



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE PÉPTIDOS PENETRADORES CELULARES
SELECTIVOS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
RAFAEL UBALDO MORÁN TORRES**

TUTOR PRINCIPAL
Dr. GABRIEL DEL RÍO GUERRA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. ADÁN OSWALDO GUERRERO CÁRDENAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM
Dra. LOURDES MASSIEU TRIGO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

Ciudad de México. Marzo, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PMDCB/2741/2018

Morán Torres Rafael Ubaldo
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

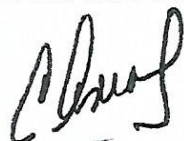
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día **12 de noviembre** del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis **“Diseño y evaluación de péptidos penetradores celulares selectivos”**, dirigida por el/la Dr(a). **Del Río Guerra Gabriel**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Vaca Domínguez Luis Alfonso
VOCAL	Velasco Velázquez Marco Antonio
VOCAL	Torres Larios Alfredo
VOCAL	Sosa Peinado Alejandro
SECRETARIO	Corzo Bruguete Gerardo

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
“POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de noviembre de 2018.
COORDINADORA



Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

“La música, los estados de felicidad, la mitología, las caras trabajadas por el tiempo, ciertos crepúsculos y ciertos lugares, quieren decirnos algo, o algo dijeron que no hubiéramos debido perder, o están por decir algo; esta inminencia de una revelación, que no se produce, es, quizá, el hecho estético.”

Jorge Luis Borges

Dedicatoria

A mis padres Rafael y Claudia por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida, por los valores que me han inculcado y sobre todo por el gran amor, los consejos y consuelos brindados. A mis hermanos Héctor, Raúl y Mariela por estar siempre presentes, acompañándome en este camino de descubrimientos incesantes. A cada uno de mis amigos más cercanos, por cada momento compartido. A Briseida por el cariño, paciencia y apoyo incondicionales que ayudan a mantenerme motivado. A la vida por este estado de consciencia.

Agradecimientos:

Agradezco al Dr. Gabriel del Río Guerra por aceptarme en su equipo de trabajo, por su apoyo, por compartir su conocimiento y por su constante guía en este quehacer científico.

A la Dra. Lourdes Massieu y el Dr. Adán Guerrero miembros de mi comité tutorial, quienes contribuyeron con sus observaciones durante el desarrollo del trabajo aquí presentado.

A las Doctoras María Teresa Lara y Beatriz Aguilar Maldonado por su apoyo brindado como técnicos académicos en los laboratorios donde realicé mis experimentos.

A la comunidad del Instituto de Fisiología Celular por brindar su apoyo cuando necesitaba algún reactivo, material o equipo para realizar mis experimentos.

A Ricardo, Jonathan, Erika, David, Vladimir, Rodrigo y Daniel por su ayuda y orientación en la realización de mis experimentos y por su excelente amistad.

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Facultad de Química de la UNAM.

Al Programa de Apoyo a los Estudiantes del Postgrado (PAEP).

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. HIPOTESIS	5
III. OBJETIVOS.....	6
IV. MARCO TEORICO	7
4.1 Péptidos Penetradores Celulares	7
4.1.1 Clasificación.....	8
4.1.2 Internalización.....	12
4.1.3 Predicción y Diseño	17
4.2 Neprilisina	22
4.2.1 Actividad y Especificidad	22
4.2.2 Aspectos Biológicos	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5.1 Diseño de ACPD.....	24
5.1.1 Estrategia Peptidasa-Péptido	24
5.2 Análisis de los niveles de expresión proteica de neprilisina en las líneas celulares HEK293T y HeLa.....	25
5.3 Evaluación de la asociación e internalización peptídica mediante microscopía de epifluorescencia y confocal	25
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
6.1 Diseño de ACPD.....	27
6.2 Análisis de los niveles de expresión proteica de neprilisina.....	28
6.3 Evaluación de la asociación e internalización peptídica mediante microscopía de epifluorescencia y confocal	29
VII. CONCLUSIÓN.....	41
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	42
IX. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA MOLECULAR TEÓRICA DE LOS BIOPÓRTIDOS, SEGÚN SU ORGANIZACIÓN EN TÁNDEM (“SYCHNOLOGIC”) O DISCONTINUA (“RHEGNYLOGIC”).	12
FIGURA 2. VÍAS INTRACELULARES DE LA INTERNALIZACIÓN DE PÉPTIDOS PENETRADORES CELULARES...	13
FIGURA 3. EJEMPLOS DE LOS MECANISMOS PROPUESTOS PARA LA TRANSLOCACIÓN DIRECTA..	14
FIGURA 4. UN TÍPICO [3-4-2] PERCEPTRÓN MULTICAPA ANN CON APRENDIZAJE POR RETROALIMENTACIÓN.	19
FIGURA 5. EL CASO MÁS SIMPLE DE DIVISIÓN DE DATOS (AMARILLOS Y VERDES) EN DOS GRUPOS EN DOS DIMENSIONES (X1 Y X2). UN SVM ES ENTRENADO PARA MAXIMIZAR LA DISTANCIA 2W ENTRE LOS DOS GRUPOS.	20
FIGURA 6. METODOLOGÍA USADA PARA LA IDENTIFICACIÓN Y DISEÑO DE CPP.	21
FIGURA 7. NIVELES DE EXPRESIÓN PROTEICA DE NEPRILISINA EN LAS LÍNEAS CELULARES HEK293T Y HELA.	29
FIGURA 8. MICROGRAFÍAS TOMADAS CON MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA (30X) PARA CÉLULAS HEK293T A UNA CONCENTRACIÓN DE PÉPTIDO DE 10 mM.	31
FIGURA 9. MICROGRAFÍAS TOMADAS CON MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA (30X) PARA CÉLULAS HEK293T A UNA CONCENTRACIÓN DE PÉPTIDO DE 5 mM.	31
FIGURA 10. MICROGRAFÍAS TOMADAS CON MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA (30X) PARA CÉLULAS HEK293T A UNA CONCENTRACIÓN DE PÉPTIDO DE 1 mM.	32
FIGURA 11. MICROGRAFÍAS TOMADAS CON MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA (30X) PARA CÉLULAS HELA A UNA CONCENTRACIÓN DE PÉPTIDO DE 10 mM.	33
FIGURA 12. MICROGRAFÍAS TOMADAS CON MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA (30X) PARA CÉLULAS HELA A UNA CONCENTRACIÓN DE PÉPTIDO DE 5 mM.	34
FIGURA 13. MICROGRAFÍAS TOMADAS CON MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA (30X) PARA CÉLULAS HELA A UNA CONCENTRACIÓN DE PÉPTIDO DE 1 mM.	34
FIGURA 14. VÍAS DE INTERNALIZACIÓN ENCONTRADAS EN EL PÉPTIDO 1 (YGRKKRRQRRRFFG) PARA AMBAS LÍNEAS CELULARES A UNA CONCENTRACIÓN DE 10 mM.	35
FIGURA 15. DIAGRAMA DE CAJA PARA LAS INTENSIDADES DE FLUORESCENCIA ENCONTRADAS EN 1,200 CÉLULAS PARA LOS DISTINTOS PÉPTIDOS EN LAS LÍNEAS CELULARES HEK293T (ROJO) Y HELA (AZUL).	36
FIGURA 16. PROYECCIÓN EN 3 DIMENSIONES PARA LOS PÉPTIDOS 1, 2 Y 4 EN AMBAS LÍNEAS CELULARES A UNA CONCENTRACIÓN DE 10 mM OBTENIDAS A PARTIR DE MICROSCOPIA CONFOCAL.	38

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. EJEMPLOS DE CPP USADOS EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES.....	7
TABLA 2. PÉPTIDOS NO PENETRADORES DISEÑADOS A PARTIR DE TAT PARA SER DIGERIDOS POR NEP.....	27
TABLA 3. SECUENCIAS DISEÑADAS PARA LA ESTRATEGIA PEPTIDASA-PÉPTIDO.....	28

RESUMEN

Los péptidos penetradores celulares (CPP, *por sus siglas en inglés*) son péptidos de 50 aminoácidos o menos que pueden penetrar la membrana plasmática, por lo que se han usado como acarreadores de fármacos y como fármacos por sí mismos en el tratamiento de diversas enfermedades. La gran limitante de esta poderosa tecnología es que no es selectiva, es decir, estos péptidos pueden acarrear el fármaco a cualquier célula, incluso si esta no está involucrada con la enfermedad o el disturbio fisiológico. En este trabajo se propone una solución a este problema de selectividad, mediante una estrategia llamada Peptidasa-Péptido, la cual consiste en diseñar CPP que al añadirle residuos de aminoácidos pierdan la capacidad de ser penetradores; los residuos añadidos pueden ser escindidos por una proteasa, en este caso la peptidasa usada fue la neprilisina (NEP, *por sus siglas en inglés*). Se diseñaron CPP fluorogénicos para probar esta estrategia a partir del conocido péptido penetrador Tat, al cual se le agregó la secuencia necesaria para eliminar su actividad penetradora y el sitio de corte para NEP. Estos péptidos fueron evaluados mediante microscopia de epifluorescencia en dos líneas celulares, HeLa y HEK293T, teniendo las primeras 2 veces más expresión proteica de NEP que las segundas. Nuestros resultados con microscopia de epifluorescencia y confocal muestran que acorde a lo esperado, las células HeLa internalizan más los péptidos diseñados que las HEK293T indicando que esta estrategia puede ayudar a dirigir CPP a tejidos en donde se expresen peptidasas de interés.

ABSTRACT

Cell penetrating peptides (CPP) are short peptides that can translocate cellular membranes. CPP have been used as drug carriers and as drugs themselves in the treatment of different diseases. The limitation of this powerful technology is that it lacks selectivity, in other words, these peptides can carry drugs to any cell, without distinction. This work proposes a solution to this problem, by using a strategy called Peptidase-Peptide, which consist in embedding CPP sequences into non-CPP sequences, where the penetrating activity can only be activated by cleaving off the CPP sequence from the non-CPP sequence. For this work the membrane peptidase used was Neprilysin (NEP). Four Tat-based fluorogenic peptides were designed and tested in two cell lines (HeLa and HEK293T) by epifluorescence microscopy where HeLa has 2 times higher protein levels of NEP than HEK293T cells. Our confocal microscopy results verified that the cell line HeLa internalized larger amounts of these peptides than HEK293T cells, indicating that our strategy effectively lead to the internalization of CPP into tissues expressing a desired peptidase.

I. INTRODUCCIÓN

Los péptidos penetradores celulares (CPP, *por sus siglas en inglés*) o dominios de transducción proteica son un grupo de péptidos de una longitud menor a 50 residuos de aminoácidos, caracterizados por la capacidad de cruzar membranas plasmáticas (Milletti, 2012; Patel, Zaro, & Shen, 2007; Stalmans et al., 2015). La clasificación más usual para estos péptidos está dada por las propiedades fisicoquímicas que estos tengan (catiónicos, anfipáticos e hidrofóbicos). El mecanismo de internalización de los CPP puede ser por translocación directa o mediada por endocitosis. Sin embargo, en la actualidad no se puede hacer un diseño de CPP en donde se pueda elegir el mecanismo por el que serán internalizados. Esto es debido a que dicha internalización depende de factores tales como el tipo de péptido, la concentración de este (Brock, 2014), el cargo conjugado (Maiolo, Ottinger, & Ferrer, 2004) y la línea celular usada (Koren & Torchilin, 2012; Ramsey & Flynn, 2015).

Se ha reportado el co-transporte de diversos bioactivos mediante el uso de CPP al interior de células, en donde destacan péptidos (Morin et al., 2003), proteínas (Dinca, Chien, & Chin, 2016), ácidos nucleicos (Layek, Lipp, & Singh, 2015) y siRNA (Freire et al., 2017).

En nuestro grupo, el diseño de CPP se realiza mediante métodos basados en algoritmos de aprendizaje de máquina (*machine learning*), en donde a partir de una secuencia de aminoácidos cualquiera, se obtiene una predicción de la probabilidad de que ésta sea penetradora, y con ayuda de un algoritmo de optimización, se añaden residuos de aminoácidos en los extremos N y/o C terminales para mejorar la probabilidad de que la secuencia sea penetradora (Diener et al., 2016). Sin embargo, uno de los grandes retos científicos para la mejora de estos péptidos es el conferirles selectividad celular. Para atender este problema, en este trabajo se describe una estrategia para conferir selectividad a CPP que se ha reportado anteriormente denominada péptidos penetradores celulares activables (ACPP, *por sus siglas en inglés*), en la cual, a un CPP se le añade una secuencia de aminoácidos reconocida por una proteasa deseada y otros residuos adicionales para que la secuencia completa pierda su capacidad de ser penetradora (Shi, Gao, Xiang, & Qi, 2012; Yoo, Rejinold, Lee, Jon, & Kim, 2017). En este trabajo se diseñaron ACPP que tienen como proteasa blanco a la neprilisina, la cual es una metaloendopeptidasa integral de membrana con una secuencia de corte óptima -Phe-Phe-Gly|Phe-Leu-Ala- (Hershl & Morihara, 1986;

Pozsgay, Michaud, Liebman, & Orłowski, 1986). Dicha secuencia esta embebida en los ACPP diseñados. Por lo que se espera que estos, al llegar a un ambiente en donde se exprese la neprilisina sean hidrolizados, liberando así, al CPP en la célula diana.

En este trabajo se presenta el diseño computacional y evaluación experimental de esta estrategia usando células de mamífero en cultivo.

II. HIPOTESIS

Los péptidos penetradores embebidos dentro de secuencias no penetradoras usando el enfoque Peptidasa-Péptido, se internalizarán más en aquellas células que expresen mayor cantidad de peptidasa en su superficie.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

- Diseñar péptidos penetradores celulares selectivos mediante el uso de métodos computacionales (*machine learning*), a partir de una estrategia que favorezca su internalización selectiva en células que presenten una peptidasa en la membrana plasmática.

Objetivos específicos

- Diseñar péptidos con la estrategia ACPP.
- Evaluar en HEK293T y HeLa la penetrabilidad de los péptidos diseñados mediante microscopia de fluorescencia.

IV. MARCO TEORICO

4.1 Péptidos Penetradores Celulares

La observación por Frankel y Pabo en los 1980s que proteínas podían cruzar la membrana celular estudiando a la proteína Tat del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) resultaba contradictoria a la creencia de que la membrana plasmática era impermeable a moléculas hidrofílicas. Los resultados de este grupo promovieron el estudio sobre mecanismos de internalización celular (Bechara & Sagan, 2013).

Los péptidos penetradores celulares son definidos como secuencias peptídicas menores a 50 aminoácidos, que son capaces de cruzar membranas plasmáticas mediante mecanismos independientes y/o dependientes de energía (Pooga & Langel, 2015; Stalmans et al., 2013). Dichos CPP se han usado como acarreadores de fármacos y como fármacos por sí mismos, en el tratamiento de diversas enfermedades, como lo muestra la tabla 1 (Shi, Qi, Xiang, & Zhang, 2014), la cual fue modificada respecto a la tabla del trabajo original de Shi.

Tabla 1. Ejemplos de CPP usados en el tratamiento de enfermedades.

Fármaco	CPP	Cargo	Condición	Ref.
PsorBan	R8	Ciclosporina	Psoriasis	(Gait et al., 2007)
AZX-100	PTD ₄	Proteína de choque térmico 20	Prevención y tratamiento de cicatrices	(Lopes et al., 2009)
KAI-9803	Tat ₄₇₋₅₇	Inhibidor de la proteína quinasa C δ	Infarto de miocardio	(Y. et al., 2011)
AVI-5126	[(R-Ahx-R) ₄]	Anti sentido OMP	Enfermedades cardiovasculares	(Sheppard et al., 2011)
DTS-108	Vectocell®	SN38	Cáncer	(Boukaissi et al., 2008)
XG-102	Tat ₄₈₋₅₇	Quinasa c-Jun N-terminal	Inflamación	(Borsello et al., 2003)
p28	p28 (péptido de 28 aminoácidos derivado de la azurina	p28	Tumores sólidos refractarios	(Warso et al., 2013)

4.1.1 Clasificación

4.1.1.1 Propiedades Fisicoquímicas

Aunque los CPP tienen una amplia variedad de secuencias, se ha propuesto agruparlos en tres grandes grupos, según sus propiedades fisicoquímicas: catiónicos, anfipáticos e hidrofóbicos. Los primeros se distinguen por estar cargados positivamente debido a la presencia de lisinas y argininas en su secuencia, mientras que los péptidos anfipáticos se caracterizan por contener una parte hidrofóbica, así como otra hidrofílica en su secuencia, además de que ésta adopta una estructura helicoidal. En cuanto a la última clasificación, estos péptidos son ricos en aminoácidos apolares y tienen una carga neta baja (Stalmans et al., 2015).

4.1.1.1.1 Catiónicos

Los primeros CPP descubiertos fueron catiónicos, derivados de la proteína Tat del VIH (YGRKKRRQRRR). Estudios en péptidos constituidos exclusivamente de residuos de arginina (de R₃-R₁₂) mostraron que la secuencia peptídica mínima para la internalización celular es la octaarginina (R₈), y que el incremento del número de este aminoácido aumenta el nivel de translocación (Tünnemann et al., 2008). A pesar de presentar una carga neta similar, el uso del residuo lisina en los CPP conlleva a un perfil de internalización bajo. Esta diferencia puede atribuirse a que el grupo guanidino de la arginina es un componente estructural importante, responsable de conferir esta actividad biológica. Sugiriendo que los puentes de hidrogeno entre el grupo guanidino y los fosfolípidos de membrana están involucrados en los mecanismos de translocación (Dietz & Bähr, 2004). Otros residuos también pueden tener papeles importantes para la penetración celular. Por ejemplo, la actividad del péptido penetratina (RQIKIWFQNRRMKWKK) se pierde cuando hay un cambio del aminoácido triptófano de la posición 14 por una fenilalanina (Lindgren, Hällbrink, Prochiantz, & Langel, 2000).

El carácter catiónico no es suficiente para determinar la capacidad de penetrar células. Un ejemplo de ello son las secuencias de localización nuclear (NLS, *por sus siglas en inglés*). Estas son pequeñas secuencias conformadas por motivos ricos en lisina, arginina o prolina, los cuales pueden ser transportados al núcleo celular. A pesar de que la mayoría de estas no son consideradas como buenas penetradoras celulares, al ser conjugadas de manera covalente

con péptidos hidrofóbicos se obtienen péptidos anfipáticos con un buen perfil de internalización (Mueller, Kretzschmar, Volkmer, & Boisguerin, 2008; Ragin, Morgan, & Chmielewski, 2002).

4.1.1.1.2 Anfipáticos

Dentro de los péptidos anfipáticos se pueden reconocer dos grandes clases, según el nivel de estructuración de estos. La mayoría de los péptidos anfipáticos son quiméricos, obtenidos por un enlace covalente entre un domino hidrofóbico, el cual confiere orientación hacia la membrana y una secuencia NLS (penetradora) (Milletti, 2012). El resto son derivados de dominios proteicos. El otro gran grupo son péptidos anfipáticos con estructura secundaria de hélice α . Estos péptidos presentan una cara hidrofóbica y otra que puede ser catiónica, aniónica o polar. A pesar de que la mayoría de los péptidos penetradores anfipáticos son de índole catiónica, hay evidencia que sugiere en algunos péptidos que la translocación de membrana es una consecuencia de la anfipaticidad y no de la carga (Milletti, 2012; Oess & Hildt, 2000).

4.1.1.1.3 Hidrofóbicos

Los péptidos penetradores hidrofóbicos son considerados como aquellos que contienen en su secuencia solo aminoácidos apolares, tienen una carga neta baja, o que tienen un motivo o grupo químico hidrofóbico crucial para la internalización. Se conocen muy pocos CPP hidrofóbicos en comparación con los péptidos catiónicos y anfipáticos. El diseño de estos péptidos puede darse mediante conjugación de estos con otras moléculas, como olefinas, pirofosfato de farnesilo o geranilo-geranilo (prenilación) (Milletti, 2012).

4.1.1.2 Procedencia del Péptido

4.1.1.2.1 Proteínas de unión a Heparán

La heparina es un miembro de los glicosaminoglicanos (GAG, *por sus siglas en inglés*), carbohidratos caracterizados por presentar cadenas largas y no ramificadas de heteropolisacáridos. Muchos péptidos catiónicos tienen la peculiaridad de unirse a esta familia de carbohidratos, en un paso esencial antes de su internalización, por tanto, proteínas con dominios que se unan a GAG pueden ser una fuente de obtención de CPP. Estos péptidos tienen la ventaja de ser penetradores y ser orientados a la vez por GAG (Heinzelmann, Platz, Flodgaard, Polk, & Miller, 1999; Heistad et al., 2006).

4.1.1.2.2 Proteínas de unión a DNA y RNA

Debido a que los ácidos nucleicos están cargados negativamente por los grupos fosfato, muchas proteínas de unión a DNA y RNA presentan motivos altamente catiónicos. Las secuencias peptídicas en estos dominios de unión a ácidos nucleicos comparten el fundamento de unión por carga de las proteínas de unión a heparán. Entre los péptidos agrupados en este grupo, resaltan el Tat (unión a RNA) y la penetratina (unión a DNA) (Balayssac et al., 2006; Ziegler & Seelig, 2008). Este último, por ejemplo, se obtiene de la tercera hélice del homeodominio de *Drosophila Antennapedia* (Derossi et al., 1996).

4.1.1.2.3 Péptidos señal

Los dominios de localización celular de las proteínas son una fuente rica de péptidos penetradores celulares. Algunas proteínas son capaces de cruzar la membrana plasmática presentando secuencias de reconocimiento, las cuales son cruciales para su endocitosis. Los péptidos obtenidos a partir de la búsqueda de dichas secuencias se les denominan péptidos señal (Lin, Yao, Veach, Torgerson, & Hawiger, 1995; Oglęcka et al., 2006). Estos se caracterizan por presentar secuencias peptídicas cortas, entre 5-30 aminoácidos en el N-terminal de proteínas. Su función es marcar las proteínas que serán secretadas o especificar los organelos que deben de tener un procesado posterior. La mayoría de estos péptidos son generalmente anfipáticos y contienen una región central con carácter hidrofóbico, la cual puede conferirles la habilidad de cruzar la membrana plasmática, mediante el uso de un mecanismo independiente de endocitosis (Economou, Kalodimos, Karamanou, Gelis, & Gouridis, 2009).

4.1.1.2.4 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMP, *por sus siglas en inglés*) son un grupo de péptidos, muchos de los cuales fueron descubiertos a partir de venenos, con la habilidad de matar un amplio espectro de microorganismo. La mayoría de ellos son anfipáticos y en organismos multicelulares sirven como un mecanismo de defensa contra microorganismos patogénicos (Milletti, 2012). Estos péptidos adoptan una conformación desplegada en solución acuosa, pero una vez que entran en contacto con una membrana que produzca una complementariedad de cargas, se anclan a la membrana y adquieren una conformación hélice α . En esta conformación pueden penetrar en la célula por mecanismo de carpeta (en donde el

esqueleto peptídico se internaliza de manera paralela a la membrana) o de barril (en donde el esqueleto peptídico se internaliza de manera perpendicular a la membrana). A pesar de que en cualquiera de los dos casos se produce una perturbación en la membrana, lo que eventualmente produce la lisis de esta, algunos de estos péptidos pueden atravesar membranas eucariotas sin causar lisis (Rodríguez Plaza et al., 2014; Splith & Neundorf, 2011).

4.1.1.2.5 Proteínas Virales

Muchas proteínas virales han desarrollado mecanismos diferentes para introducirse en la célula, por lo que muchos CPP fueron y pueden ser derivados de motivos encontrados en proteínas virales. La mayoría de estos péptidos presentan una conformación de hélice α debido a su carácter anfipático. Un péptido anfipático descrito recientemente que no presenta dicha conformación es Inv3 (TKRRITPKDVIDVRSVTTEINT), derivado de la proteína de entrada celular de *Mycobacterium tuberculosis* (Mce1A 130-151) (Lu, Tager, Chitale, & Riley, 2006; Milletti, 2012).

4.1.1.3 Biopéptido

El término biopéptido fue definido por John Howl y Sarah Jones en 2008, y es empleado para hacer referencia a péptidos penetradores celulares que además de tener un carácter penetrador, también poseen otro tipo de actividad biológica intrínseca. Estos péptidos deben tener ambas propiedades, actividad penetradora y farmacológica. Se distinguen dos clases de este grupo, según la arquitectura molecular de las secuencias peptídicas. La organización “synchologic” o tándem, la cual combina un vector inerte CPP (dirección) con otra secuencia peptídica bioactiva (mensaje). La segunda clase: “rhegnylogic” o discontinua, contiene tanto el vector como la secuencia bioactiva, dentro de un mismo péptido (Figura 1) (Kerkis, de Brandão Prieto da Silva, Pompeia, Tytgat, & de Sá Junior, 2017; Lukanowska, Howl, & Jones, 2013).

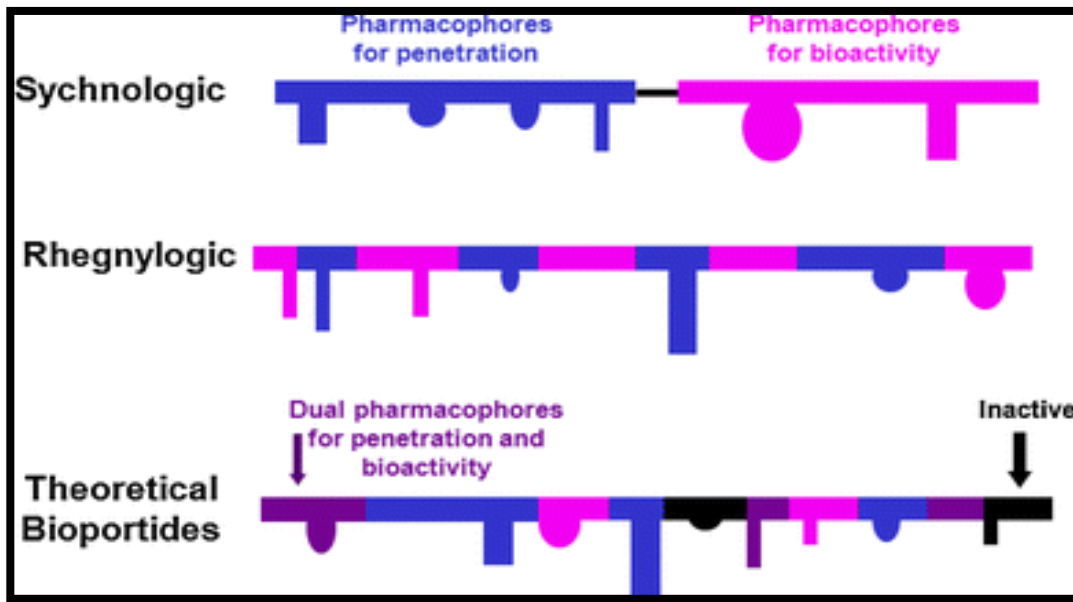


Figura 1. Estructura molecular teórica de los biopórtidos, según su organización en tándem (“synchologic”) o discontinua (“rhegnylogic”) (Kowl J. et al., 2012).

4.1.2 Internalización

Desde el descubrimiento de los péptidos penetradores celulares ha habido un creciente interés en el estudio de su internalización, sin embargo, este mecanismo sigue sin ser totalmente comprendido. La diversidad de vías para su internalización depende de factores como la concentración del péptido (Brock, 2014), el cargo conjugado (Maiolo et al., 2004) y la línea celular usada (Koren & Torchilin, 2012; Ramsey & Flynn, 2015).

Debido a que la endocitosis es la manera natural de entrada de macromoléculas, pronto se demostró que los CPP usaban esta vía para translocarse en la célula. De cualquier modo, no fue posible excluir a los mecanismos de translocación directa, y estas vías fueron comprobadas posteriormente (Al-Taei et al. 2007; Lukanowska et al. 2013; Pae and Pooga 2014). Así la internalización de los CPP puede ocurrir por dos mecanismos en general, el endocítico y la translocación directa o no endocítico (Figura 2). La relevancia de reconocer estos dos mecanismos es que de estos dependerá el procesamiento intracelular del CPP. Si el CPP es liberado directamente en el citoplasma, este podría interactuar directamente con su objetivo, ser importado a un organelo (e.g., núcleo), degradado por proteasas citoplasmáticas o podría ser redirigido fuera de la célula ya sea intacto o degradado. Por otra parte, si el CPP es internalizado por vía endocítica, este podría ser objeto de una degradación lisosomal, o podría escapar de esta y ser liberado en el citoplasma o a algún organelo (e.g., núcleo, aparato

de Golgi, retículo endoplásmico) o ser expulsado de la célula. Péptidos con una señal de localización nuclear serán dirigidos preferentemente al núcleo, mientras que los péptidos ricos en lisina serán ubiquitinados por proteosomas de degradación (Patel et al., 2007).

Ambos modelos proponen 3 pasos para llevar a cabo la internalización: a) interacción con la membrana, b) permeación de la membrana y c) liberación de los CPP en el interior de la célula. La mayor diferencia entre la translocación y la endocitosis recae en los pasos b y c, en donde, para la translocación los CPP son localizados directamente en el citoplasma después de atravesar la membrana plasmática; en el caso de la endocitosis, estos péptidos son confinados en vesículas y pueden o no ser liberados al citosol (Patel et al., 2007). Es ampliamente aceptado el hecho de que no hay receptores involucrados en la internalización de CPP catiónicos. Esta evidencia surge a partir de determinar que no hay diferencias

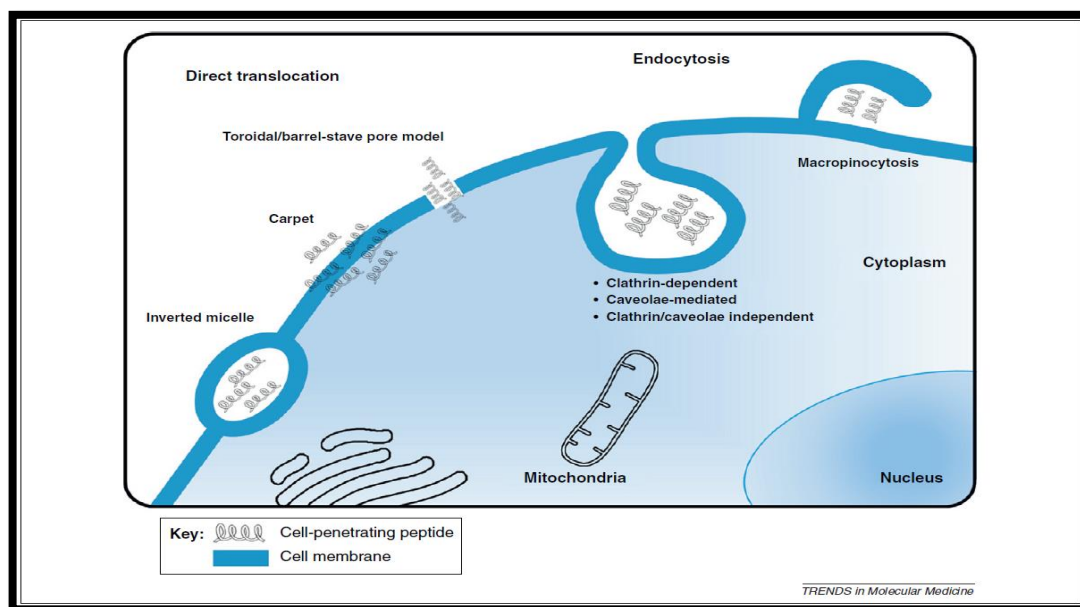


Figura 2. Vías intracelulares de la internalización de péptidos penetradores celulares (Koren E. & Torchillin V. P., 2012).

significativas en la eficiencia de internalización por ambos enantiómeros, dextrógiro (D) y levógiro (L) (Derossi et al., 1996; P. A. Wender et al., 2000).

4.1.2.1 Translocación directa

Estudios biofísicos hechos en sistemas independientes de células, como vesículas unilaminares que no presentan proteínas celulares de membrana, apoyan el rol de las vías de internalización no endocíticas (Terrone, Sang, Roudaia, & Silvius, 2003). Con este sistema se pudo mostrar la importancia de los residuos hidrofóbicos de triptófano en este mecanismo,

sin embargo, oligo-arginina, y Tat no contienen triptófanos en sus respectivas secuencias, y pueden ser translocados, por lo que la translocación mediada por residuos de triptófano no puede ser generalizada para todos los CPP (Patel et al., 2007).

Varios modelos han sido propuestos para explicar la translocación directa de los CPP a través de la bicapa lipídica (Figura 3).

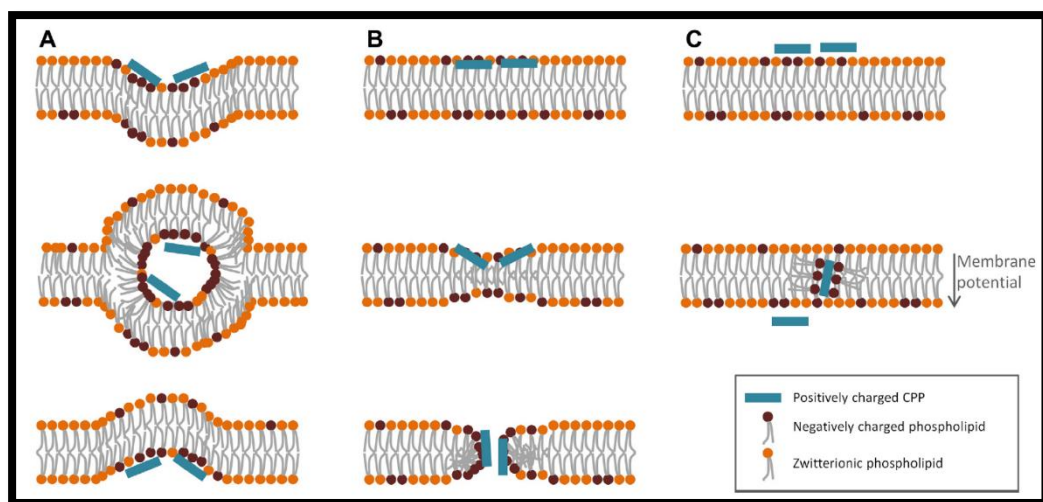


Figura 3. Ejemplos de los mecanismos propuestos para la translocación directa. A) formación de micela invertida, B) Formación de poro y C) Translocación adaptativa (Bechara C., 2013).

4.1.2.1.1 Micela invertida

El primer mecanismo de internalización de CPP se le conoce como la hipótesis de la micela invertida (Derossi et al., 1996), en donde se sugiere que el péptido Antp es internalizado por una micela invertida (Figura 3A). En este modelo, los residuos básicos de los CPP interactúan con las cargas negativas de los fosfolípidos de la membrana plasmática y la subsecuente interacción con residuos hidrofóbicos con el núcleo de la membrana, induce la desestabilización de la bicapa mediante la formación de una curvatura (invaginación de la membrana) (Alves et al., 2008). La reorganización de los lípidos vecinos da como resultado la formación de una micela invertida la cual encapsula el péptido (Joanne et al., 2009). Alteraciones en la membrana liberan el péptido intracelularmente. Substituciones de los residuos de triptófano por fenilalaninas inhiben la formación de las micelas invertidas (Berlose, Convert, Derossi, Brunissen, & Chassaing, 1996), mostrando que la importancia de los residuos de triptófano va más allá de su carácter hidrofóbico (Bechara & Sagan, 2013).

4.1.2.1.2 Formación de poros

Simulaciones de dinámica molecular y experimentos electrofisiológicos (Herce & Garcia, 2007; Martin et al., 2009) muestran que la formación de poros toroidales inducirá la difusión pasiva de Tat y de péptidos ricos en arginina a través de la membrana (Figura 3B). La interacción entre el lado positivo de la cadena con los grupos fosfato, permiten una acumulación del péptido en la capa externa de la membrana. Esta acumulación causa un adelgazamiento de la bicapa y la atracción entre las cadenas laterales de arginina y lisina con los grupos fosfato de la capa distal, llevan a la formación de un poro transitorio por el cual otros péptidos pueden difundir, llevando consigo el fosfolípido unido. Estos resultados sugieren que la eficiencia de translocación está relacionada con la cantidad de residuos de arginina en la secuencia (Bechara & Sagan, 2013; P. A. Wender et al., 2000).

Se propone que esta alteración en la membrana inducida por la formación de poros activa la respuesta de reparación de membrana, conducida por el flujo de calcio dentro de las células. Vesículas internas se fusionarán y servirán como parche para sellar la membrana (Bechara & Sagan, 2013; Padari, Pooga, Lorents, Palm-Apergi, & Hällbrink, 2008).

4.1.2.1.3 Translocación adaptativa

La capacidad de los grupos guanidinos para formar enlaces por puente de hidrógeno bidentados, le dan a las oligoargininas un carácter hidrofílico o hidrofóbico, dependiendo del contra anión asociado. Basado en esta capacidad, la interacción entre péptidos ricos en guanidinos y los grupos fosfatos de los lípidos, enmascararán la carga peptídica, atenuando su polaridad y permitiendo su difusión adaptativa a través de la membrana (Figura 3C) (Goun, Galliher, Jones, Pillow, & Wender, 2007). La difusión es dirigida por el potencial de membrana (Paul A. Wender, Lewis, Rothbard, Jessop, & Murray, 2004). Por esta razón el péptido debería poseer una carga neta positiva. Esto explica el hecho de que un número mínimo de residuos de arginina son necesarios para observar el fenómeno de internalización (Bechara & Sagan, 2013).

4.1.2.2 Endocitosis

La endocitosis es un término que hace referencia a los procesos dependientes de energía involucrados en la internalización de macromoléculas y se caracteriza por la formación de vesículas. Se divide en dos, fagocitosis, la cual se encarga de partículas grandes;

y pinocitosis, la cual participa en la internalización de fluidos y solutos. La fagocitosis se ha observado solo para células especializadas como los macrófagos y leucocitos, pero la pinocitosis ocurre en todas las células. Este mecanismo puede darse mediante al menos cuatro vías: endocitosis mediada por clatrina, por caveolas, independiente de estas dos y macropinocitosis. Estos mecanismos han sido relacionados con la internalización de distintos péptidos penetradores (Ferrari et al., 2003; Patel et al., 2007; Richard et al., 2005).

La diferencia en los tipos de pinocitosis recae en el tamaño de las vesículas producidas y del procesado intracelular; las vesículas recubiertas de clatrina son de un diámetro aproximado de 120 nm, algunos de sus endosomas son reciclados al ser llevados de vuelta a la membrana plasmática en cuanto a otros siguen la ruta de degradación por lisosomas (Conner & Schmid, 2003; Richard et al., 2005). En las fosas de caveolas el diámetro oscila entre 50-80 nm y los endosomas pueden ir al aparato de Golgi, retículo endoplásmico o sufrir un transporte retrógrado. Las vesículas formadas de manera independiente a estas dos vías endocíticas, son de 90 nm y los macropinosomas resultantes de la macropinocitosis tienen un tamaño en el rango de 1 a 5 μ m, y su procesamiento depende del tipo celular; en macrófagos se observa una fusión con lisosomas, en contraste con células A431 y HeLa, donde se aprecia poca interacción con endosomas y en la mayor parte de los casos termina en un transporte retrogrado (Conner & Schmid, 2003). Esta última es dependiente de actina y se le considera la ruta preferente para la internalización de péptidos penetradores celulares catiónicos (Kaplan, Wadia, & Dowdy, 2005).

En general, todos los CPP que son internalizado por vías endocíticas son embebidos en vesículas, de las cuales deben escapar para llevar a cabo su función o liberar el cargo conjugado antes de su procesado intracelular. Debido a que la endocitosis es la vía preferente cuando se tiene un alto peso molecular, la implementación de estrategias para la liberación de cargos es necesaria. Dos estrategias han sido abordadas para tal fin. En la primera, el dominio amino terminal del virus de la influenza HA2, un péptido fusogénico dependiente de pH que induce lisis de membrana a bajo pH dentro de endosomas, ha sido utilizado para promover el escape de la proteína de fusión Tat-Cre, así como para oligoargininas conjugadas con la proteína p53 (Matsushita et al., 2004; Wadia, Stan, & Dowdy, 2004).

La segunda se basa en la internalización fotoquímica, una estrategia que depende de la ruptura de endosomas por especies reactivas de oxígeno (ROS, *por sus siglas en inglés*) generada por compuestos fotosensibilizantes una vez que son irradiados (Maiolo et al., 2004). Sin embargo, aún no se sabe que ruptura endosomal es requerida para la liberación del péptido en el citosol en condiciones fisiológicas.

4.1.3 Predicción y Diseño

El modelado molecular se ha convertido en una parte casi inseparable en el estudio de sistemas biológicos y en el diseño de fármacos. La predicción de péptidos penetradores celulares usando estos enfoques está en etapa temprana, pero el interés en la aplicación de varios métodos computacionales para este propósito va en aumento. Los métodos de mecanismo y dinámica molecular se basan en los potenciales que reflejan las fuerzas electrostáticas y de van der Waals entre las moléculas. En la mayoría de los casos, estos potenciales son obtenidos a partir de datos empíricos. En el caso de sistemas que involucran péptidos, estos métodos pueden ser usados como la base para el modelado de acoplamiento molecular (Hällbrink & Karelson, 2015).

El enfoque computacional más usado para los sistemas moleculares ha sido el uso de la relación cuantitativa de la estructura química y la actividad molecular (QSAR/QSPR, *por sus siglas en inglés*). El objetivo de esta estrategia es representar la actividad de moléculas diversas usando descriptores químicos y físicos. Para cumplir este propósito, usualmente se utiliza un modelo matemático que agrupa moléculas con valores cercanos en un espacio multidimensional con la actividad compartida entre estas moléculas (Hällbrink & Karelson, 2015).

4.1.3.1 Métodos QSAR

Los modelos QSAR son desarrollados por métodos estadísticos multivariados o por algoritmos de aprendizaje de máquinas. Dado que el número de secuencias clasificadas como penetradoras, cada vez es mayor, el poder predictivo de los enfoques computacionales tipo QSAR también aumenta. El poder de predicción de las relaciones cuantitativas de estructura-función dependen de los descriptores moleculares involucrados en el modelo matemático. La presencia de uno u otro descriptor en el modelo puede dar información valiosa acerca de las interacciones moleculares que determinan cierta propiedad. Los descriptores moleculares

pueden ser divididos en una vasta cantidad de clases, basadas en el origen y nivel de abstracción (Hällbrink & Karelson, 2015).

Los más simples son los descriptores constitucionales que representan la composición química de una molécula, y son independientes de la conectividad y geometría molecular. Debido a que los péptidos tienen múltiples grupos cargados, los descriptores electrostáticos codifican la distribución de cargas en las moléculas. Una clase amplia de descriptores moleculares son derivados de los cálculos cuánticos y mecánicos. Los descriptores relacionados a los orbitales moleculares son energías del HOMO (highest occupied molecular orbital) y LUMO (lowest unoccupied molecular orbital). Estos orbitales juegan un papel importante en muchas reacciones químicas, determinando las lagunas electrónicas en interacciones sólidas e intermoleculares. En particular las relacionadas con transferencia de carga. (Karelson, Lobanov, & Katritzky, 1996). En el caso de los CPP, estos descriptores pueden ser importantes para describir la formación del complejo entre el CPP y el cargo molecular, así como también sus interacciones con la membrana celular (Hällbrink & Karelson, 2015).

Los péptidos están formados por un conjunto bastante limitado de fragmentos moleculares, los aminoácidos. Por esta razón, descriptores específicos han sido propuestos para estos, un ejemplo son las *escalas z*. Se han descrito una variación en secuencias de aminoácidos dentro de conjuntos de péptidos por tres propiedades principales; z_1 , z_2 y z_3 . Estas propiedades fueron derivadas de un análisis de componentes de una matriz de 29 variables fisicoquímicas de los 20 aminoácidos que se encuentran codificados en el mRNA. Estos clasificadores son usados para representar hidrofobicidad, masa de la cadena lateral/tamaño molecular, y propiedades electrónicas de los aminoácidos, respectivamente (Hellberg, Sjostrom, Skagerberg, & Wold, 1987).

4.1.3.2 Aprendizaje de maquinas

Para la predicción de CPP, los péptidos pueden ser etiquetados de forma binaria, esto es un péptido entra o no a la célula (1 vs 0). Los métodos de aprendizaje de máquinas como las redes neuronales artificiales (ANNs, *por sus siglas en inglés*) y máquinas de soporte vectorial (SVMs, *por sus siglas en inglés*) son apropiados para el desarrollo de predictores computacionales basados en este tipo de información (Gautam et al., 2013; Karelson & Dobchev, 2011).

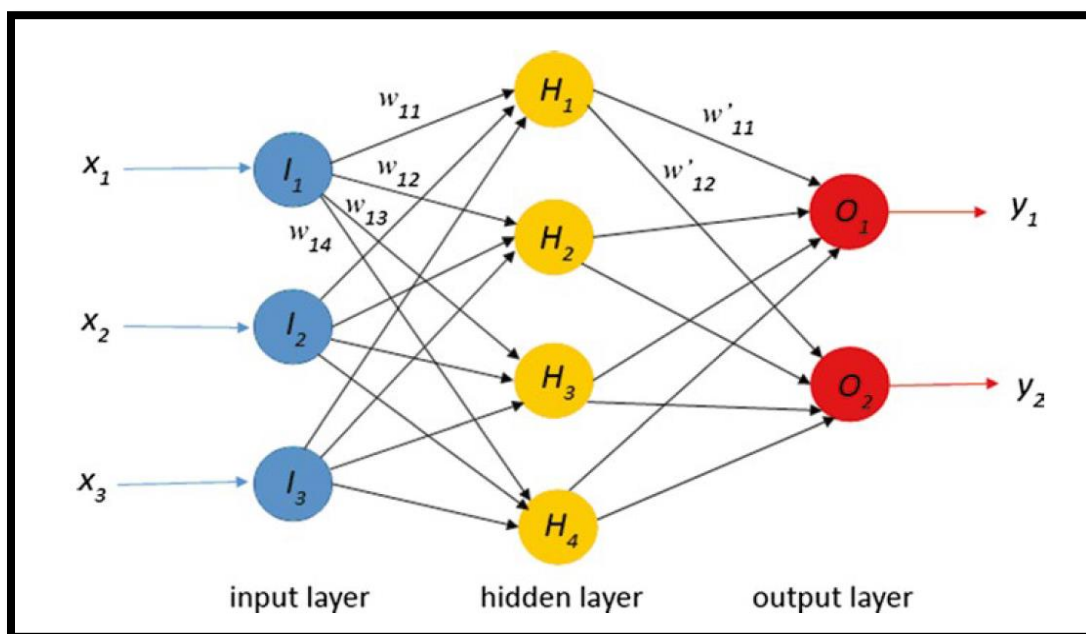


Figura 4. Un típico [3-4-2] perceptrón multicapa ANN con aprendizaje por retroalimentación (Hällbrink M. & Karelson M., 2015).

Las ANNs son capaces de reconocer relaciones altamente no lineales y están formadas de neuronas artificiales o elementos de procesamiento conectados con coeficientes de peso, lo que constituye la estructura neural y se organizan en capas. Un ejemplo típico de ANN es un perceptrón de multicapas (MLP, *por sus siglas en inglés*). Un ANN de tres capas con aprendizaje “feed-forward” se observa en la figura 4 en donde la primera capa es usualmente llamada capa de entrada, en el modelado de estructura-función, esta capa consiste en descriptores moleculares. La última capa del ANN es la de salida, en donde las neuronas son conectadas directamente con la actividad predicha. Las capas de neuronas entre las capas de entrada y salida son llamadas capas ocultas, y su número puede variar, dependiendo el tamaño y la estructura de los datos (Hällbrink & Karelson, 2015).

El modelo SVM realiza una clasificación de los datos mediante la construcción de un hiperplano n-dimensional que separa óptimamente la información en dos categorías. SVM minimiza el error de clasificación empírico y el respectivo margen geométrico, esto es la distancia entre el hiperplano y los datos de cada grupo es maximizada (Figura 5) (Hällbrink & Karelson, 2015).

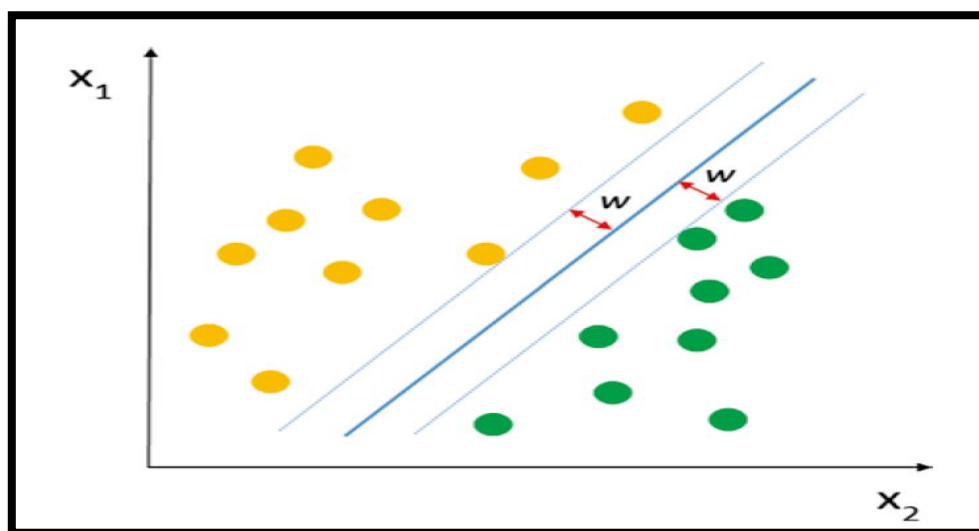


Figura 5. El caso más simple de división de datos (amarillos y verdes) en dos grupos en dos dimensiones (X_1 y X_2). Un SVM es entrenado para maximizar la distancia $2w$ entre los dos grupos (Hällbrink M. & Karelson M., 2015).

Recientemente se reportó un método computacional para la predicción de péptidos multifuncionales basado en dos grandes suposiciones. La primera, obtener un predictor probabilístico para CPP y optimizar la secuencia peptídica. La segunda, dominios proteicos con diferentes funciones y una probabilidad alta de predicción de CPP deberían ser particularmente fácil de integrar en una secuencia peptídica que conserve la multifuncionalidad. Se usaron dos tipos distintos de conjuntos de datos, las secuencias reportadas como CPP y secuencias peptídicas no penetradoras, las primeras divididas en CPP con baja y alta eficiencia de penetrabilidad. Los mejores resultados en la predicción son obtenidos mediante el uso de SVMs (91% y 66% de exactitud para CPP y CPP eficientes, respectivamente) y Bosques al azar (90% y 67% de exactitud para CPP y CPP eficientes, respectivamente) entrenados con 27 descriptores, el conteo de los 20 aminoácidos presentes en una secuencia, hidrofobicidad, carga neta, punto isoelectrico, ventana móvil de carga,

ventana móvil de momento hidrofóbico, coeficiente de partición octanol-agua y aproximación del contenido de α -helicidad en una secuencia (Diener et al., 2016).

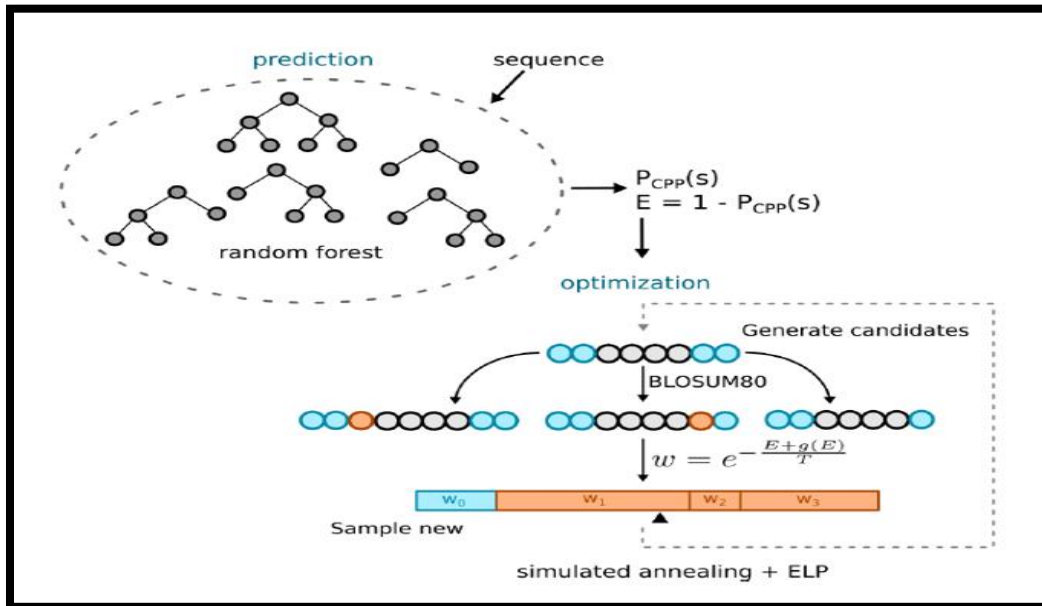


Figura 6. Metodología usada para la identificación y diseño de CPP. Primero, un predictor (bosques al azar) es entrenado con un set de secuencias conocidas como CPP y no CPP. La probabilidad resultante del modelo es usada para identificar secuencias parecidas a los CPP, y convertirlas en una medida de energía ($E=1-P_{CPP}(S)$) para el nuevo diseño de péptidos por optimización (Diener C. et al., 2016).

El modelo de clasificaciones previamente descrito fue usado para encontrar actividades compatibles en proteínas (secuencias que puedan ser predichas por el modelo entrenado para CPP que se hayan caracterizado previamente con otra actividad). En ese trabajo se usaron secuencias templado con actividades conocidas (feromona y secuencia de localización nuclear) que fueron unidas mediante secuencias peptídicas de longitud y composición variable (secuencias “linker”), optimizándolas para conjuntar una secuencia con actividad de CPP. Esta optimización involucra tres clases de procesos en los “linkers”: sustitución, delección o adición de aminoácidos en los extremos N y/o C terminales (Figura 6) (Diener et al., 2016).

La mayor limitación de los péptidos penetradores es la selectividad de estos, es decir, ya conocemos las características que un péptido debería poseer para ser penetrador, y con ello diseñarlos, pero dirigir esta internalización a solo un tipo celular deseado solo se ha

logrado acoplado a los CPP a un péptido que es reconocido por un receptor en las células diana (Ellerby et al., 1999). En este trabajo proponemos una estrategia que puede complementar esta estrategia de selectividad de los CPP, mediante el diseño de CPP embebidos dentro de secuencias no penetradoras, en donde la actividad penetradora de dicha secuencia solo pueda ser activada mediante la escisión de una región que pueda ser hidrolizada por una peptidasa de membrana, la presencia de dicha peptidasa dependerá del tipo celular, así que esta región de corte puede ser diseñada según la célula blanco. Una peptidasa de membrana que funciona como ejemplo para esta estrategia es la neprilisina.

4.2 Neprilisina

La neprilisina, también conocida como endopeptidasa neutra o CD10, es una metaloendopeptidasa integral de membrana de tipo II de la membrana plasmática con una masa de 90-100 kDa, la cual inactiva una gran variedad de péptidos fisiológicamente activos (Velazquez et al., 2007). La expresión alterada de neprilisina ha mostrado tener un papel importante en muchos tumores, como de próstata y pulmón. Se piensa que NEP actúa como un supresor de tumores, pues en cultivos celulares de cáncer prostático la pérdida de NEP estimula la proliferación y migración celular (Cohen et al., 1996; Sumitomo et al., 2004). Sin embargo, también se ha visto un aumento de NEP en la progresión de ciertos tumores, como linfomas, melanomas y carcinoma colorrectal (Bai et al., 2003; Fujimoto et al., 2005). La asociación del incremento de la expresión de NEP en la progresión de melanomas es de particular interés terapéutico, debido a la amplia variedad de inhibidores de dicha proteasa (Cruden, Fox, Ludlam, Johnston, & Newby, 2004).

4.2.1 Actividad y Especificidad

Los principales sustratos *in vivo* de la neprilisina son encefalinas, taquicininas (como la sustancia P), endotelinas y bradquininas. El requerimiento principal para la especificidad de la neprilisina es un residuo hidrofóbico en la posición P1, la enzima funciona normalmente como una endopeptidasa, este sitio de especificidad de la neprilisina ha sido explorado con detalle. Una secuencia consenso para la hidrólisis eficiente por esta peptidasa es: -Phe-Phe-Gly|Phe-Leu-(Ala)- (Hershl & Morihara, 1986; Pozsgay et al., 1986).

4.2.2 Aspectos Biológicos

La neprilisina es una enzima ampliamente distribuida. En mamíferos, la enzima es abundante en riñón, intestino y placenta. Como muchas metalopeptidasas, NEP, está presente

en el sistema reproductivo (testículos y ovarios) (Howell, Murray, Scott, Turner, & Kenny, 1991). En general la neprilisina está presente en menor abundancia en otros tejidos y tipos celulares, incluyendo el cerebro, en donde parece tener dos funciones distintas. La primera es la inactivación de neurotransmisores, especialmente péptidos derivados de taquicinas y opioides (Matsas, Fulcher, Kenny, & Turner, 1983); y segundo, la degradación del péptido neurotóxico A β , en donde su acumulación recae en la enfermedad de Alzheimer. Se ha mostrado que la pérdida de la actividad de NEP puede promover la acumulación de dicho péptido en el cerebro (Carson & Turner, 2002).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño de ACP

El diseño de péptidos penetradores celulares activables se llevó a cabo mediante el software desarrollado en nuestro grupo de trabajo que se puede encontrar en <http://bis.ifc.unam.mx/software/acf> o <https://github.com/cdiener/acf> (Diener et al., 2016). En donde el entrenamiento del algoritmo se realiza con 4 conjuntos de datos, 2 de ellos para determinar la probabilidad de ser un CPP, un conjunto de datos positivo (secuencias conocidas como CPP) y otro negativo (secuencias de péptidos no penetradores). Los restantes para determinar la probabilidad de ser un CPP eficiente, un conjunto de datos positivo y otro negativo, secuencias de CPP eficientes y secuencias de CPP no eficientes, respectivamente. El código original de Diener y colaboradores se modificó para que reportara hasta 20 secuencias predichas (la versión original solo reportaba 8) y para el entrenamiento se usaron como grupos de ejemplo positivos (grupo de actividad deseada) péptidos sin actividad penetradora y como grupo de ejemplos negativos (grupo sin la actividad deseada) a los CPP.

5.1.1 Estrategia Peptidasa-Péptido

Se tomó como secuencia base el CPP Tat₄₇₋₅₇ (YGRKKRRQRRR), al cual se le agregó una secuencia óptima de corte de la neprilisina (FFG/FLA) (Hershl & Morihara, 1986) en su carboxilo terminal. Posteriormente, se hizo un barrido de optimización de este nuevo péptido de 17 aminoácidos añadiendo de 2 a 7 residuos de aminoácidos y así obtener secuencias no penetradoras. A partir de las múltiples secuencias generadas por el programa, se seleccionaron aquellas secuencias que maximizaran su probabilidad de no ser CPP, y la probabilidad de adquirir una conformación de hélice α .

También se diseñó un péptido como control negativo de internalización, que consiste en usar la misma secuencia peptídica, en configuración D, ya que la hipótesis de esta estrategia es que la hidrólisis del péptido en la membrana conllevará a la liberación del péptido penetrador y en consecuencia a su internalización. Tomando en cuenta la estereoespecificidad de las proteasas, este péptido en configuración D- no debería ser hidrolizado por la NEP y por tanto no debería ser internalizado por células que expresan a la NEP.

Los péptidos fueron sintetizados con el fluoróforo TAMRA (Tetramethylrhodamine *por sus siglas en inglés*) unido covalentemente en el extremo amino terminal.

5.2 Análisis de los niveles de expresión proteica de neprilisina en las líneas celulares HEK293T y HeLa

Con el fin de establecer las condiciones necesarias para la medición de la internalización peptídica, se utilizaron dos líneas celulares, HEK293T y HeLa, en donde la diferencia relevante para este trabajo en dichas líneas celulares es que en la literatura se dice que las primeras presentan 10 veces más transcritos de neprilisina respecto a las células HeLa (Human Protein Atlas, disponible en www.proteinatlas.org), esta diferencia resulta útil para comparar la internalización de los péptidos sintetizados. Para evaluar si esta diferencia en expresión génica estaba relacionada con los niveles de expresión de proteína, se realizó un análisis de la expresión proteica de neprilisina por inmunoblot, el cual es una técnica utilizada para identificar proteínas específicas en una mezcla de proteínas mediante el uso de anticuerpos.

Las células se homogeneizaron en un buffer de lisis que contiene Tris 60 mM (pH 6.8), SDS 2% y 1mg/ml de inhibidores de proteasas 18 (Roche) a temperatura ambiente durante 15 min. Se utilizaron 25 y 50 ug de muestra para los ensayos de electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. Las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF-FL e incubadas durante toda la noche (4°C) con el anticuerpo primario anti-CD10 ab79432 (abcam) (1:5000). Se realizaron 3 lavados con TTBS de 5 minutos cada uno y se incubaron por una hora con el anticuerpo conjugado IRDye800 (LICOR). La cuantificación de proteína en estas membranas se realizó mediante el sistema de imagen Odyssey Clx.

5.3 Evaluación de la asociación e internalización peptídica mediante microscopía de epifluorescencia y confocal

Se incubaron 4×10^5 células de cada línea celular, mencionadas en el apartado anterior, en medio DMEM (Invitrogen) suplementado con FBS (Gibco) al 10% (v/v), con su respectivo péptido por 30 min, posterior a este tiempo se hicieron lavados con amortiguador de fosfatos, se fijaron con paraformaldehído 4 % (Sigma-Aldrich) (y se marcaron los núcleos celulares con 4, 6-diamino-2-fenilindol (Sigma-Aldrich). Las concentraciones peptídicas

evaluadas fueron de 1, 5 y 10 μM para cada péptido. Los péptidos fueron disueltos en una relación 4:1 DMSO – agua.

Para realizar una medición cuantitativa de la asociación peptídica se tomaron micrografías con un aumento de 30x con el uso de microscopia de epifluorescencia (Nikon Ti-U).

Con el fin de determinar la internalización de los péptidos sintetizados, se realizó microscopía confocal con un aumento de 63x, cabe mencionar que los péptidos que logren pasar la membrana plasmática se espera verlos colocalizados con el núcleo, debido a que la secuencia Tat es por si sola una secuencia de localización nuclear (Efthymiadis, Briggs, & Jans, 1998).

Todas las micrografías generadas fueron analizadas con el software libre ImageJ/Fiji (Schindelin et al., 2012).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Diseño de ACP

Cada optimización, para cada cantidad de aminoácidos (2 a 7) añadidos, dio como resultado una tabla con 20 secuencias distintas de aminoácidos con las probabilidades de ser péptidos no penetradores (χ_{P0}), péptido penetrador no eficiente (χ_{P1}), la multiplicación de estas dos ($\chi_{P(all)}$), y la probabilidad de poseer estructura secundaria hélice α ($\chi_{\%a}$).

Los péptidos elegidos fueron las secuencias optimizadas con 6 aminoácidos, debido a que como se muestra en los promedios de la tabla 1, las secuencias en donde se observan péptidos con una probabilidad aceptable para que cumplan con la función predicha son de la 0-5 a la 0-7; por eliminación la secuencia escogida fue la optimizada con 6 aminoácidos, evitando la 0-5 y 0-7, por tener una menor probabilidad de no penetrabilidad (P0) y un P(all) bajo; y una mayor probabilidad de formación de dímeros, debido a cargas electrostáticas complementarias, respectivamente.

Tabla 2. Péptidos no penetradores diseñados a partir de Tat para ser digeridos por NEP.

Péptido	Optimización	χ_{P0}	χ_{P1}	$\chi_{P(all)}$	$\chi_{\%a}$
YGRKKRRQRRRFFGFLA	0-2	0.20025	0.50125	0.099	0.5
	0-3	0.2605	0.5705	0.148	0.471
	0-4	0.52075	0.55125	0.281	0.444
	0-5	0.77225	0.5465	0.422	0.484
	0-6	0.849	0.61	0.518	0.452
	0-7	0.93175	0.673	0.626	0.552

Optimizaciones a partir de la adición de aminoácidos (2 a 7) en el extremo C-terminal. Promedios de las probabilidades de ser un péptido no penetrador (χ_{P0}), péptido no penetrador eficiente (χ_{P1}), la multiplicación de estas dos ($\chi_{P(all)}$), y la probabilidad de poseer estructura secundaria hélice α ($\chi_{\%a}$).

Las secuencias escogidas se observan en la tabla 2, en donde la secuencia identificada por el número 1 es la secuencia peptídica que se obtendría después de la hidrólisis enzimática, la cual, según la probabilidad de dicha tabla, es penetradora (probabilidad de ser un péptido penetrador = 1-P0). La diferencia entre los péptidos 2 y 3, se observa en la columna de la probabilidad de poseer una estructura hélice α , esto con el fin de determinar la influencia de una estructura secundaria en la internalización de estos péptidos. El péptido número 4 es el control negativo, estereoisómero D del péptido 2.

Tabla 3. Secuencias diseñadas para la estrategia Peptidasa-Péptido.

#	Péptido	Optimización	P0	P1	P(all)	%a	Control	Número aminoácidos
1	YGRKKRRQRRRFFG	0-0	0.010	0.360	0.003	0.727	+	14
2	YGRKKRRQRRRFFGFLADDDDEE	0-6	0.888	0.615	0.544	0.400	+	23
3	YGRKKRRQRRRFFGFLAEDDEDD	0-6	0.880	0.580	0.510	0.750	+	23
4	D-(YGRKKRRQRRRFFGFLADDDDEE)	0-6	0.885	0.615	0.544	0.400	-	23

Optimizaciones a partir de la adición de 6 aminoácidos en el extremo C-terminal. Promedios de las probabilidades de ser un péptido no penetrador (χ_{P0}), péptido penetrador no eficiente (χ_{P1}), la multiplicación de estas dos ($\chi_{P(all)}$), y la probabilidad de poseer estructura secundaria hélice α ($\chi_{\%a}$).

6.2 Análisis de los niveles de expresión proteica de neprilisina

Los niveles de expresión proteica de neprilisina para las líneas celulares HEK293T y HeLa se muestran en la figura 7, en donde se observa que la línea celular HeLa expresa poco más del doble de neprilisina respecto a HEK293T. Esto es cualitativa y cuantitativamente diferente a lo esperado, ya que hay 10 veces más transcritos de neprilisina en HEK293T respecto a HeLa (Human Protein Atlas, disponible en www.proteinatlas.org). Sin embargo, la correspondencia entre los niveles de transcripción y la concentración de proteína han mostrado tener poca correlación en células de mamífero (Koussounadis, Langdon, Um, Harrison, & Smith, 2015), por lo que esta relación depende de cada línea celular. A pesar de que el objetivo de usar las líneas celulares HEK293T y HeLa fue en principio por el requerimiento de tener tanto una línea celular que expresara poca neprilisina, como otra que expresara gran cantidad de dicha proteasa; estos resultados, tener el doble de expresión en una línea (HeLa) respecto a otra (HEK293T), podrían presentar diferencias en la asociación-internalización de los péptidos. Por ello, se decidió continuar con ambas líneas celulares para la realización de los ensayos de internalización.

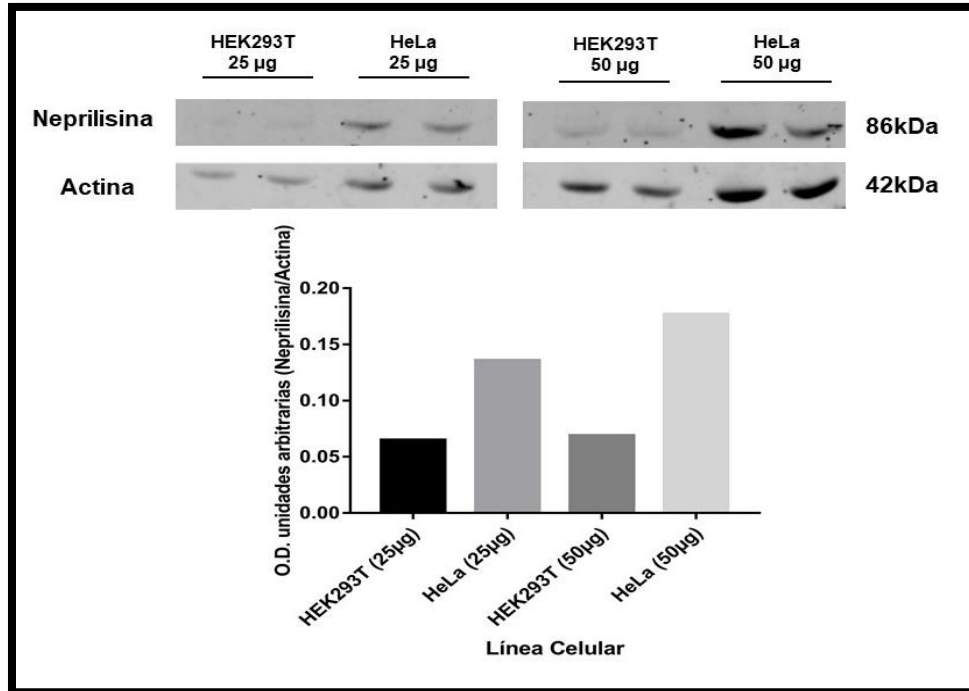


Figura 7. Niveles de expresión proteica de neprilisina en las líneas celulares HEK293T y HeLa. En el panel de arriba, las imágenes de ambas concentraciones (25 y 50 µg) provienen de un mismo gel, solo fue removido el carril con el marcador molecular (ver sección IX). El panel de abajo muestra la cuantificación de los niveles de expresión proteica.

6.3 Evaluación de la asociación e internalización peptídica mediante microscopía de epifluorescencia y confocal

La verificación de la asociación de los péptidos sintetizados previamente descritos se realizó mediante el uso de microscopía de epifluorescencia. El único péptido que fue soluble en agua fue el péptido 1, mientras que el resto de los péptidos presentaron diferentes grados de insolubilidad en agua (insolubilidad péptido3 > péptido4 > péptido2), por lo que se ensayaron diferentes mezclas de agua y DMSO para solubilizarlos. Mientras que el DMSO es ampliamente usado para solubilizar una amplia variedad de compuestos, también es conocido por ser tóxico para las células, en concentraciones mayores al 2 % (Galvao et al., 2013). Lo que hace conveniente trabajar con péptidos que sean solubles en agua. El predictor utilizado para diseñar los péptidos mostrados en este trabajo (Diener et al., 2016), toma en cuenta 27 descriptores (ver sección 4.1.3); entre los cuales se encuentra la hidrofobicidad y el coeficiente de partición octanol-agua, esto debido a que se espera que los CPP presenten afinidad por membranas y en consecuencia se esperarían que estos fueran insolubles en agua.

Por otra parte, los CPP tienden a estar cargados positivamente y esto podría compensar su baja solubilidad en agua. Esto indica que otros descriptores químicos son necesarios para explorar la predicción de CPP solubles en agua. Avances recientes en hacer proteínas de membrana solubles en agua (Rawlings, 2016) pueden brindar elementos para mejorar el diseño de CPP.

Al final la mezcla 4:1 DMSO:agua fue la que permitió solubilizar la mayor cantidad de estos péptidos. El porcentaje final de DMSO en el medio de cultivo para las concentraciones peptídicas de 10, 5 y 1 μM fue de 0.4, 0.2 y 0.04 %, respectivamente.

Con la finalidad de hacer más evidente la presencia del péptido en las figuras generadas con microscopía de epifluorescencia, la intensidad observada en los péptidos marcados con TAMRA fue modificada mediante el uso del software para análisis de imágenes ImageJ/Fiji (únicamente para ser mostrado visualmente). Debido a que el péptido 2 fue el más intenso, la intensidad de este fue aumentada solamente la mitad de lo que fue aumentada para los péptidos 1 y 4. El apartado “Control” se refiere a la línea celular sometida a incubación con DMSO-agua (4:1) sin péptido, manteniendo el mismo porcentaje final de DMSO en el cultivo.

La figura 8, 9 y 10 muestran las micrografías a una amplificación de 30x obtenidas para las células HEK293T a 10, 5 y 1 μM , respectivamente

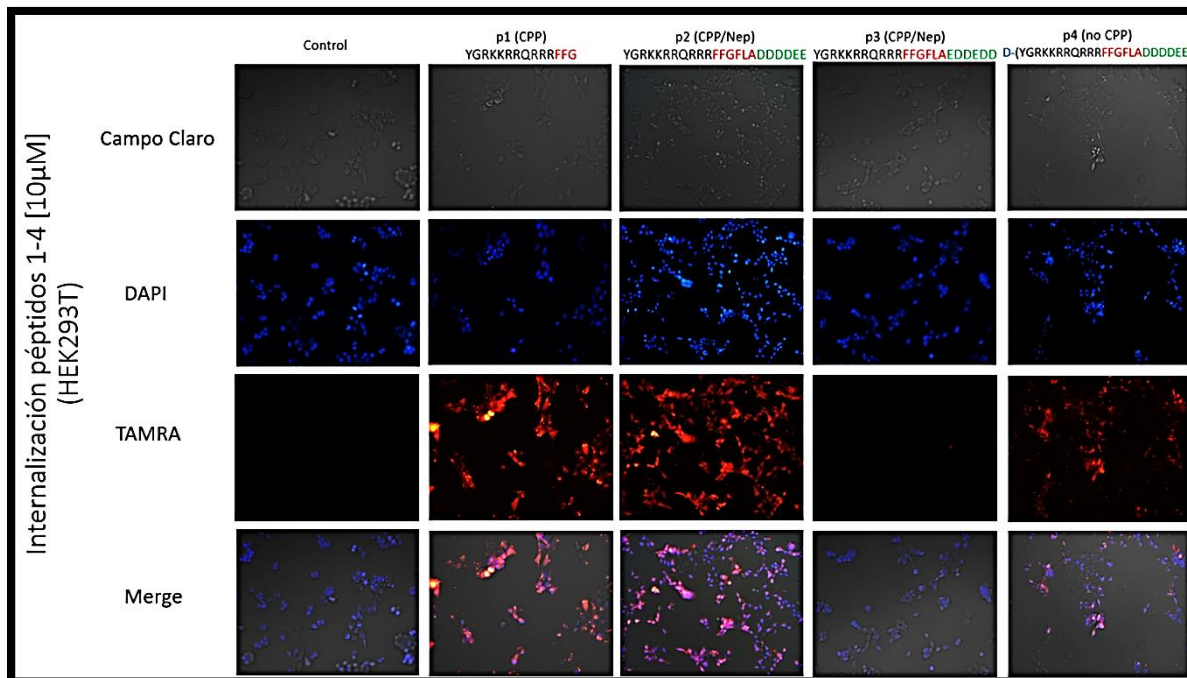


Figura 9. Micrografías tomadas con microscopía de epifluorescencia (30x) para células HEK293T a una concentración de péptido de 10 µM. En el encabezado se muestran: la secuencia de corte o parte de ella en rojo, péptido Tat en negro, secuencia que le confiere carácter no penetrador en verde y estereoisómero D en azul.

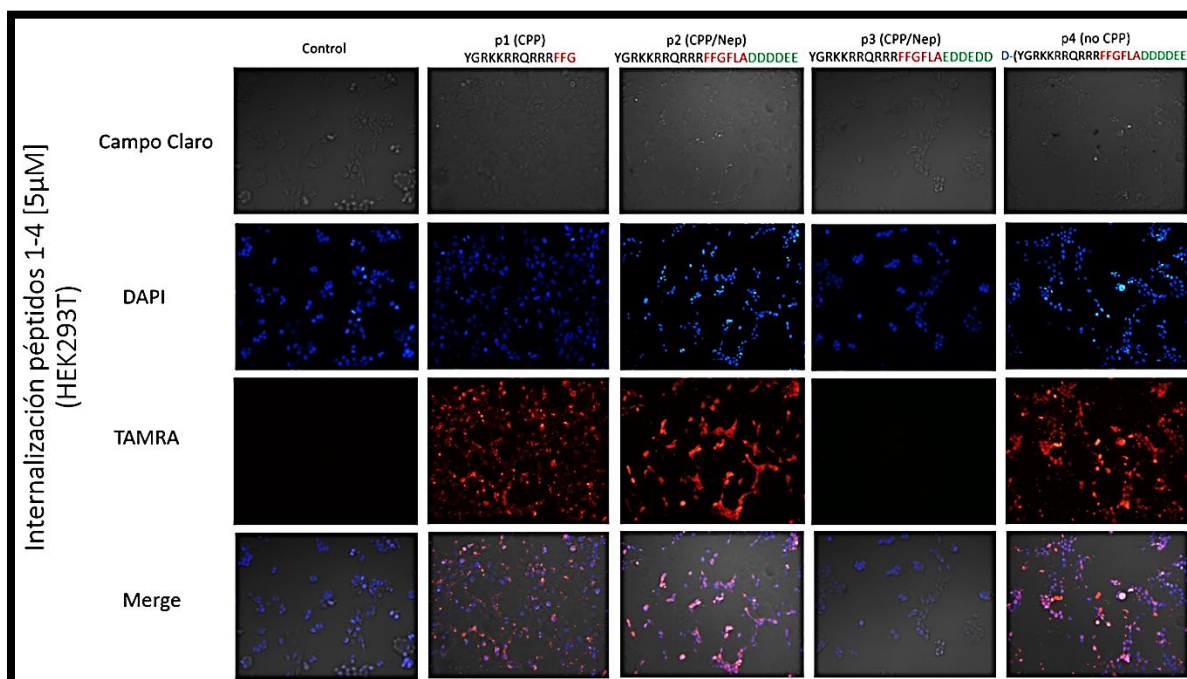


Figura 8. Micrografías tomadas con microscopía de epifluorescencia (30x) para células HEK293T a una concentración de péptido de 5 µM. En el encabezado se muestran: la secuencia de corte o parte de ella en rojo, péptido Tat en negro, secuencia que le confiere carácter no penetrador en verde y estereoisómero D en azul.

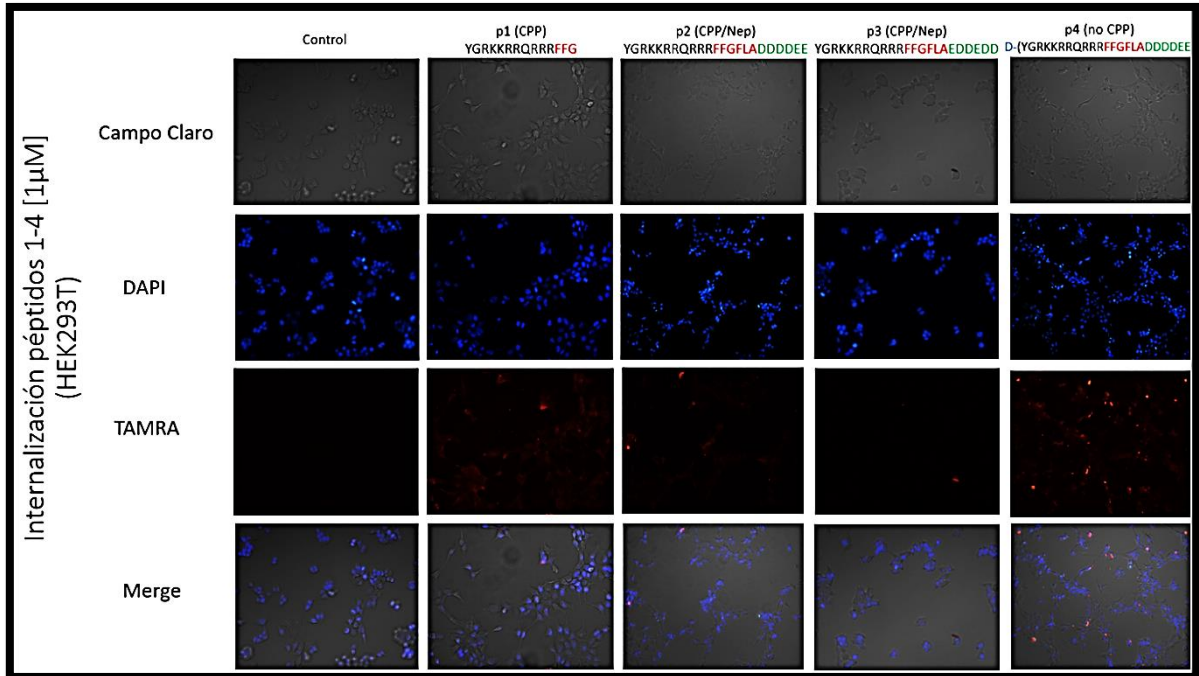


Figura 10. Micrografías tomadas con microscopía de epifluorescencia (30x) para células HEK293T a una concentración de péptido de 1 µM. En el encabezado se muestran: la secuencia de corte o parte de ella en rojo, péptido Tat en negro, secuencia que le confiere carácter no penetrador en verde y estereoisómero D en azul.

Las figuras anteriores muestran una asociación notable de los péptidos 1 y 2 (figura 8), los cuales pueden ser internalizados a partir de concentraciones de 1 uM (figura 10). Estos resultados tienen sentido, debido a que el péptido 1 es un péptido diseñado para ser penetrador (99% de probabilidad de ser un CPP). En cuanto al péptido 2, este resultado sugiere que la peptidasa está escindiendo a dicho péptido en el extremo amino de la fenilalanina coloreada en la secuencia YGRKKRRQRRRFFGFLADDDDEE, esta hidrólisis tiene como productos el péptido 1, el cual es internalizado, y una secuencia aminoacídica cargada negativamente. Sin dicha hidrólisis este péptido no podría ser internalizado, pues fue diseñado como un péptido no penetrador (11% de probabilidad de ser un CPP). Una manera de darle mayor veracidad a dicha observación es mediante el uso de espectrometría de masas, la cual es una técnica analítica que ha sido ampliamente usada para determinar la actividad enzimática (Elased, Cunha, Gurley, Coffman, & Morris, 2006). Sin embargo, dicha técnica no pudo ser llevada a cabo, por lo que se menciona como una perspectiva de este trabajo.

Por otra parte, la ausencia del péptido 3 en las micrografías puede explicarse debido a que dicho péptido mostró la formación de agregados en todas las concentraciones, siendo así no accesible a la acción de la peptidasa. En cuanto al péptido 4, el cual no debería de ser

internalizado, se muestra en las micrografías la presencia de este. Ya que dicho péptido tiene la secuencia de aminoácido reconocible por la neprilisina, aunque no pueda ser proteolizado por ella, es posible que este péptido se una a la neprilisina que se encuentra en la membrana de las células, este fenómeno es el fundamento de la técnica “Mirror-Image Phage Display”, en la cual se hace uso de los D-péptidos para inhibir actividades proteicas (Eckert, Malashkevich, Hong, Carr, & Kim, 1999).

Debido a que el péptido 3 no mostró las características necesarias para evaluar su actividad de penetrador celular selectivo debido a su baja solubilidad, se continuó haciendo ensayos de internalización para los 3 péptidos restantes. Las figuras 11, 12 y 13, muestran las micrografías obtenidas para células HeLa a 10, 5 y 1 μM , respectivamente. Dichas micrografías fueron adquiridas con un aumento de 30x.

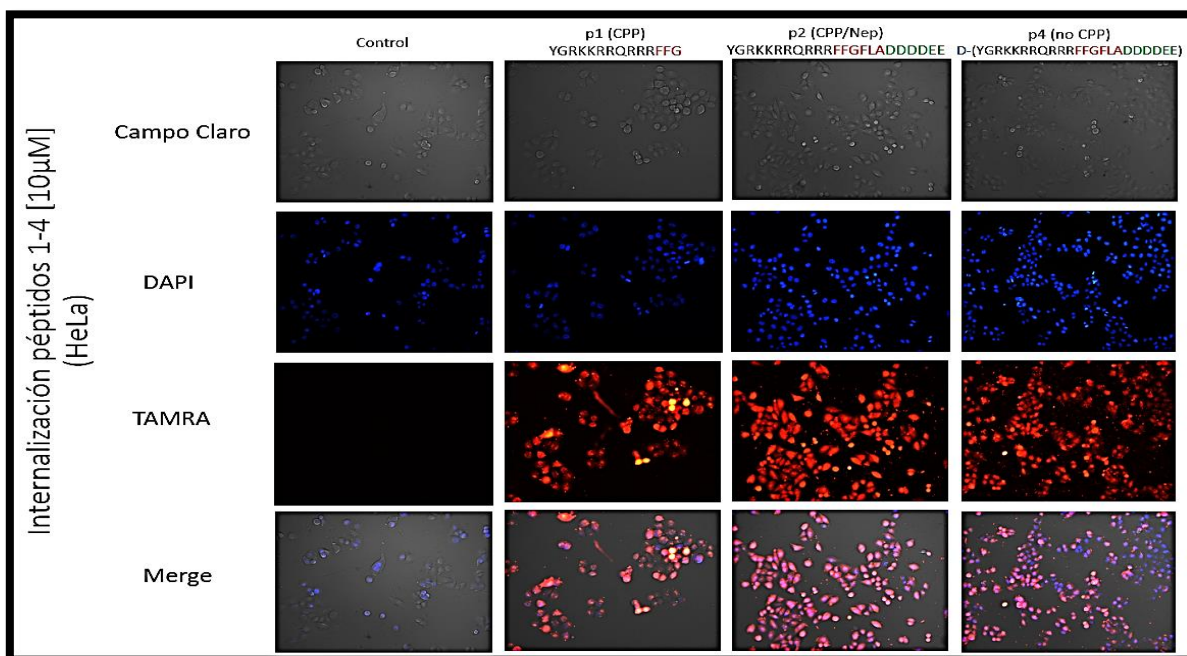


Figura 11. Micrografías tomadas con microscopía de epifluorescencia (30x) para células HeLa a una concentración de péptido de 10 μM . En el encabezado se muestran: la secuencia de corte o parte de ella en rojo, péptido Tat en negro, secuencia que le confiere carácter no penetrador en verde y estereoisómero D en azul.

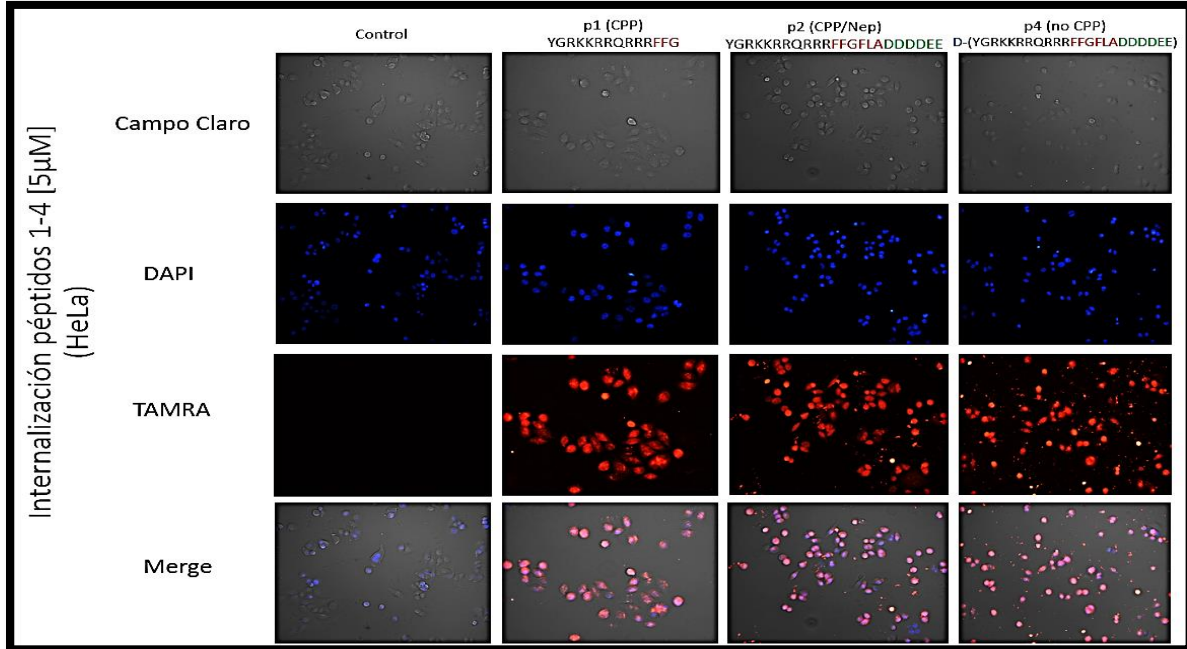


Figura 13. Micrografías tomadas con microscopía de epifluorescencia (30x) para células HeLa a una concentración de péptido de 5 µM. En el encabezado se muestran: la secuencia de corte o parte de ella en rojo, péptido Tat en negro, secuencia que le confiere carácter no penetrador en verde y estereoisómero D en azul.

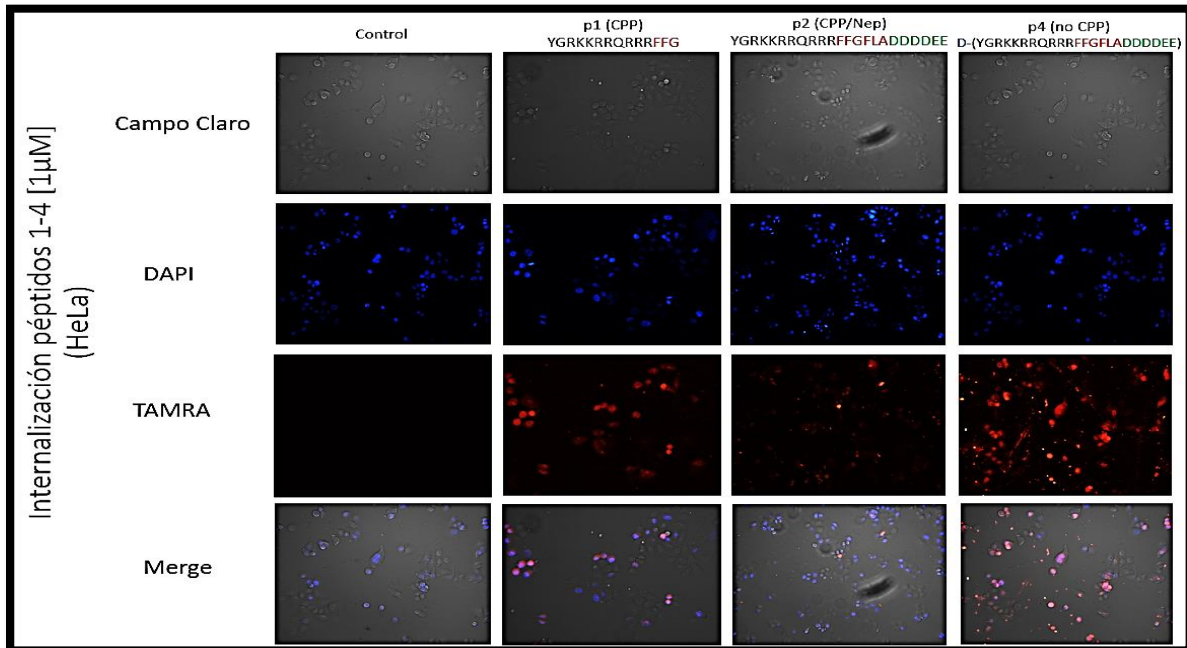


Figura 12. Micrografías tomadas con microscopía de epifluorescencia (30x) para células HeLa a una concentración de péptido de 1 µM. En el encabezado se muestran: la secuencia de corte o parte de ella en rojo, péptido Tat en negro, secuencia que le confiere carácter no penetrador en verde y estereoisómero D en azul.

En las figuras 11, 12 y 13 se observa como todos los péptidos se asocian a las células, el péptido 2 tiene una mayor presencia que el péptido 1 y 4, el control muestra células sanas (la concentración de DMSO no pareciera estar siendo tóxica) y también se observa asociación de los péptidos a las células a partir de concentraciones de 1 μM (figura 13). El péptido 1 muestra un patrón de internalización en ambas líneas celulares que se ha reportado en la literatura para algunos CPP incluyendo el péptido Tat, en donde se observa una internalización por dos vías; endocitosis, mostrada como diversos puntos rojos intensos (vesículas) y translocación directa, mostrada como una distribución uniforme muy intensa en toda la célula (Gronewold, Horn, & Neundorf, 2018; Mueller et al., 2008) como lo muestra la figura 14, en donde se observan las imágenes representativas para ambas líneas celulares del péptido 1 a una concentración de 10 μM (tomadas de las figuras 8 y 11). Sin embargo, el uso de un marcador de endosoma es necesario para corroborar dicha observación. Dicho fenómeno no es observado en los péptidos 2 y 4.

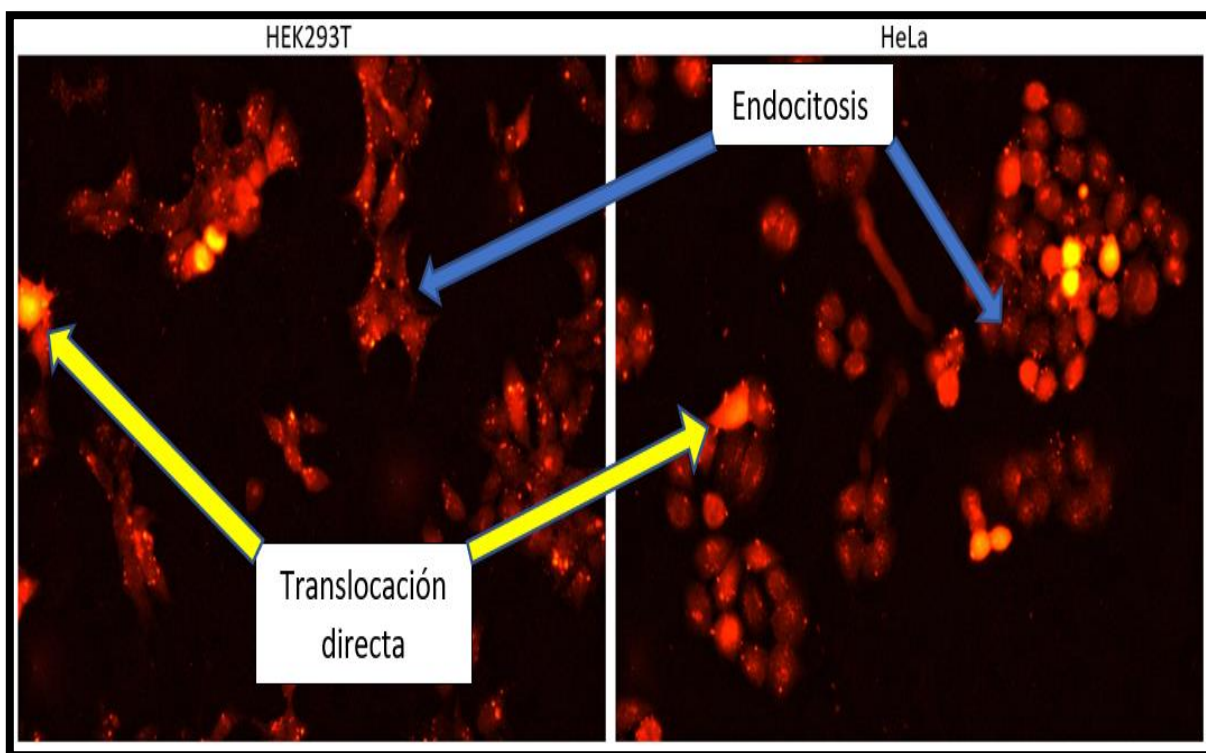


Figura 14. Vías de internalización encontradas en el péptido 1 (YGRKKRRQRRRFFG) para ambas líneas celulares a una concentración de 10 μM . Las líneas azules muestran ejemplos de endocitosis y las líneas amarillas de translocación directa.

Con el fin de conocer cuantitativamente las diferencias en la asociación de estos péptidos para cada línea celular, se realizó una medición de la intensidad de fluorescencia para cada núcleo con el uso del software libre ImageJ/Fiji y se graficaron tomando 400 células para cada concentración en las distintas líneas celulares, dicha medición se realizó por el triplicado de experimentos independientes, es decir, 1,200 células en total (figura 15).

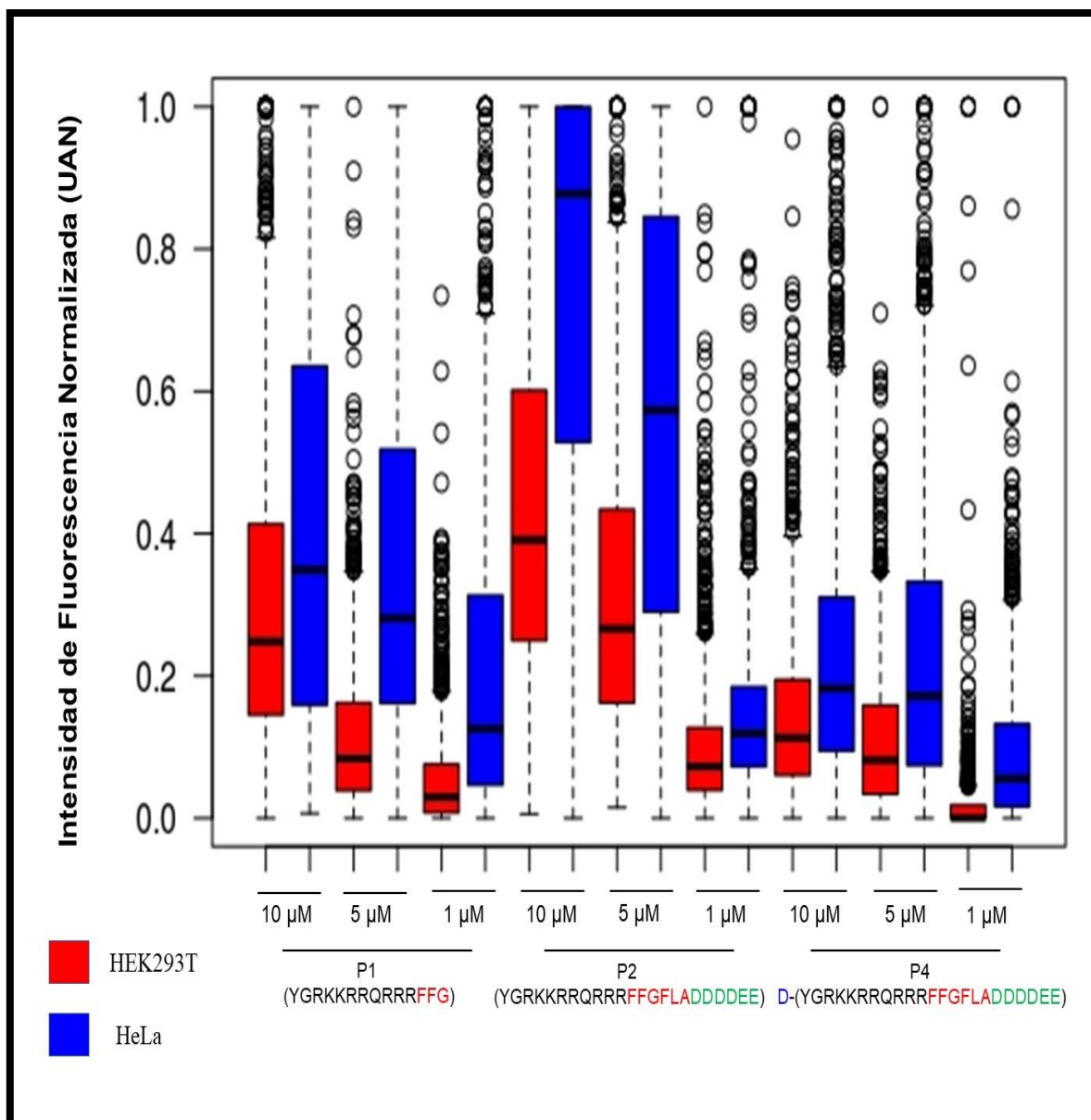


Figura 15. Diagrama de caja para las intensidades de fluorescencia encontradas en 1,200 células para los distintos péptidos en las líneas celulares HEK293T (rojo) y HeLa (azul). En la base se muestran: la secuencia de corte o parte de ella en rojo, péptido Tat en negro, secuencia que le confiere carácter no penetrador en verde y estereoisómero D en azul.

En la figura 15, las cajas representan el tramo de la escala que va desde el primer cuartil al tercero; es decir, el 50 % de las observaciones centrales. La mediana se dibuja mediante una línea horizontal dentro de la caja y a la altura del valor que representa esta medida. Los bigotes son las líneas punteadas que salen a los costados de la caja y que sirven para identificar las observaciones que están por fuera del 50 % central de la distribución y los círculos representan observaciones que se encuentran fuera de la periferia de la distribución. En dicha figura se puede observar como el péptido 1 tiende a asociarse ligeramente más a células HeLa que a HEK293T, resultado que coincide con lo reportado sobre la internalización del péptido Tat en ambas líneas celulares (Mueller et al., 2008). Dicho péptido muestra una asociación dependiente de la concentración, pues se ve una disminución de la intensidad de fluorescencia de este péptido a concentraciones menores; esta dependencia también es mostrada por los péptidos 2 y 4. El péptido 2 es quien mayor intensidad de fluorescencia presenta. Una forma de explicar que en ambas líneas celulares se observe una mayor fluorescencia proveniente de este péptido es que la neprilisina está funcionando como un atractor para este, debido al sitio de corte dentro de su secuencia (FFGFLA), lo que atraería mayor cantidad de dicho péptido al microambiente de la célula, ergo, tendría una mayor internalización, dicha observación es semejante a la mostrada en un trabajo anterior, en donde ligandos embebidos dentro de CPP pueden usar receptores de membrana para promover su internalización por un mecanismo independiente de una endocitosis mediada por receptor (Rodriguez Plaza et al., 2014). Esta explicación también es sustentada por el hecho de observar que la asociación del péptido 2 en la línea celular HeLa se ve drásticamente aumentada respecto a HEK293T, esto debido a que las células HeLa presentan mayor cantidad de neprilisina (el doble).

El péptido que menor intensidad de fluorescencia presenta en las células es el péptido 4, lo cual es consistente con lo establecido en el diseño experimental. Para evaluar si estos péptidos se están internalizado en las células, las muestras se analizaron mediante microscopia confocal, figura 16. Esta figura muestra dos imágenes por péptido para cada línea celular, a la izquierda una proyección en “yz” y a la derecha una proyección en “xy” a una concentración de 10 μ M de los péptidos.

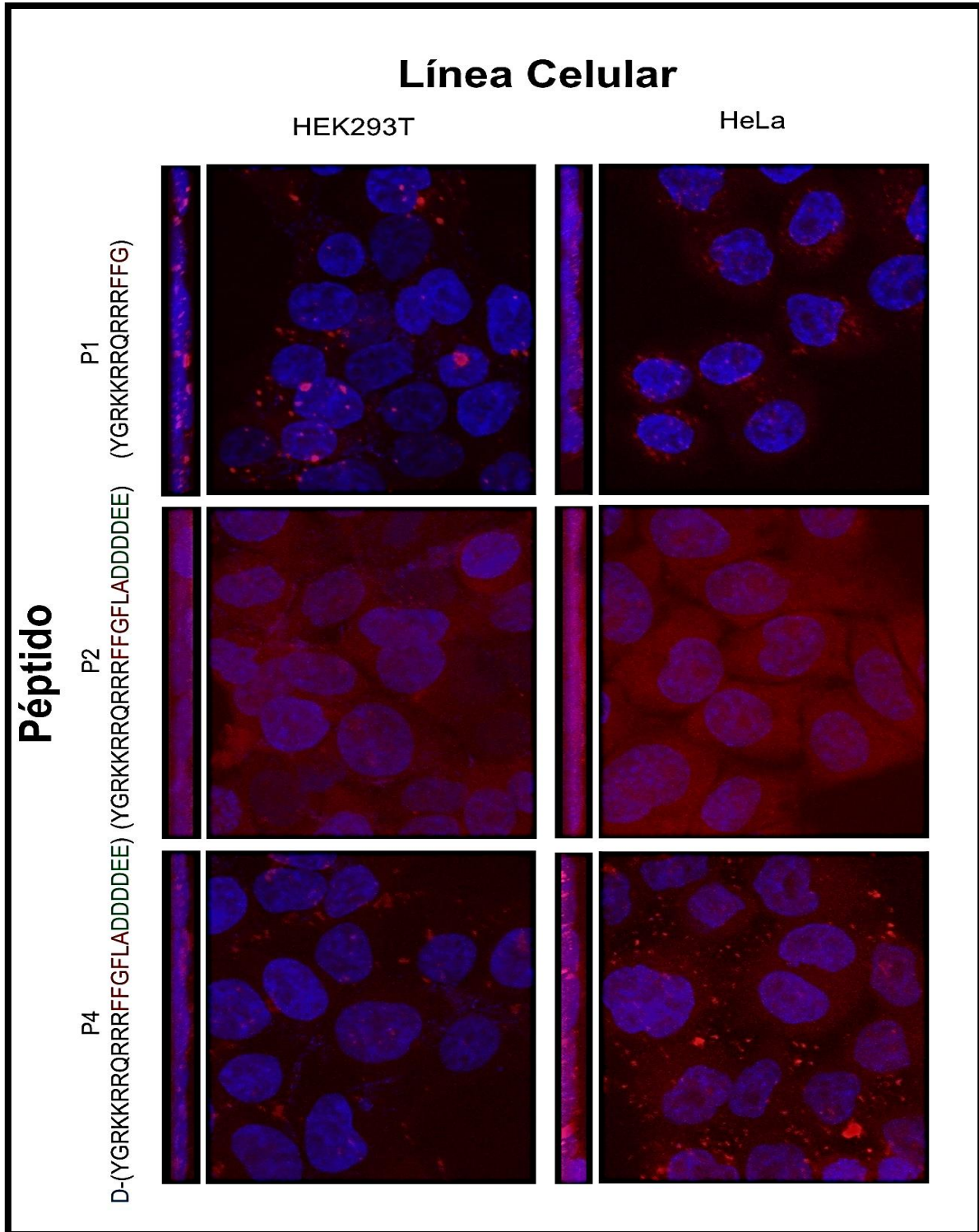


Figura 16. Proyección en 3 dimensiones para los péptidos 1, 2 y 4 en ambas líneas celulares a una concentración de 10 μ M obtenidas a partir de microscopia confocal. Al costado izquierdo se muestran: la secuencia de corte o parte de ella en rojo, péptido Tat en negro, secuencia que le confiere carácter no penetrador en verde y estereoisómero D en azul.

La figura 16 muestra que el péptido 4 se está internalizando ligeramente en ambas líneas celulares, cabe resaltar que se observan agregados en ambas micrografías (más en células HeLa), este resultado va en contra de lo esperado, pues este péptido no tendría que ser internalizado pues fue diseñado como péptido no penetrador (12 % de probabilidad de ser un CPP). Sin embargo, esto puede ser explicado debido a que se ha reportado en trabajos anteriores que péptidos penetradores que siguen la misma estrategia (ACPP), de tener un sitio de corte y una secuencia de aminoácidos con carga negativa que enmascarará la función penetradora de dichos péptidos, muestran tener cierto grado de internalización en células que no presentan la proteasa que los activará (Shi et al., 2012); cabe mencionar que en dicho trabajo la cantidad de aminoácidos cargados negativamente añadidos fue de 4. A pesar de tratar de disminuir o anular dicha función penetradora añadiendo 2 aminoácidos más cargados negativamente (6 en total, ver sección 6.1), pasando de tener una probabilidad de 52% (para 4 aminoácidos) de ser un péptido no penetrador a un 84 % (para 6 aminoácidos), nuestros resultados muestran que dicha función penetradora no puede ser removida completamente añadiendo secuencias negativas al CPP. Sin embargo, estos resultados muestran una disminución alrededor del doble en la internalización del péptido 4, respecto al péptido 1, para ambas líneas celulares a una concentración de 10 μ M.

La figura 16 muestra que todos los péptidos se están internalizando, pero acorde con los resultados obtenidos por microscopia de epifluorescencia (figura 15), el péptido 2 muestra una mayor internalización respecto a los otros péptidos para ambas líneas celulares. En células HeLa la internalización de dicho péptido es casi 5 veces mayor que la del péptido 4 a una concentración de 10 μ M y 4 veces mayor para células HEK293T a la misma concentración. Esta diferencia es similar a la observada por Shi *et al.*, 2012, en donde al comparar la internalización de un ACPP en una línea celular que no expresa la proteasa, respecto la misma línea, agregando dicha proteasa al medio observan que la internalización es de 3 a 5 veces mayor cuando agregan la proteasa, MMP2 y colagenasa IV, respectivamente. Y comparando la internalización del ACPP en dos líneas celulares distintas, observan que en las líneas que sobre expresan la proteasa, la internalización del péptido es 3.3 veces mayor respecto de las líneas con bajos niveles de expresión de dicha proteasa, a pesar de que en dicho trabajo no se muestran las diferencias en los niveles de expresión de proteasa para estas líneas celulares, nuestros datos sugieren que la internalización de ACPP

está relacionada casi de manera lineal con la cantidad de proteasa expresada, pues acorde con el inmunoblot (figura 7), las células HeLa presentan alrededor del doble de expresión de neprilisina respecto a HEK293T y observando la figura 15 para las concentraciones de 5 y 10 μM , se observa una intensidad de fluorescencia de 2.1 y 2.2 veces mayor en células HeLa respecto a HEK293T.

Nuestros datos sugieren que agregar una secuencia de corte de una peptidasa de membrana a un péptido penetrador le confiere selectividad de dos maneras, la primera disminuyendo la internalización de este péptido en células que no pueden hidrolizar al péptido (péptido 4) y segundo, aumentando dicha internalización en las células que presenten la proteasa de membrana encargada en activar a los ACPPs (péptido 2), el hecho de que este segundo mecanismo no sea observado en (Shi et al., 2012) puede ser debido a que las proteasas usadas en ese trabajo no están ancladas a membrana.

VII. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos sugieren que el diseño de los péptidos fluorogénicos con la estrategia Peptidasa-Péptido puede ser útil como una herramienta de selectividad celular, mediante dos mecanismos, el primero, disminuyendo la internalización de este péptido en células que no pueden hidrolizar al péptido (péptido 4) y segundo, aumentando dicha internalización en las células que presenten la proteasa de membrana encargada en activar a los ACPPs, como lo muestra la internalización del péptido 2 (el cual debería ser hidrolizado para fungir como CPP), la cual es mayor en células HeLa, quienes presentan 2 veces mayor cantidad de neprilisina que las células HEK293T. Mis resultados validan la estrategia peptidasa-péptido para conferir selectividad a CPP.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Al-Taei, S., Takeuchi, T., Fretz, M. M., Nakase, I., Storm, G., Futaki, S., ... Jones, A. T. (2007). Temperature-, concentration- and cholesterol-dependent translocation of L- and D-octa-arginine across the plasma and nuclear membrane of CD34 + leukaemia cells . *Biochemical Journal*, 403(2), 335–342. <https://doi.org/10.1042/bj20061808>
- Alves, I. D., Goasdoué, N., Correia, I., Aubry, S., Galanth, C., Sagan, S., ... Chassaing, G. (2008). Membrane interaction and perturbation mechanisms induced by two cationic cell penetrating peptides with distinct charge distribution. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1780(7–8), 948–959. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.04.004>
- Bai, M., Agnantis, N. J., Skyrlas, A., Tsanou, E., Kamina, S., Galani, V., & Kanavaros, P. (2003). Increased expression of the bcl6 and CD10 proteins is associated with increased apoptosis and proliferation in diffuse large B-cell lymphomas. *Modern Pathology*, 16(5), 471–480. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000067684.78221.6E>
- Balayssac, S., Burlina, F., Convert, O., Bolbach, G., Chassaing, G., & Lequin, O. (2006). Comparison of penetratin and other homeodomain-derived cell-penetrating peptides: Interaction in a membrane-mimicking environment and cellular uptake efficiency. *Biochemistry*, 45(5), 1408–1420. <https://doi.org/10.1021/bi0518390>
- Bechara, C., & Sagan, S. (2013). Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Letters*, 587(12), 1693–1702. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.031>
- Berlose, J. P., Convert, O., Derossi, D., Brunissen, A., & Chassaing, G. (1996). Conformational and associative behaviours of the third helix of antennapedia homeodomain in membrane-mimetic environments. *European Journal of Biochemistry*, 242(2), 372–386. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0372r.x>
- Borsello, T., Bonny, C., Bogousslavsky, J., Hirt, L., Clarke, P. G. H., Repici, M., ... Vercelli, A. (2003). A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nature Medicine*, 9(9), 1180–1186. <https://doi.org/10.1038/nm911>
- Boukaissi, M., Quinonero, J., Dubois, V., de Coupade, C., Zoubaa, I., Arranz, V., ... Kearsy, J. (2008). DTS-108, A Novel Peptidic Prodrug of SN38: In vivo Efficacy and Toxicokinetic Studies. *Clinical Cancer Research*, 14(7), 2145–2153. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-4580>
- Brock, R. (2014). The uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides: Putting the puzzle together. *Bioconjugate Chemistry*, 25(5), 863–868. <https://doi.org/10.1021/bc500017t>
- Carson, J. A., & Turner, A. J. (2002). β -Amyloid catabolism : roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases ?, 1–8.
- Cohen, A. J., Bunn, P. A., Franklin, W., Magill-solc, C., Hartmann, C., Heifrich, B., ... Miller, Y. E.

(1996). Neutral Endopeptidase : Variable Expression in Human Lung , Inactivation in Lung Cancer , and Modulation of Peptide-induced Calcium Flux1.

Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, *422*(6), 806–808. <https://doi.org/10.1038/nature01451>

Cruden, N. L. M., Fox, K. A. A., Ludlam, C. A., Johnston, N. R., & Newby, D. E. (2004). Neutral endopeptidase inhibition augments vascular actions of bradykinin in patients treated with angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension*, *44*(6), 913–918. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000146483.78994.56>

Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., & Prochiantz, A. (1996). Cell internalization of the third helix of the antennapedia homeodomain is receptor-independent. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(30), 18188–18193. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.18188>

Diener, C., Garza Ramos Martínez, G., Moreno Blas, D., Castillo González, D. A., Corzo, G., Castro-Obregon, S., & Del Rio, G. (2016). Effective Design of Multifunctional Peptides by Combining Compatible Functions. *PLoS Computational Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004786>

Dietz, G. P. H., & Bähr, M. (2004). Delivery of bioactive molecules into the cell: The Trojan horse approach. *Molecular and Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.03.005>

Dinca, A., Chien, W. M., & Chin, M. T. (2016). Intracellular delivery of proteins with cell-penetrating peptides for therapeutic uses in human disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(2). <https://doi.org/10.3390/ijms17020263>

Eckert, D. M., Malashkevich, V. N., Hong, L. H., Carr, P. A., & Kim, P. S. (1999). Inhibiting HIV-1 Entry : Discovery of D-Peptide Inhibitors that Target the gp41 Coiled-Coil Pocket, *99*, 103–115.

Economou, A., Kalodimos, C. G., Karamanou, S., Gelis, I., & Gouridis, G. (2009). Signal peptides are allosteric activators of the protein translocase. *Nature*, *462*(7271), 363–367. <https://doi.org/10.1038/nature08559>

Efthymiadis, A., Briggs, L. J., & Jans, D. A. (1998). The HIV-1 Tat Nuclear Localization Sequence Confers Novel Nuclear Import Properties *, *273*(3), 1623–1628.

Elased, K. M., Cunha, T. S., Gurley, S. B., Coffman, T. M., & Morris, M. (2006). New Mass Spectrometric Assay for Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activity, *2*, 1010–1017. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000215588.38536.30>

Ellerby, M. H., Arap, W., Ellerby, M. L., Kain, R., Andrusiak, R., del Rio, G., ... Pasqualini, R. (1999). *Nat Med* 1999 Ellerby, *5*(9), 1–7. Retrieved from [papers2://publication/uuid/71905DCA-F5AC-4B83-A8A4-16A8A6CA67F5](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10719055/)

Ferrari, A., Pellegrini, V., Arcangeli, C., Fittipaldi, A., Giacca, M., & Beltram, F. (2003). Caveolae-

- mediated internalization of extracellular HIV-1 Tat fusion proteins visualized in real time. *Molecular Therapy*, 8(2), 284–294. [https://doi.org/10.1016/S1525-0016\(03\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S1525-0016(03)00122-9)
- Freire, J. M., Rego de Figueiredo, I., Valle, J., Veiga, A. S., Andreu, D., Enguita, F. J., & Castanho, M. A. R. B. (2017). siRNA-cell-penetrating peptides complexes as a combinatorial therapy against chronic myeloid leukemia using BV173 cell line as model. *Journal of Controlled Release*, 245, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.027>
- Fujimoto, Y., Nakanishi, Y., Sekine, S., Yoshimura, K., Akasu, T., Moriya, Y., & Shimoda, T. (2005). CD10 expression in colorectal carcinoma correlates with liver metastasis. *Diseases of the Colon and Rectum*, 48(10), 1883–1889. <https://doi.org/10.1007/s10350-005-0141-6>
- Gait, M. J., Iversen, P. L., Lebleu, B., Stein, D. A., Arzumanov, A. A., Abes, S., ... Ivanova, G. D. (2007). Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(4–5), 517–529. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.09.002>
- Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M. R., & Cordeiro, M. F. (2013). Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO, 1–14. <https://doi.org/10.1096/fj.13-235440>
- Gautam, A., Chaudhary, K., Kumar, R., Sharma, A., Kapoor, P., & Tyagi, A. (2013). Open source drug discovery consortium. Raghava GPS: In silico approaches for designing highly effective cell penetrating peptides. *J Transl Med*, 11, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-74>
- Goun, E. A., Galliher, W. C., Jones, L. R., Pillow, T. H., & Wender, P. A. (2007). The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(4–5), 452–472. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.10.016>
- Gronewold, A., Horn, M., & Neundorff, I. (2018). Design and biological characterization of novel cell-penetrating peptides preferentially targeting cell nuclei and subnuclear regions, 1378–1388. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.116>
- Hällbrink, M., & Karelson, M. (2015). Prediction of cell-penetrating peptides. In *Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2806-4_3
- Heinzelmann, M., Platz, a, Flodgaard, H., Polk, H. C., & Miller, F. N. (1999). Endocytosis of heparin-binding protein (CAP37) is essential for the enhancement of lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production in human monocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(7), 4240–4245. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10201953>
- Heistad, D. D., Patel, P., Richardson, S., Chu, Y., Piper, R., & Watanabe, Y. (2006). Endocytosis of Extracellular Superoxide Dismutase Into Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(9), 1985–1990. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000234921.88489.5c>
- Hellberg, S., Sjoström, M., Skagerberg, B., & Wold, S. (1987). Peptide Quantitative Structure-Activity Relationships, a Multivariate Approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, 30, 1126–1135. Retrieved from

papers2://publication/uuid/CEC30CA0-A6CE-4E51-81B3-5B0E06188CAC

Herce, H. D., & Garcia, A. E. (2007). Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(52), 20805–20810. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706574105>

Hershl, L. B., & Morihara, K. (1986). Comparison of the Subsite Specificity of the Mammalian Neutral Endopeptidase 24 . 11 (Enkephalinase) to the Bacterial Neutral Endopeptidase Thermolysin ”.

Howell, S., Murray, H., Scott, C. S., Turner, A. J., & Kenny, A. J. (1991). applicable to material of porcine and human origin, *278*, 417–421.

Joanne, P., Galanth, C., Goasdoué, N., Nicolas, P., Sagan, S., Lavielle, S., ... Alves, I. D. (2009). Lipid reorganization induced by membrane-active peptides probed using differential scanning calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1788*(9), 1772–1781. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.05.001>

Kaplan, I. M., Wadia, J. S., & Dowdy, S. F. (2005). Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *Journal of Controlled Release*, *102*(1), 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.10.018>

Karelson, M., & Dobchev, D. (2011). Using artificial neural networks to predict cell-penetrating compounds. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *6*(8), 783–796. <https://doi.org/10.1517/17460441.2011.586689>

Karelson, M., Lobanov, V. S., & Katritzky, A. R. (1996). Quantum-Chemical Descriptors in QSAR/QSPR Studies. *Chemical Reviews*, *96*(3), 1027–1044. <https://doi.org/10.1021/cr950202r>

Kerkis, I., de Brandão Prieto da Silva, A. R., Pompeia, C., Tytgat, J., & de Sá Junior, P. L. (2017). Toxin biopptides: exploring toxin biological activity and multifunctionality. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2343-6>

Koren, E., & Torchilin, V. P. (2012). Cell-penetrating peptides: Breaking through to the other side. *Trends in Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.012>

Koussounadis, A., Langdon, S. P., Um, I. H., Harrison, D. J., & Smith, V. A. (2015). Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA- protein correlations in a xenograft model system. *Nature Publishing Group*, (May), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep10775>

Layek, B., Lipp, L., & Singh, J. (2015). Cell penetrating peptide conjugated chitosan for enhanced delivery of nucleic acid. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(12), 28912–28930. <https://doi.org/10.3390/ijms161226142>

Lin, Y. Z., Yao, S., Veach, R. A., Torgerson, T. R., & Hawiger, J. (1995). Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF- κ B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable

motif and nuclear localization sequence. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.24.14255>

Lindgren, M., Hällbrink, M., Prochiantz, a, & Langel, U. (2000). Cell-penetrating peptides. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21(3), 99–103. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01447-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01447-4)

Lopes, L. B., Furnish, E. J., Komalavilas, P., Flynn, C. R., Ashby, P., Hansen, A., ... Brophy, C. M. (2009). Cell permeant peptide analogues of the small heat shock protein, HSP20, reduce TGF- β 1-induced CTGF expression in keloid fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(3), 590–598. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.264>

Lu, S., Tager, L. A., Chitale, S., & Riley, L. W. (2006). A cell-penetrating peptide derived from mammalian cell uptake protein of Mycobacterium tuberculosis. *Analytical Biochemistry*, 353(1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.044>

Lukanowska, M., Howl, J., & Jones, S. (2013). Bioportides: Bioactive cell-penetrating peptides that modulate cellular dynamics. *Biotechnology Journal*, 8(8), 918–930. <https://doi.org/10.1002/biot.201200335>

Maiolo, J. R., Ottinger, E. A., & Ferrer, M. (2004). Specific redistribution of cell-penetrating peptides from endosomes to the cytoplasm and nucleus upon laser illumination. *Journal of the American Chemical Society*, 126(47), 15376–15377. <https://doi.org/10.1021/ja044867z>

Martin, P., Rebolledo, A. pdf., Kane, R. S., Hecce, H. D., Enrique, N., Garcia, A. E., ... Milesi, V. (2009). Arginine-Rich Peptides Destabilize the Plasma Membrane, Consistent with a Pore Formation Translocation Mechanism of Cell-Penetrating Peptides. *Biophysical Journal*, 97(7), 1917–1925. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.05.066>

Matsas, R., Fulcher, I. A. N. S., Kenny, A. J., & Turner, A. J. (1983). Substance P and [Leulenkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli, 80(May), 3111–3115.

Matsushita, M., Tamiya, T., Date, I., Michiue, H., Matsui, H., Tomizawa, K., ... Ichikawa, T. (2004). The NH 2 Terminus of Influenza Virus Hemagglutinin-2 Subunit Peptides Enhances the Antitumor Potency of Polyarginine-mediated p53 Protein Transduction . *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 8285–8289. <https://doi.org/10.1074/jbc.m412430200>

Milletti, F. (2012a). Cell-penetrating peptides: Classes, origin, and current landscape. *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.002>

Milletti, F. (2012b). Cell-penetrating peptides: Classes, origin, and current landscape. *Drug Discovery Today*, 17(15–16), 850–860. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.03.002>

Morin, J., Kovac, Æ. C., Chung, Æ. D. L., Chie, L., Friedman, Æ. F. K., & Pincus, Æ. M. R. (2003). Peptides designed from molecular modeling studies of the ras-p21 protein induce phenotypic reversion

of a pancreatic carcinoma cell line but have no effect on normal pancreatic acinar cell growth, 202–208. <https://doi.org/10.1007/s00280-003-0639-3>

Mueller, J., Kretzschmar, I., Volkmer, R., & Boisguerin, P. (2008). Comparison of Cellular Uptake Using 22 CPPs in 4 Different Cell Lines. *Bioconjugate Chemistry*, 19, 2363–2374.

Oess, S., & Hildt, E. (2000). Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. *Gene Therapy*, 7(9), 750–758. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301154>

Ogłęcka, K., Wittrup, A., Gräslund, A., Lilja, J., Sandgren, S., Lundberg, P., ... Göran Eriksson, L. E. (2006). N-terminal peptides from unprocessed prion proteins enter cells by macropinocytosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(2), 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.065>

Padari, K., Pooga, M., Lorents, A., Palm-Apergi, C., & Hällbrink, M. (2008). The membrane repair response masks membrane disturbances caused by cell-penetrating peptide uptake. *The FASEB Journal*, 23(1), 214–223. <https://doi.org/10.1096/fj.08-110254>

Pae, J., & Pooga, M. (2014). Peptide-mediated delivery: an overview of pathways of efficient internalization. *Therapeutic Delivery*, 7(2), 117–138. <https://doi.org/10.4155/tde.15.92>

Patel, L. N., Zaro, J. L., & Shen, W. C. (2007). Cell penetrating peptides: Intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9303-7>

Pooga, M., & Langel, Ü. (2015). *Cell-Penetrating Peptides - Methods and Protocols. Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2806-4_1

Pozsgay, M., Michaud, C., Liebman, M., & Orłowski, M. (1986). Substrate and Inhibitor Studies of Thermolysin-like Neutral Metalloendopeptidase from Kidney Membrane Fractions . Comparison with Bacterial Thermolysin, (1967).

Ragin, A. D., Morgan, R. A., & Chmielewski, J. (2002). Cellular import mediated by nuclear localization signal peptide sequences. *Chemistry and Biology*, 9(8), 943–948. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00189-8](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00189-8)

Ramsey, J. D., & Flynn, N. H. (2015). Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells. *Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.07.003>

Rawlings, A. E. (2016). Membrane proteins: always an insoluble problem?, 44, 790–795. <https://doi.org/10.1042/BST20160025>

Richard, J. P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B., & Chernomordik, L. V. (2005). Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15), 15300–15306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401604200>

- Rodriguez Plaza, J. G., Morales-Nava, R., Diener, C., Schreiber, G., Gonzalez, Z. D., Ortiz, M. T. L., ... Del Rio, G. (2014). Cell penetrating peptides and cationic antibacterial peptides: Two sides of the same coin. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.515023>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Sheppard, J. D., Hosseini, A., DiSandro, G., Williams, P. B., Samudre, S. S., & Lattanzio, F. A. (2011). Efficacy of a Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer Antisense Compound in the Inhibition of Corneal Transplant Rejection in a Rat Cornea Transplant Model. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 28(2), 194–201. <https://doi.org/10.1089/jop.2011.0135>
- Shi, N. Q., Gao, W., Xiang, B., & Qi, X. R. (2012). Enhancing cellular uptake of activable cell-penetrating peptide-doxorubicin conjugate by enzymatic cleavage. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1613–1621. <https://doi.org/10.2147/IJN.S30104>
- Shi, N. Q., Qi, X. R., Xiang, B., & Zhang, Y. (2014). A survey on “trojan Horse” peptides: Opportunities, issues and controlled entry to “troy.” *Journal of Controlled Release*, 194, 53–70. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.08.014>
- Splith, K., & Neundorff, I. (2011). Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa. *European Biophysics Journal*, 40(4), 387–397. <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0682-7>
- Stalmans, S., Bracke, N., Wynendaele, E., Gevaert, B., Peremans, K., Burvenich, C., ... De Spiegeleer, B. (2015). Cell-penetrating peptides selectively cross the blood-brain barrier in vivo. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139652>
- Stalmans, S., Wynendaele, E., Bracke, N., Gevaert, B., D’Hondt, M., Peremans, K., ... De Spiegeleer, B. (2013). Chemical-Functional Diversity in Cell-Penetrating Peptides. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071752>
- Sumitomo, M., Iwase, A., Zheng, R., Navarro, D., Kaminetzky, D., Shen, R., ... Nanus, D. M. (2004). Synergy in tumor suppression by direct interaction of Neutral Endopeptidase with PTEN, 5(January), 67–78.
- Terrone, D., Sang, S. L. W., Roudaia, L., & Silviu, J. R. (2003). Penetratin and Related Cell-Penetrating Cationic Peptides Can Translocate Across Lipid Bilayers in the Presence of a Transbilayer Potential. *Biochemistry*, 42(47), 13787–13799. <https://doi.org/10.1021/bi035293y>
- Tünnemann, G., Ter-Avetisyan, G., Martin, R. M., Stöckl, M., Herrmann, A., & Cardoso, M. C. (2008). Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *Journal of Peptide Science*. <https://doi.org/10.1002/psc.968>
- Velazquez, E. F., Yancovitz, M., Pavlick, A., Berman, R., Shapiro, R., Bogunovic, D., ... Osman, I.

- (2007). Clinical relevance of Neutral Endopeptidase (NEP/CD10) in melanoma. *Journal of Translational Medicine*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-2>
- Wadia, J. S., Stan, R. V., & Dowdy, S. F. (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nature Medicine*, 10(3), 310–315. <https://doi.org/10.1038/nm996>
- Warso, M. A., Richards, J. M., Mehta, D., Christov, K., Schaeffer, C., Rae Bressler, L., ... Das Gupta, T. K. (2013). A first-in-class, first-in-human, phase I trial of p28, a non-HDM2-mediated peptide inhibitor of p53 ubiquitination in patients with advanced solid tumours. *British Journal of Cancer*, 108(5), 1061–1070. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.74>
- Wender, P. A., Lewis, R. S., Rothbard, J. B., Jessop, T. C., & Murray, B. A. (2004). Role of Membrane Potential and Hydrogen Bonding in the Mechanism of Translocation of Guanidinium-Rich Peptides into Cells. *Journal of the American Chemical Society*, 126(31), 9506–9507. <https://doi.org/10.1021/ja0482536>
- Wender, P. A., Mitchell, D. J., Pattabiraman, K., Pelkey, E. T., Steinman, L., & Rothbard, J. B. (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.24.13003>
- Y., M., S., W., L., C., A., K., T., I., M., S., ... O., O. (2011). Distribution of KAI-9803, a novel δ -protein kinase C inhibitor, after intravenous administration to rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 39(10), 1946–1953. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.040725.1>
- Yoo, J., Rejinold, N. S., Lee, D. Y., Jon, S., & Kim, Y. (2017). Protease-activatable cell-penetrating peptide possessing ROS-triggered phase transition for enhanced cancer therapy. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.08.026>
- Ziegler, A., & Seelig, J. (2008). Binding and clustering of glycosaminoglycans: A common property of mono- and multivalent cell-penetrating compounds. *Biophysical Journal*. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.113472>

IX. MATERIAL SUPLEMENTARIO

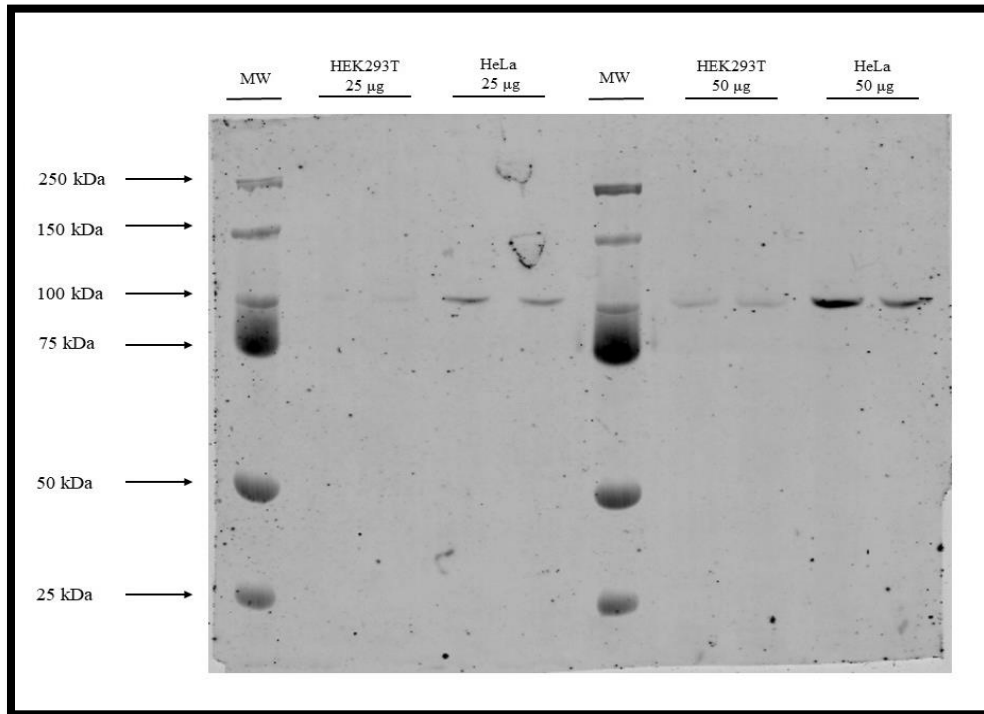


Figura Suplementaria 1. Inmunoblot original (Neprilisina)

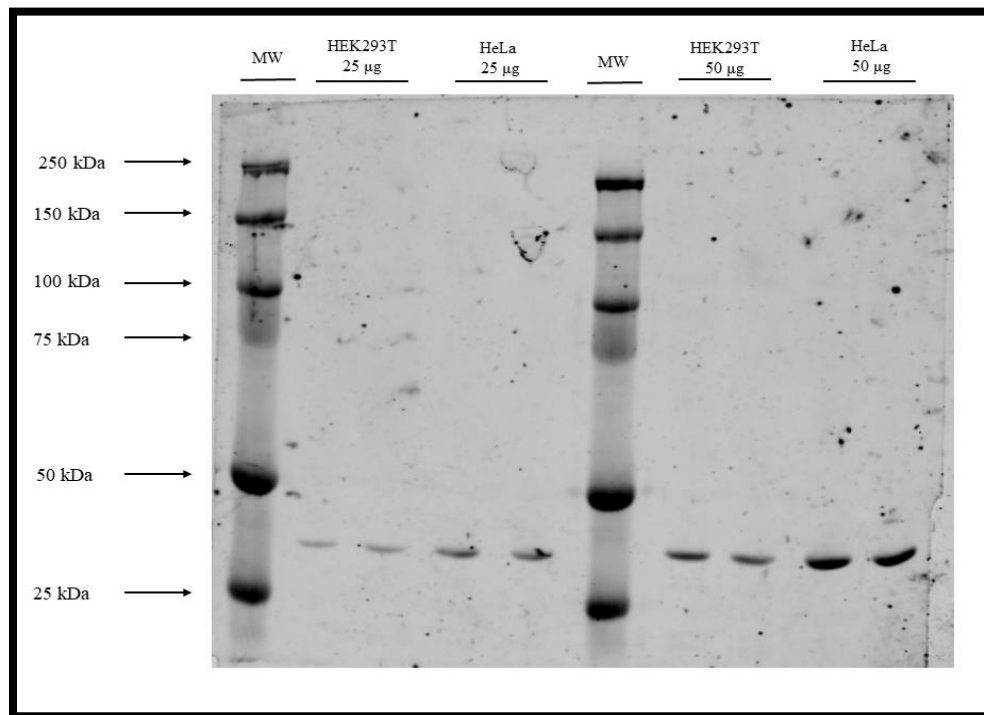


Figura Suplementaria 2. Inmunoblot original (Actina)