y Milner J. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J.* (2003) 22: 6068-6077.
- Ruzzene M y Pinna LA. Addiction to protein kinase CK2: a common denominator of diverse cancer cells? *Biochim. Biophys. Acta* (2010) 1804:499-504.
- Saadeddin A, Babaei-Jadidi R, Spencer-Dene B, y Nateri AS. The Links between Transcription, β -catenin/JNK Signaling, and Carcinogenesis. *Mol. Cancer Res.* (2009) 7: 1189-1196.
- Salvi M, Sarno S, Cesaro L, Nakamura H, y Pinna LA. Extraordinary pleiotropy of protein kinase CK2 revealed by weblogo phosphoproteome analysis. *Biochim. Biophys. Acta* (2009) 1793:847-859.
- Sato K, Hayami R, Wu W, Nishikawa T, Nishikawa H, Okuda Y, Ogata H, Fukuda M, y Ohta T. Nucleophosmin/B23 Is a Candidate Substrate for the BRCA1-BARD1 Ubiquitin Ligase. *J. Biol. Chem.* (2004) 279: 30919-30922.
- Savino TM, Gébrane-Younès J, De Mey J, Sibarita JB, y Hernandez-Verdun D. Nucleolar Assembly of the Rrna Processing Machinery in Living Cells. *J. Cell Biol.* (2001) 153: 1097-1110.
- Scheer U y Hock R. Structure and function of the nucleolus. *Curr. Opin. Cell Biol.* (1999) 11: 385-390.
- Scheffner M, Münger K, Byrne JC, y Howley PM. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *PNAS* (1991) 88: 5523 -5527.

- Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, y Dowdy SF. In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse. *Science* (1999) 285: 1569-1572.
- Selivanova G, Iotsova V, Okan I, Fritsche M, Strom M, Groner B, Grafstrom RC, y Wiman KG. Restoration of the growth suppression function of mutant p53 by a synthetic peptide derived from the p53 C-terminal domain. *Nat. Med.* (1997) 3:632–638.
- Shaw PJ y Jordan EG. The nucleolus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (1995) 11: 93–121.
- Shields LBE, Gerçel-Taylor C, Yashar CM, Wan TC, Katsanis WA, Spinnato JA, y Taylor DD. Induction of Immune Responses to Ovarian Tumor Antigens by Multiparity. *J. Soc. Gyn. Invest.* (1997) 4: 298-304.
- Siddiqui-Jain A, Drygin D, Streiner N, Chua P, Pierre F, O'Brien SE, Bliesath J, Omori M, Huser N, Ho C, Proffitt C, Schwaebe MK, Ryckman DM, Rice WG, y Anderes K. CX-4945, an Orally Bioavailable Selective Inhibitor of Protein Kinase CK2, Inhibits Prosurvival and Angiogenic Signaling and Exhibits Antitumor Efficacy. *Cancer Res.* (2010) 70: 10288-10298.
- Slaton JW, Unger GM, Sloper DT, Davis AT, y Ahmed K. Induction of apoptosis by antisense CK2 in human prostate cancer xenograft model. *Mol. Cancer Res.* (2004) 2:712-720.
- Snyder EL, Meade BR, Saenz CC, y Dowdy SF. Treatment of terminal peritoneal carcinomatosis by a transducible p53-activating peptide. *PLoS Biol.* (2004) 2: E36.
- Solares AM, Santana A, Baladron I, Valenzuela C, Gonzalez CA, Diaz A, Castillo D, Ramos T, Gomez R, Alonso DF, Herrera L, Sigman H, Perea SE, Acevedo BE, y Lopez-Saura P. Safety and preliminary efficacy data of a novel casein kinase 2 (CK2) peptide inhibitor administered intralesionally at four dose levels in patients with cervical malignancies. *BMC Cancer* (2009) 9: 146.
- Solimini NL, Luo J, y Elledge SJ. Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells. *Cell* (2007) 130: 986-988.
- Stalter G, Siemer S, Becht E, Ziegler M, Remberger K, y Issinger OG. Asymmetric expression of protein kinase CK2 subunits in human kidney tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1994) 202: 141–147.
- Subong EN, Shue MJ, Epstein JI, Briggman JV, Chan PK, y Partin AW. Monoclonal antibody to prostate cancer nuclear matrix protein (PRO:4-216) recognizes nucleophosmin/B23. *Prostate* (1999) 39: 298-304.
- Suzuki T, Futaki S, Niwa M, Tanaka S, Ueda K, y Sugiura Y. Possible Existence of Common Internalization Mechanisms among Arginine-rich Peptides. *J. Biol. Chem.* (2002) 277: 2437-2443.
- Szebeni A y Olson MO. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci.* (1999) 8: 905-912.
- Szebeni A, Hingorani K, Negi S, y Olson MO. Role of protein kinase CK2 fosforilación in the molecular chaperone activity of nucleolar protein B23. *J. Biol. Chem.* (2003) 278: 9107-9115.
- Tanaka M, Sasaki H, Kino I, Sugimura T, y Terada M. Genes preferentially expressed in embryo stomach are predominantly expressed in gastric cancer. *Cancer Res.* (1992) 52:3372–3377.
- Tawfic S, Olson MO, y Ahmed K. Role of Protein Phosphorylation in Post-translational Regulation of Protein B23 during Programmed Cell Death in the Prostate Gland. *J. Biol. Chem.* (1995) 270: 21009-21015.
- Tawfic S, Yu S, Wang H, Faust R, Davis A, y Ahmed K. Protein kinase CK2 signal in neoplasia. *Histol. Histopathol.* (2001) 16: 573-582.
- Ter-Avetisyan G, Tünnemann G, Nowak D, Nitschke M, Herrmann A, Drab M, y Cardoso MC. Cell Entry of Arginine-rich Peptides Is Independent of Endocytosis. *J. Biol. Chem.* (2009) 284: 3370-3378.
- Tokuyama Y, Horn HF, Kawamura K, Tarapore P, y Fukasawa K. Specific Phosphorylation of Nucleophosmin on Thr199 by Cyclindependent Kinase 2-Cyclin E and Its Role in Centrosome Duplication. *J. Biol. Chem.* (2001) 276: 21529-21537.
- Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V, y Levchenko TS. TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *PNAS* (2001) 98: 8786–8791.

- Toro A y Grunebaum E. TAT-mediated intracellular delivery of purine nucleoside phosphorylase corrects its deficiency in mice. *J. Clin. Invest.* (2006) 116: 2717-2726.
- Trotta CR, Lund E, Kahan L, Johnson AW, y Dahlberg JE. Coordinated nuclear export of 60S ribosomal subunits and NMD3 in vertebrates. *EMBO J.* (2003) 22: 2841-2851.
- Truant R y Cullen BR. The Arginine-Rich Domains Present in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat and Rev Function as Direct Importin -Dependent Nuclear Localization Signals. *Mol. Cell. Biol.* (1999) 19: 1210-1217.
- Tunnemann G, Martin RM, Haupt S, Patsch C, Edenhofer F, y Cardoso MC. Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *FASEB J.* (2006) 20: 1775-1784.
- Tyagi M, Rusnati M, Presta M, y Giacca M. Internalization of HIV-1 Tat Requires Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *J. Biol. Chem.* (2001) 276: 3254-3261.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N , De Paepe A, y Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* (2002) 3: 1-12.
- Viillard JF, Lacombe F, Belloc F, Pellegrin JL, y Reiffers J. Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. *Cancer Radiother.* (2001) 5: 109-129.
- Violini S, Sharma V, Prior JL, Dyszlewski M, y Piwnica-Worms D. Evidence for a plasma membrane-mediated permeability barrier to Tat basic domain in well-differentiated epithelial cells: lack of correlation with heparan sulfate. *Biochemistry* (2002) 41: 12652-12661.
- Vives E, Brodin P, y Lebleu B. A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus. *J. Biol. Chem.* (1997) 272: 16010-16017.
- Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, y Seymour L. Clinical Predictive Value of the in Vitro Cell Line, Human Xenograft, and Mouse Allograft Preclinical Cancer Models. *Clin. Cancer Res.* (2003) 9: 4227-4239.
- Wadia JS y Dowdy SF. Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2005) 57: 579-596.
- Wang D, Umekawa H, y Olson MO. Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells. *Cell. Mol. Biol. Res.* (1993) 39:33-42.
- Wang H, Davis A, Yu S, y Ahmed K. Response of cancer cells to molecular interruption of the CK2 signal. *Mol. Cell Biochem.* (2001) 227:167-174.
- Wang H, Yu S, Davis AT, y Ahmed K. Cell cycle dependent regulation of protein kinase CK2 signaling to the nuclear matrix. *J. Cell. Biochem.* (2003) 88: 812-822.
- Wang JL, Zhang ZJ, Choksi S, Shan S, Lu Z, Croce CM, Alnemri ES, Korngold R, y Huang Z. Cell Permeable Bcl-2 Binding Peptides: A Chemical Approach to Apoptosis Induction in Tumor Cells. *Cancer Res.* (2000) 60:1498-1502.
- Weser S, Riemann J, Seifart KH, y Meissner W. Assembly and isolation of intermediate steps of transcription complexes formed on the human 5S rRNA gene. *Nucleic Acids Res.* (2003) 31:2408-2416.
- Wiedmann B, Sakai H, Davis TA, y Wiedmann M. A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* (1994) 370:434-440.
- Wu MH y Yung BYM. UV Stimulation of Nucleophosmin/B23 Expression Is an Immediate-early Gene Response Induced by Damaged DNA. *J. Biol. Chem.* (2002) 277: 48234-48240.
- Yang L, Mashima T, Sato S, Mochizuki M, Sakamoto H, Yamori T, Oh-hara T, y Tsuruo T. Predominant Suppression of Apoptosome by Inhibitor of Apoptosis Protein in Non-Small Cell Lung Cancer H460 Cells: Therapeutic Effect of a Novel Polyarginine-conjugated Smac Peptide. *Cancer Res.* (2003) 63:831-837.
- Ye K. Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis. *Cancer Biol. Ther.* (2005) 4:918-923.

- Yenice S, Davis AT, Goueli SA, Akdas A, Limas C, y Ahmad K. Nuclear casein kinase 2 (CK-2) activity in human normal, benign hyperplastic and cancerous prostate. *Prostate* (1994) 24:11–16.
- Yu Y, Maggi LB, Brady SN, Apicelli AJ, Dai MS, Lu H, y Weber JD. Nucleophosmin Is Essential for Ribosomal Protein L5 Nuclear Export. *Mol. Cell. Biol.* (2006) 26:3798-3809.
- Yun JP, Chew EC, Liew CT, Chan JY, Jin ML, Ding MX, Fai YH, Li HK, Liang XM, y Wu QL. Nucleophosmin/B23 is a proliferate shuttle protein associated with nuclear matrix. *J. Cell Biochem.* (2003) 90:1140-1148.
- Zeller KI, Haggerty TJ, Barrett JF, Guo Q, Wonsey DR, y Dang CH. Characterization of Nucleophosmin (B23) as a Myc Target by Scanning Chromatin Immunoprecipitation. *J. Biol. Chem.* (2001) 276: 48285-48291.
- Zhang B, Park BH, Karpinets T, y Samatova NF. From pull-down data to protein interaction networks and complexes with biological relevance. *Bioinformatics* (2008) 24: 979-986.
- Zhang H, Shi X, Paddon H, Hampong M, Dai W, y Pelech S. B23/Nucleophosmin Serine 4 Phosphorylation Mediates Mitotic Functions of Polo-like Kinase 1. *J. Biol. Chem.* (2004) 279: 35726-35734.
- Ziegler A, Nervi P, Durrenberger M, y Seelig J. The cationic cell-penetrating peptide CPP (TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence. *Biochemistry* (2005) 44: 138-148.
- Ziegler A y Seelig J. Interaction of the Protein Transduction Domain of HIV-1 TAT with Heparan Sulfate: Binding Mechanism and Thermodynamic Parameters. *Biophys. J.* (2004) 86: 254–263.
- Zorko M y Langel U. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2005) 57: 529-545.

9. BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR

Publicaciones del autor relacionadas con el tema de tesis:

1. **Perera Y**, Farina HG, Gil J, Rodriguez A, Benavent F, Castellanos L, y cols. Anticancer peptide CIGB-300 binds to nucleophosmin/B23, impairs its CK2-mediated phosphorylation, and leads to apoptosis through its nucleolar disassembly activity. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(5): 1189 - 1196.
2. **Perera Y**, Costales HC, Diaz Y, Reyes O, Farina HG, Méndez L, y cols. Sensitivity of tumor cells towards CIGB-300 anticancer peptide relies on its nucleolar localization. (*Aceptado J. Pept. Sci.*).
3. **Perera Y**, Farina HG, Hernandez I, Mendoza O, Serrano JM, Reyes O, y cols. Systemic administration of a peptide that impairs the protein kinase (CK2) phosphorylation reduces solid tumor growth in mice. *Int J Cancer* 2008; 122(1):57-62.
4. Perea SE, Reyes O, Baladron I, **Perera Y**, Farina H, Gil J, y cols. CIGB-300, a novel proapoptotic peptide that impairs the CK2 phosphorylation and exhibits anticancer properties both in vitro and in vivo. *Mol Cell Biochem* 2008; 316(1-2):163-167.
5. Perea SE, Baladron I, Garcia Y, **Perera Y**, Lopez A, Soriano JL, y cols. CIGB-300, a synthetic peptide-based drug that targets the CK2 phosphoacceptor domain. Translational and clinical research. *Mol Cell Biochem.* 2011; Jul 7.

Presentaciones en eventos científicos relacionadas con el tema de tesis:

Conferencias:

- ✓ CIGB-300, a novel proapoptotic peptide that impairs the CK2 phosphorylation and exhibits antitumor properties both in cancer animal models and patients with cervical malignancies. 5th International Conference on Protein Kinase CK2 2007, Padua, Italy.
- ✓ CIGB-300 a new anticancer peptide that impairs the CK2-mediated phosphorylation of B23/nucleophosmin. Congreso Internacional Biotecnología Habana 2009, La Habana, Cuba.
- ✓ CIGB-300, a synthetic peptide-based drug that targets the CK2 phospho acceptor domain –translational and clinical research. 6th International Conference on Protein Kinase CK2 2010, Cologne, Germany.
- ✓ CK2-mediated phosphorylation of B23/nucleophosmin as a druggable pharmacologic event to target cancer cells. Congreso Internacional Immunopharmacology 2011, Varadero, Cuba.

Carteles:

- ✓ Systemic administration of a protein kinase (CK2) peptide inhibitor reduces solid tumor growth in mice. Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR), USA 2007.
- ✓ CIGB-300 binds B23/NPM and impairs its Casein Kinase-2 (CK2)-mediated phosphorylation in vitro and in vivo. MPSA, Varadero, Cuba 2007.
- ✓ Analysis of the proteomic profile modulated by the antitumoral peptide CIGB-300. MPSA, Varadero, Cuba 2007.
- ✓ An approach for “in vitro” and “in vivo” identification of proteins that interact with intracellular acting peptides. MPSA, Varadero, Cuba 2007.
- ✓ Pharmacologic evaluation of a novel proapoptotic peptide that impairs the protein kinase (ck2) phosphorylation in tumor animal models. Immunopharmacology, Varadero, Cuba 2008.
- ✓ Anti-tumor Effects of a Novel Proapoptotic Peptide Targeting the Protein Kinase CK2 in Human papillomavirus-infected Cells. USA 2008.

Otras publicaciones del autor:

- ✓ Rodríguez-Ulloa A, Ramos Y, Gil J, **Perera Y**, Castellanos-Serra L, Garcia Y, y cols. Proteomic profile regulated by the anticancer peptide CIGB-300 in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. *J Proteome Res* 2010; 9(10): 5473-5483.
- ✓ Farina HG, Benavent F, **Perera Y**, Rodríguez A, Perea SE, Acevedo B, Gomez R, Alonso DF, Gomez DE. CIGB-300, a proapoptotic peptide, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Exp. Cell Res.* 2011.
- ✓ Acevedo B, **Perera Y**, Ruiz M, Rojas G, Benitez J, Ayala M, Gavilondo J. Development and validation of a quantitative ELISA for the measurement of PSA concentration. *Clin. Chem. Acta.*, 2002 Mar; 317(1-2):55-63.
- ✓ Yero D, Pajon R, Niebla O, Sardiñas G, Vivar I, **Perera Y**, Garcia D, Delgado M, Cobas K. Bicistronic expression plasmid for rapid production of recombinant fused proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem*, 2006 Apr;44 (Pt 1):27-34.
- ✓ **Perera Y**, Cobas K, Garrido Y, Nazabal C, Brown E, Pajon R. Determination of human transferrin concentrations in mouse models of neisserial infection. *J. Immunol. Methods*, 2006Apr 20;311(1-2):153-63. Epub 2006 Feb 28.
- ✓ Acevedo B, **Perera Y**, Torres E, Penton D, Ayala M, Gavilondo J. Fast and novel purification method to obtain the prostate specific antigen (PSA) from human seminal plasma. *Prostate*, 2006 Jul 1; 66(10):1029-36.
- ✓ Lila Castellanos, Lázaro Betancourt, Gretel Sardiñas, **Yasser Perera**, y cols. Characterization of N. meningitidis proteoliposome proteins. Consistency and reproducibility among lots of VA-MENGOC-BC®, assessed by proteomic techniques. *Biotecnología Aplicada*. 2007 abr. -jun.; 24(2).
- ✓ **Perera Y**, Garcia D, Guirola O, Huerta V, Garcia Y, Muñoz Y. Epitope mapping of anti-human transferrin monoclonal antibodies: potential uses for transferrin-transferrin receptor interaction studies. *J Mol Recognit*, 2008 Mar-Apr;21(2):103-13.
- ✓ R Pajon, D Yero, O Niebla, Y Climent, G Sardiñas, D Garcia, **Y Perera**, A Llanes, M Delgado, K Cobas, E Caballero, S Taylor, C Brookes, and A Gorrings. Identification of new meningococcal serogroup B surface antigens through a systematic analysis of neisserial genomes. *Vaccine*, Dec 2009; 28(2): 532-41.

Premios:

- ✓ Characterization of proteins presented on the proteoliposome in *N. meningitidis* and demonstration of reproducibility among batches of VA-MENGOC-BC® using proteomic techniques. ACC 2007. Coautor.
- ✓ Genetic variability and immunological properties of the NlpB antigen; a novel protein identified in *Neisseria meningitidis*. ACC 2008. Coautor.
- ✓ Systemic administration of a peptide that impairs the protein kinase (CK2) phosphorylation reduces solid tumor growth in mice. Premio Anual de Salud (nivel nacional), Categoría Artículo Científico, 2009. Autor.
- ✓ Bases moleculares y celulares del mecanismo de acción antineoplásico del péptido CIGB-300. Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba 2012. Autor.

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1. Oligonucleótidos cebadores diseñados para la amplificación y cuantificación de los transcritos correspondientes a los genes identificados mediante hibridación substractiva, los genes asociados al mecanismo de acción y genes de referencia.

Selección Gen	Símbolo Oficial/Clone	Identificador (GenBank)		Secuencia Oligonucleótidos (5'-3')
Hibridación Substractiva	02-1G	AAI14378.1	F	ATAGGAAGAGCCGACATCGAA
			R	GGTTTTAAGCAGGAGGTGTCAG
	02-6D	Q16465	F	ATAGGAAGAGCCGACATCGAA
			R	GGTTTTAAGCAGGAGGTGTCAG
	ATP5A1	AAP36942.1	F	CGACAGACTGGGAAAACCTC
			R	ACTGGGCAACAGTGGATCTC
	BUB1	AAC06259.1	F	CTGGGCTTTCTAAACCAGTGAG
			R	CTTCTCCAAGAAGGTGATGGAC
	CKS1B	NR_024163.1	F	ACGACGACGAGGAGTTTGAG
			R	ACTCTGCTGAACGCCAAGAT
	DBF4	AAS07418.1	F	TCTATTCAGAAGCCCTGCAGTC
			R	CCACCATACTTATCGCCATCTG
	DDX24	AAH96826.1	F	TCAGCTTTCTAGGCTTCTCTGC
			R	AGTTTTCCCACTTCTGTCTCA
	EEF1A	EF362804.1	F	AATGGTGACAACATGTGGGA
			R	ACGAGTTGGTGGTAGGATGC
	GNB2L1	EAW53694.1	F	GGGACAAGCTGGTCAAGGTA
			R	GGGATCCATCTGGAGAGACA
	GTFIIIA	NM_002097.2	F	CAAGAGAAGGCTGTGGAAGAAC
			R	CAGCATGCCTAGTGAGACTTTG
MTRNR2L1	Q8IVG9.1	F	TCCACGAGGGTTCAGCTGTC	
		R	CTCTTACGGGCAGGTCAAT	
NACA	BC114377.1	F	ATGTCCAAACTGGGTCTTCG	
		R	GCTGCTAGTTGIGCTTGCTG	
RPL5	EAW73088.1	F	ATTATGCTCGAAACGCTTG	
		R	ACGGGCATAAGCAATCTGAC	
RPS6	AAH27620.1	F	CTGGCGGACATCATTTCTT	
		R	CCGCTGCTACTGAGTAAGG	
ST13	AY826825.1	F	ATTGCAGAACATCGGAGAAAGT	
		R	AGAGCCATACTGAGCTCCTGAC	
TUSC3	NP_839952.1	F	CAGCTGAGCAACTAGCAAAGTG	
		R	ACCAGAGTAGTTGGGTGGTCTG	
Asociado al Mecanismo	NPM1	NG_016018.1	F	ACCACCAGTGGTCTTAAGGTTG
			R	GCAGACCGCTTCCAGATATAC
	45S-rRNA	-*	F	GCCTTCTCTAGCGATCTGAGAG
			R	CCATAACGGAGGCAGAGACA
	CDKN1A	NR_037152.1	F	CTTCAGTACCCTCTCAGCTCCA
		R	AACTAGGGTGCCCTTCTTCTTG	
BAX	NM_138761.3	F	CAAGAAGCTGAGCGAGTGTCTC	
		R	TCCTCTGCAGCTCCATGTTACT	
Gen de Referencia	YWHAZ	NC_000008.10	F	GCT CCT CAA GAG CAG GGA CAA T
			R	TCA AGA CTC ACT GCC TCC CAT C
	SNRPA	NC_000019.9	F	CAGTATGCCAAGACCGACTCAGA
			R	GGCCCGGCATGTGGTGACATAA
	HPRT1	NG_012329.1	F	TGACACTGGCAAAAACAATGCA
		R	GGTCCTTTTACCAGCAAGCT	
HMBS	NG_008093.1	F	GGCAATGCGGCTGCAA	
		R	GGGTACCCACGGAATCAC	

⁺ Secuencia de oligonucleótido tomada de Murano y cols. (2008). F, del inglés “forward”; R, del inglés “reverso”.

10.2 Anexo 2. Descripción del origen, tumorigenicidad y sensibilidad al CIGB-300 y moléculas derivadas de las líneas celulares empleadas en el estudio.

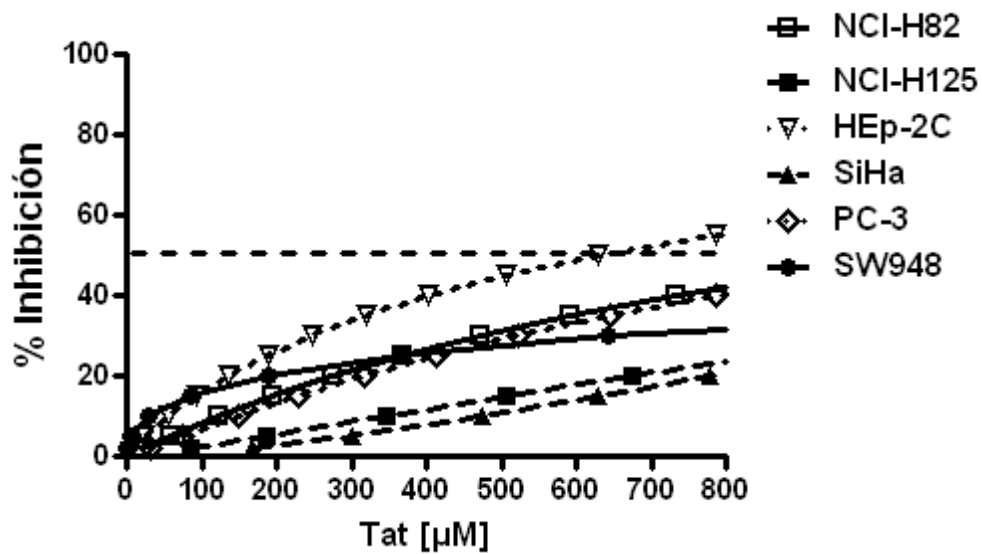
Línea celular*	Origen	tumorigenicidad	Molécula [CI ₅₀ , μM]**			
			CIGB-300	L-CIGB-300	CIGB-300mut	L-PPCmut-P15
NCI-H460	pulmón	sí	19 ± 2	ND***	ND	ND
NCI-H125	pulmón	sí	59 ± 4	10 ± 1	581 ± 134	> 100
NCI-H82	pulmón	sí	50 ± 9	8 ± 1	>> 200	ND
TC-1	pulmón	sí	65 ± 2	ND	ND	ND
A549	pulmón	sí	125 ± 4	32 ± 2	ND	ND
SiHa	cervix	sí	134 ± 3	11 ± 2	>> 400	> 100
HeLa	cervix	sí	126 ± 18	19 ± 4	ND	ND
HEp-2C	cervix	?	70 ± 13	13 ± 8	>> 200	> 100
Ca Ski	cervix	?	81 ± 5	34 ± 1	>> 200	ND
PC-3	próstata	sí	280 ± 8	29 ± 3	>> 400	> 100
DU 145	próstata	sí	57 ± 8	7 ± 3	ND	ND
LNCaP	próstata	sí	83 ± 15	5 ± 1	ND	ND
SW948	colon	sí	240 ± 42	38 ± 1	>> 400	> 100
HT-29	colon	sí	61 ± 8	17 ± 3	ND	ND
LS174T	colon	sí	80 ± 16	6 ± 4	ND	ND
MRC-5-R31	pulmón	no	113 ± 1	55 ± 6	>> 400	> 100
HACAT	piel	no	248 ± 2	ND	ND	ND
F. Retina	retina	no	195 ± 11	ND	ND	ND
Vero	rinón	no	197 ± 14	ND	ND	ND

* La descripción del origen y tumorigenicidad se corresponde con la ATCC.

** Estimada empleando el programa CalcuSyn ($r > 0,90$). Valores medios de tres réplicas experimentales. Se realizaron al menos dos experimentos independientes.

*** ND, no determinado. PPCmut-P15 y PPC- no mostraron inhibición de la proliferación a dosis inferiores a 200 μM en las cinco líneas seleccionadas: NCI-H125, Hep-2C, SiHa, SW948 y PC-3.

10.3 Anexo 3. Curvas dosis-respuesta representativas del efecto antiproliferativo del PPC Tat en seis líneas celulares tumorales. Las curvas se generaron empleando el programa CalcuSyn a partir de los datos de inhibición de la proliferación obtenidos del ensayo de sulforrodamina B.



10.4 Anexo 4. Proteínas que interactúan *in vivo* con el CIGB-300 en la línea celular NCI-H82 identificadas mediante análisis por espectrometría de masas.

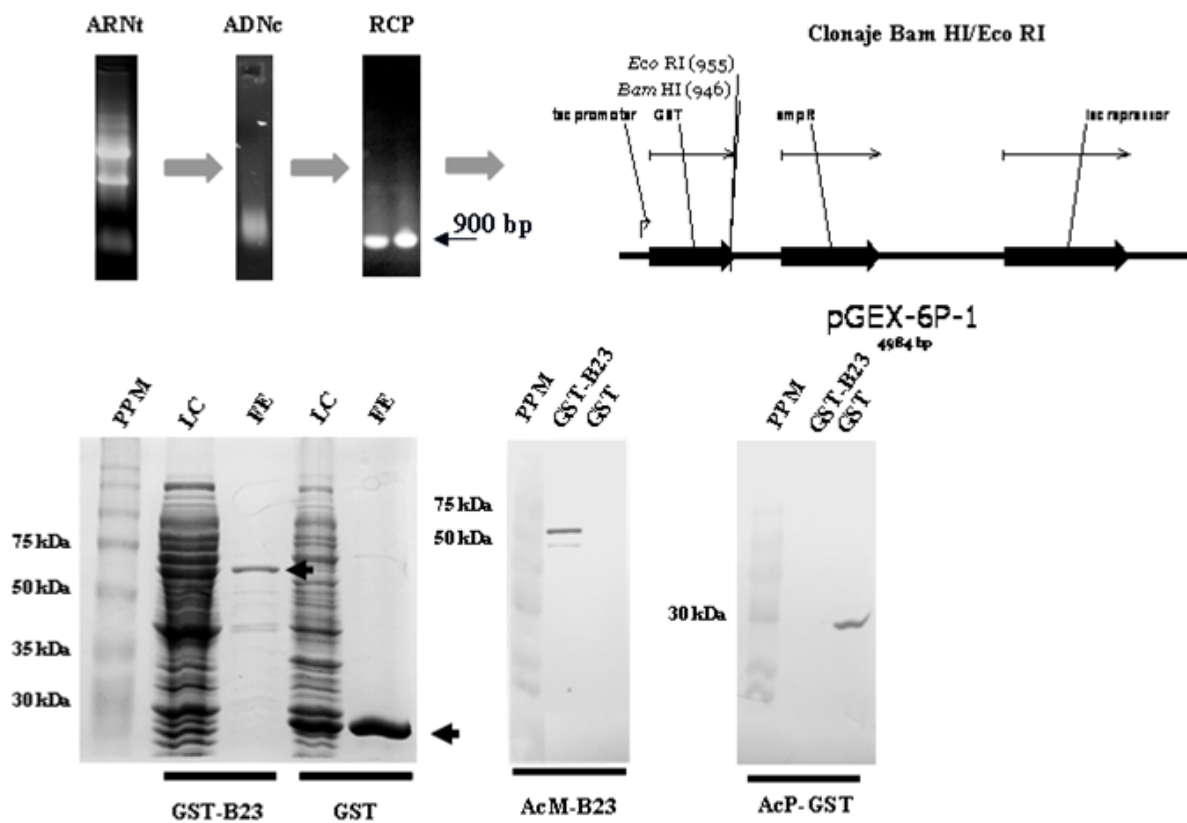
Clasificación Funcional	Denominación (nombre oficial del gen)	Código Swiss-Prot	Péptidos identificados*	PM teórico (kDa)	Puntuación**	Probabilidad***		
Proteínas Estructurales del Ribosoma	Proteína Ribosomal subunidad pequeña 2 (RPS2)	P15880	SPYQEFTDHLVK	31	16	6.3E+00		
	Proteína Ribosomal subunidad pequeña 3 (RPS3)	P23396	TEIILATR AELNEFLTR IMLPWDPTGK ELAEDGYSGVEVR KPLPDHVSIVEPK DEILPTPISEQK FGFPEGSVELYAEK FVDGLMIHSGDPVNYVDTAVR	27 40 27 59 24 19 14 33	33 40 27 59 24 19 14 33	1.5E-01 2.4E-02 5.5E-01 2.7E-04 9.6E-01 3.0E+00 1.1E+01 8.6E-02		
	Proteína Ribosomal subunidad pequeña 3a (RPS3a)	P61247	APAMFNIR VFEVSLADLQNDVAFR	30	19 97	3.9E+00 3.5E-08		
	Proteína Ribosomal subunidad pequeña 4 (RPS4)	P62701	YDPDLIK LSNIFVIGK GNKPWISLPR GIPHLVTHDAR VNDTIQIDLETGK	30	19 42 28 10 73	4.7E+00 1.9E-02 3.9E-01 2.9E+01 1.2E-05		
	Proteína Ribosomal subunidad pequeña 5 (RPS5)	P46782	TEWETAAPVAETPDIK WSTDVQINDISLQDYIAVK	23	44 29	1.9E-03 4.2E-02		
	Proteína Ribosomal subunidad pequeña 6 (RPS6)	P62753	DIPGLDITTVPR MATEVAADALGEEWK	29	25 30	7.6E-01 2.2E-01		
	Proteína Ribosomal subunidad pequeña 8 (RPS8)	P62241	LTPEEEEILNK ISSLLEEQFQQGK IIDVVYNASNNELVR	24	30 85 46	2.5E-01 7.6E-07 5.5E-03		
	Proteína Ribosomal subunidad pequeña 14 (RPS14)	P62263	TPGPGAQSALR IEDVTPIPSDSTR IEDVTPIPSDSTR	16	26 26 27	2.2E-01 2.2E-01 1.7E-01		
	Proteína Ribosomal subunidad pequeña 16 (RPS16)	P62249	GPLQSVQVFR	17	41	7.7E-03		
	Proteína Ribosomal subunidad pequeña 18 (RPS18)	P62269	AGELTEDEVER YSQVLANGLDNK	18	28 32	1.4E-01 4.8E-02		
	Proteína Ribosomal subunidad pequeña 19 (RPS19)	P39019	ELAPYDENWFYTR	16	15	2.4E+00		
	Proteína Ribosomal subunidad pequeña 24 (RPS24)	P62847	TTGFGMIYDSLDAK	15	42	3.2E-03		
	Proteína Ribosomal subunidad mayor 22 (RPL22)	P35268	AGNLGGGVVTIER	15	40	2.1E-02		
	Biogénesis Ribosomal	Nucleolina (C23)	P19338	TGISDVFAKNDLAVVDVR GLSEDTEETLKESEFDGSR TLVLSNLSYSATEETLQEVFEK NLPYKVTQDELKEVFEDAAEIR ATFIKVPQNGK	77	25 23 37 13 1	6.6E-01 9.2E-01 3.4E-02 8.6E+00 2.1E+02	
		Nucleofosmina (B23)	P06748	VDNDENEHQLSLR DELHIVEAEAMNYEGSPIK MSVQPTVSLGGFEITPPVLR LAADEDDDDDEDDDDDDDFDDEEAEK	33	43 37 47 59	1.2E-02 3.6E-02 3.6E-03 1.4E-04	
		Traducción de proteínas	Factor de elongación 1-alfa 1 (eEF1A-1)	P68104	QLIVGVNK QTVAVGVK LPLQDVYK IGGIGTVPVGR STTTGHLIYK EHALLAYTLGVK YYVTIADAPGHR THINIVIGHVDSGK VETGVLKPGMVVTFAPVNVTEVK	50	19 26 29 49 41 38 40 42 20	3.2E+00 8.0E-01 3.7E-01 3.0E-03 2.0E-02 4.3E-02 2.7E-02 1.6E-02 1.8E+00
			Componente del complemento IQ (CIQBP)	Q07021	EVSFQSTGESEWK MSGGWELELNGTEAK AFVDFLSDEIKEER VEEQPELTSTPNFVVEVIK ITVTFNINNSIPPTFDGEEEPSQGQK ALVLDCHYPEDEVGQDEAESDIFSIR	31	60 64 60 46 36 46	2.2E-04 8.7E-05 2.2E-04 4.6E-03 4.2E-02 3.2E-03
			Tubulina alfa-cadena 6 (TBA1C)	Q9BQE3	AVFDLEPTVIDEVR VGINYQPPTVPPGGDLAK TIGGGDDSFNTFFSETGAGK QLFHPEQLITGKEDAANNYAR	50	41 10 86 8	1.8E-02 2.2E+01 5.0E-07 2.9E+01
			Tubulina beta-cadena 5 (TBB5)	P07437	AILDLEPGTMDSVR ALTVPPELTQQVFDK SGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAK	50	35 21 59	6.9E-02 1.2E+00 1.9E-04
	Serina hidroximetil transferasa (SHMT)		P34897	LGAPALTSR LIIAGTSAYAR	56	37 41	5.0E-02 5.7E-03	

* Número y secuencia de los péptidos identificados para cada proteína.

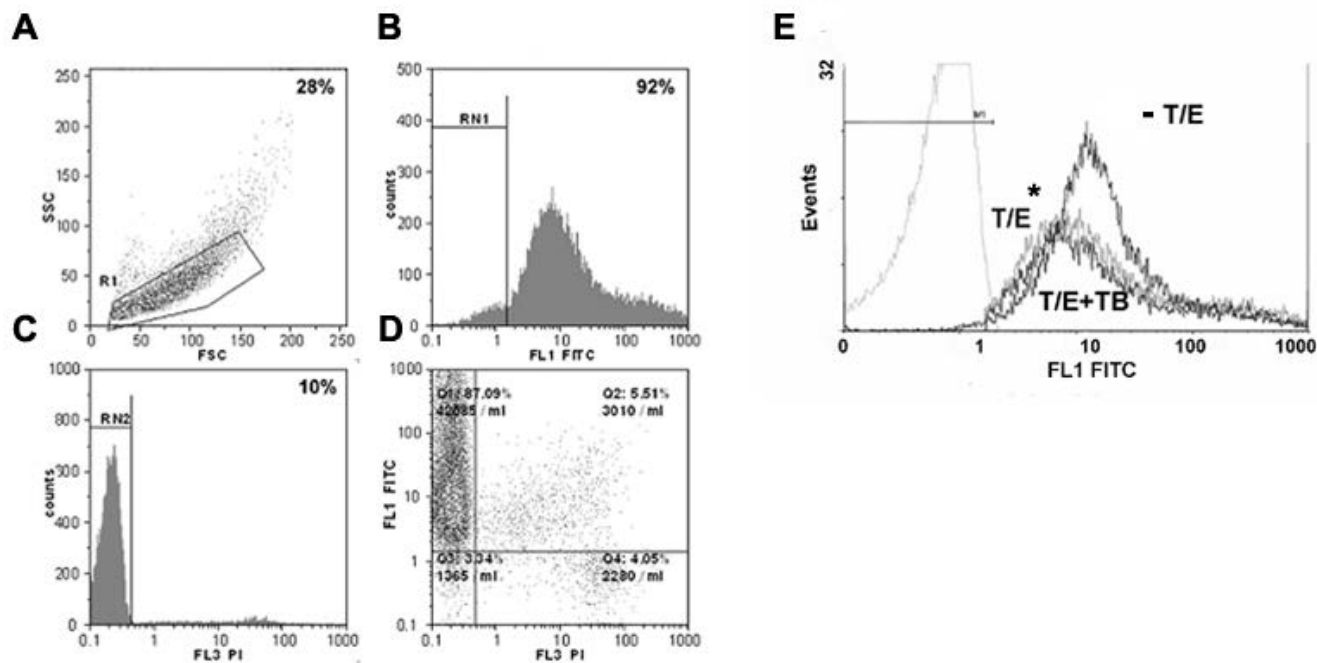
** del inglés "Score": medida de la correlación entre las señales del espectro de masas obtenido para un péptido particular y las señales esperadas para dicho péptido en una base de datos teórica.

*** del inglés "Expected Value": probabilidad de una asignación errónea.

10.5 Anexo 5. Clonaje, expresión y semipurificación de la proteína recombinante de fusión GST-B23 empleando el vector comercial pGEX-6P2 y el kit MicroSpin GST Purification Module.

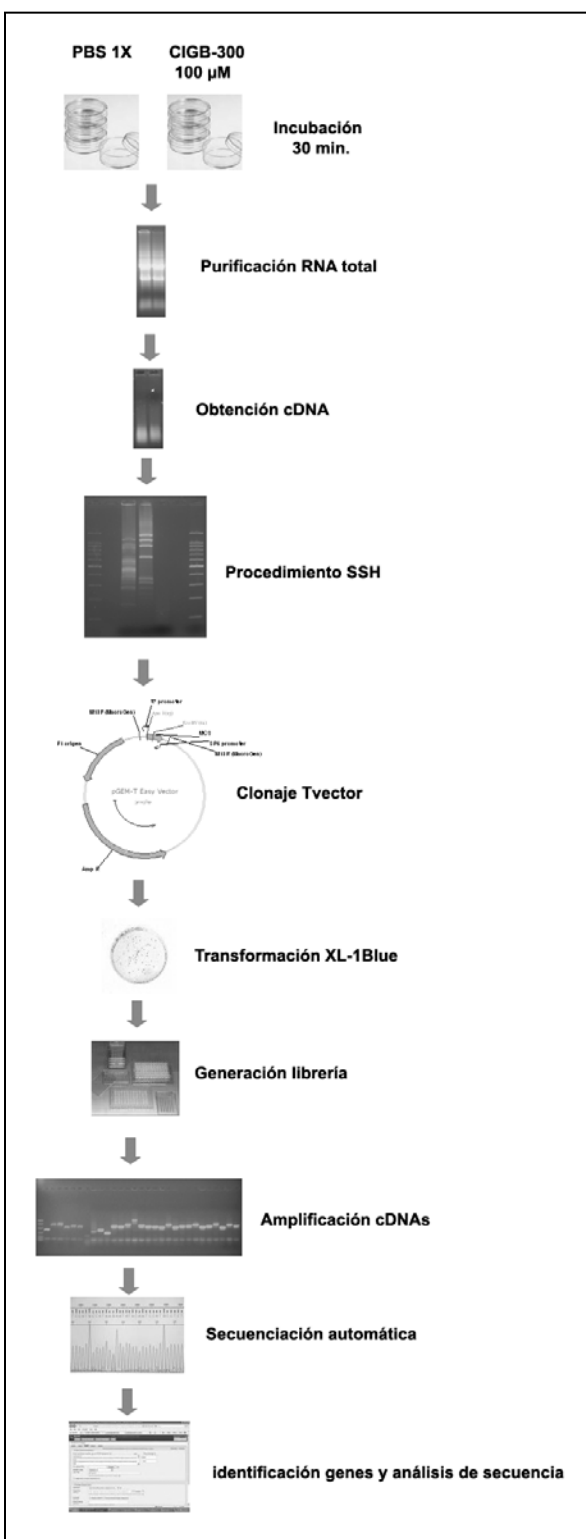


10.6 Anexo 6. Gráficos representativos del análisis mediante citometría de flujo del proceso de internalización del conjugado CIGB-300-F en la línea celular NCI-H125. (A) ploteo SSC vs FSC; (B) histograma emisión FL1 del CIGB-300-F; (C) histograma emisión FL3 del ioduro de propidio; (D) ploteo de puntos FL1 vs FL3 donde se definen los cuatro cuadrantes correspondientes a cada una de las poblaciones celulares Q1: células positivas a CIGB-300-F, Q2: células transducidas por el péptido y con membrana celular dañada (doble-positivas), Q3: células viables no transducidas por el CIGB-300-F, y Q4: células con membrana celular dañada; (E) Verificación de la eficiencia del proceso de eliminación del CIGB-300-F extracelular mediante el tratamiento extensivo con tripsina.



* T/E, Tripsina/EDTA; TB, Tripán blue utilizado como agente apagador de la fluorescencia extracelular.

10.7 Anexo 7. Descripción del proceso de obtención de la biblioteca de genes regulados diferencialmente en células NCI-H125 en presencia del péptido CIGB-300 utilizando la metodología de SSH (BD PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit, BD Biosciences-Clontech).



* Solo se enviaron a secuenciar los clones que resultaron positivos en la reacción de PCR con los oligos correspondientes al T_v (95%).
 ** Se calcula con relación a los clones secuenciados e incluye también un número pequeño de clones donde no se encontró inserto ADNc a pesar de resultar positivos en la reacción de PCR previa a la secuenciación.
 *** Representados por al menos dos clones.
 **** De acuerdo a la base de datos Entrez-Gene.

No. Clones	Enviados a Sec.*	Secuenciados	No Homología**	Genes Identificados	Identificación Redundante***	Denominación Oficial****
398	378	352	120	48	16	41
Porcentos		93%	34%	14%	33%	85%

10.8 Anexo 8. Lista de genes regulados diferencialmente por el CIGB-300 en las células NCI-H125 identificados en la librería de hibridación substractiva.

Clon	BLAST *	Denominación Oficial Gene	Descripción	Puntuación**	Valor E***	Frecuencia Recobrado****
01-2D	gi 62897725 dbj BAD96802.1	RPL19	ribosomal protein L19 variant	58.5	4.00E-07	1
01-2E	gi 56181368 gb AAV83778.1	NACA	HSD48	212	2.00E-53	5
01-2F	gi 113201653 gb AB133033.1	ND1	NADH dehydrogenase subunit 1	60.1	1.00E-07	1
01-3F	gi 62897609 dbj BAD96744.1	TUBA1C	tubulin alpha 6 variant	102	2.00E-20	4
01-4D	gi 41471962 gb AAS07418.1	DBF4	unknown	93.6	1.00E-17	1
01-4G	gi 30585339 gb AAP36942.1	ATP5A1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, is	291	3.00E-77	6
01-5D	gi 83282419 ref XP_729762.1	-	senescence-associated protein [Plasmodium yoelii yoelii str.]	89.7	3.00E-19	2
01-5G	gi 30410790 ref NP_839952.1	TUSC3	tumor suppressor candidate 3 isoform b	149	1.00E-34	1
01-7B	gi 62089150 dbj BAD93019.1	UBC	ubiquitin C variant	179	2.00E-43	1
01-7F	gi 34531284 dbj BA C86100.1	FUT1	unnamed protein product	137	6.00E-31	1
01-7G	gi 33987931 gb AAH07327.1	HSP90AB1	HSP90AB1 protein	139	2.00E-31	1
01-8C	gi 5138926 gb AAD40380.1	SPCS1	HSPC033	140	1.00E-31	1
01-11C	gi 30584593 gb AAP36549.1	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	294	1.00E-84	1
02-1G	gi 89243544 gb AAI14378.1	-	Unknown (protein for MGC:134704)	140	7.00E-32	12
02-3E	gi 4588085 gb AAD25980.1 AF095770_1	BBS9	PTH-responsive osteosarcoma D1 protein	52.8	2.00E-05	7
02-3G	gi 12006209 gb AAG44787.1 AF271776_1	-	DC48	100	6.00E-20	2
02-3H	gi 38570357 gb AAR24619.1	GNB2L1	proliferation-inducing gene 21	266	1.00E-69	1
02-4F	gi 4506743 ref NP_001003.1	RPS8	ribosomal protein S8	194	6.00E-48	2
02-6D	gi 3123174 sp Q16465 YZA1_HUMAN	-	Very hypothetical protein	145	2.00E-33	2
02-6F	gi 62897625 dbj BAD96752.1	ACTB	beta actin variant	180	6.00E-44	1
02-6H	gi 18148478 dbj BAB83275.1	-	core protein, Hepatitis C virus	58.9	6.00E-10	1
02-7A	gi 52783077 sp Q8IVG9 HUNIN_HUMAN	MTRNR2L1	Humanin	50.8	8.00E-05	5
02-7B	gi 22538467 ref NP_002787.2	PSMB4	proteasome beta 4 subunit	92.4	2.00E-17	1
02-7D	gi 111072199 emb CA197597.1	COX1	cytochrome c oxidase subunit I	263	8.00E-69	1
02-8H	gi 90819907 gb ABD98705.1	ND4	NADH dehydrogenase subunit 4	110	1.00E-22	1
02-11F	gi 34531176 dbj BA C86070.1	-	unnamed protein product	75.1	4.00E-12	1
03-3D	>gi 119628808 gb EAX08403.1	GTF3A	general transcription factor IIIA, isoform CRA_a	94	8.00E-18	1
03-4B	>gi 20381196 gb AAH27620.1	RPS6	Ribosomal protein S6	347	4.00E-94	2
03-4C	>gi 119608470 gb EAW88064.1	RPL7A	ribosomal protein L7a, isoform CRA_d	305	2.00E-81	1
03-4E	>gi 119593494 gb EAW73088.1	RPL5	ribosomal protein L5, isoform CRA_b	183	8.00E-45	2
03-6B	>gi 119380263 gb ABL73299.1	COX2	cytochrome c oxidase subunit II	106	1.00E-21	12
03-7E	gi 55665435 emb CAH73371.1	H3F3A	H3 histone, family 3A	89.4	2.00E-16	17
03-7G	gi 3088339 dbj BAA25818.1	RPS11	ribosomal protein S11	100	9.00E-20	1
03-8C	gi 60299991 gb AAX18645.1	STI3	aging-associated protein 14b	103	1.00E-20	1
03-8H	gi 119621461 gb EAX01056.1	RPS7	ribosomal protein S7, isoform CRA_a	148	2.00E-34	1
03-9A	gi 66911843 gb AAH96826.1	DDX24	DDX24 protein	281	2.00E-74	1
03-12C	gi 106322 pir B34087	-	hypothetical protein (LIH 3' region)	102	2.00E-20	1
04-3C	>gi 119591124 gb EAW70718.1	TUBA4A	tubulin, alpha 1 (testis specific), isoform CRA_a	54.3	7.00E-06	1
04-5A	gi 119221174 gb ABL61722.1	CYTb	cytochrome b	126	2.00E-27	7
04-5G	gi 2981233 gb AAC06259.1	BUB1	mitotic checkpoint kinase Bub1	90.1	1.00E-16	1
04-6G	gi 119594429 gb EAW74023.1	EEF1G	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma, isoform CRA_a	191	3.00E-47	1
04-8H	gi 56078799 gb AAH53371.1	RPS27	Ribosomal protein S27a	83.6	1.00E-14	1
01-2H	gi 86450659 gb ABC96597.1	ATP6	ATP synthase F0 subunit 6	153	8.00E-36	24
R1-10	gi 67508866 emb AJ973596.1	PQBP1	mRNA for polyglutamine binding protein variant 4	829	0.00E+00	1
R1-12	gi 129395718 gb EF362804.1	EEF1A1	EF1a mRNA, complete cds	859	0.00E+00	1
R1-14	gi 5714635 gb AF159295.1 AF159295	MARK3	serine/threonine protein kinase Kp78 splice variant CTAK75a mRNA	724	0.00E+00	1
R1-21	gi 206725537 ref NR_024163.1	CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B (CKS1B), transcript variant 2,	919	0.00E+00	1
R1-14	gi 225637497 ref NR_003286.2	RN18S1	18S ribosomal RNA (LOC100008588), non-coding RNA	724	0.00E+00	1

* BLASTN nr (GenBank+EMBL+DDBJ+PDB).

** del inglés "Score".

*** del inglés "Expected Value".

**** Número de veces en que se identificó el gen en la librería.

10.9 Anexo 9. Agrupamiento de acuerdo a la anotación funcional (*del inglés "Functional Annotation Clustering"*) realizada por el programa DAVID de los genes regulados diferencialmente en la línea celular NCI-H125 en presencia del CIGB-300.

112

Clúster	Factor	Categorías de Anotación	Término principal	# Genes	Probabilidad	Genes Incluidos
		GOTERM_BP_FAT	Traducción	12	1.91E-10	EEF1A1, RPS27, RPL19, NACA, UBC, EEF1G, RPL5, RPL7A, RPS11, RPS6, RPS8, RPS7
1	8.4	SP_PIR_KEYWORDS KEGG_PATHWAY	Proteína Ribosomal Ribosoma	9	1.35E-09	RPS27, RPL19, UBC, RPL5, RPL7A, RPS11, RPS6, RPS8, RPS7
				8	1.26E-07	RPS27, RPL19, RPL5, RPL7A, RPS11, RPS6, RPS8, RPS7
		GOTERM_BP_FAT	Síntesis de ATP Mitochondrial	5	9.00E-05	ND1, ND4, CON2, ATP5A1, ATP6
2	2.5	SP_PIR_KEYWORDS KEGG_PATHWAY	Complejo Asociado a la Membrana Fosforilación Oxidativa	5	3.18E-07	ND1, ND4, CON2, ATP5A1, ATP6
				5	3.40E-03	ND1, ND4, CON2, ATP5A1, ATP6
3	1.5	GOTERM_BP_FAT	Biogénesis Ribosomal	4	3.20E-03	RPL5, RPL7A, RPS6, RPS7
4	1	GOTERM_BP_FAT	Ciclo Celular Mitótico	4	6.05E-02	PSMB4, DBF4, UBC, BUB1
5	0.8	GOTERM_BP_FAT	Regulación de Procesos Metabólicos de Proteínas	3	7.11E-02	HSP90A1, PSMB4, UBC

* Las anotaciones seleccionadas para realizar el agrupamiento fueron: Categorías Funcionales (SP_PIR_KEYWORDS), Ontología Genes (GOTERM_BP_FAT), rutas de señalización (KEGG_PATHWAY), Dominios de proteínas (INTERPRO).

** Solo se incluyeron en el análisis 37/41 genes cuya denominación oficial se corresponde con un identificador o id en el programa DAVID. Los cuatro restantes genes (COX1, CYTB, TUBA4A, MTRNR2L1) no fueron identificados por el programa.

***Mediante anotación manual empleando el ENTEZ-GENE los genes COX1 y CYTB pueden incluirse en la síntesis de ATP mitocondrial; DDx24 y GTFIIIA participan en la biogénesis ribosomal; KKS1B, conocida como la subunidad reguladora 1B de la quinasa cdc28, participa en la mitosis.

Datos generales del documento:

Total de páginas: 113

Introducción: 5

Revisión: 19

Materiales y métodos: 15

Resultados: 32

Discusión: 15

Conclusiones: 1

Recomendaciones: 1

Referencias: 11

Bibliografía del autor: 4

Anexos: 10