

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS SECRETARÍA
DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

EFFECTO ANTICANCERÍGENO DE LACTOFERRINA HUMANA RECOMBINANTE
EXPRESADA EN *PICHIA PASTORIS* SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER DE SENO

POR:

M. C. BLANCA FLOR IGLESIAS FIGUEROA

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

FEBRERO DE 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., 19 de Febrero del 2019
25/SIP/2019

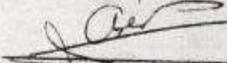
Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
Presente:

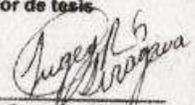
Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la Tesis intitulada **Efecto anticancerígeno de lactoferrina humana recombinante expresada en *Pichia pastoris*** sobre células de cáncer de seno. Presentada por la M.C. Blanca Flor Iglesias Figueroa alumna del Programa de Doctorado en Ciencias.

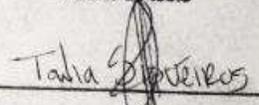
Después de la revisión, indicamos al Tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

Atentamente
"Por la Ciencia para Bien del Hombre"

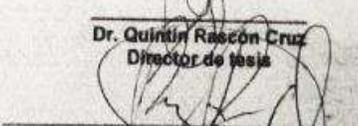

Dr. Edward Alexander Espinoza Sánchez
Asesor de tesis


Dr. Sigifredo Arevato Gallegos
Asesor de tesis


Dra. Sugey Ramoña Sinawaga García
Asesora de tesis


M.C. Tania Samantha Siqueiros Cendón
Asesora de tesis


Dr. Quintín Rasón Cruz
Director de tesis


Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado



"El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Circuito Universitario
Campus Universitario #2 C.P. 31125
Tel. +52 (614) 236 8000

© Derechos Reservados

Blanca Flor Iglesias Figueroa

Circuito Universitario s/n Nuevo
campus Universitario. C.P. 31125.

Febrero 2019

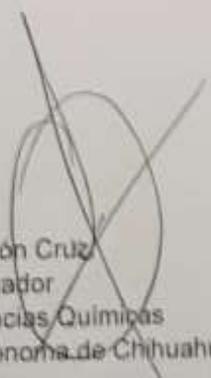
Cd. Chihuahua, Chih, a 18 de febrero de 2019

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
PRESENTE.

El que suscribe, Dr. Quintín Rascón Cruz, profesor investigador adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas, y director de tesis del programa **Doctorado en Ciencias** de la estudiante **Blanca Flor Iglesias Figueroa**, hago constar que su trabajo de tesis doctoral titulado **"Efecto anticancerígeno de lactoferrina humana recombinante expresada en *Pichia pastoris* sobre células de cáncer de seno"** se encuentra concluido y liberado por un servidor, por lo cual, está listo para proceder con los trámites necesarios para su proceso de titulación.

Agradeciendo de antemano todas las atenciones brindadas, quedo de usted

Cordialmente,



Dr. Quintín Rascón Cruz
Profesor Investigador
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

DEDICATORIA

Para mi pequeña hija, que viene en camino. Aunque todavía no te conozco, ya eres la fuerza más poderosa que impulsa mi diario vivir. Te amo más que a mi propia vida.

Para mis papás, Margarita Figueroa y Gilberto Iglesias, quienes siempre me han enseñado que rendirme jamás será una opción. Gracias por su infinito amor y esfuerzo. No hay mayor orgullo que tenerlos. Una vida será corta, para estar agradecida con Dios por ser su hija.

Para mis hermanas, Cristina y Margarita. En mis días más oscuros, ustedes han sido la luz. Las amo.

Para mamá Albina. Sé que estás infinitamente feliz por esta gran meta que culmina. Tengo la certeza de que jamás te irás, mientras vivas en mi corazón. Te amo por siempre.

“...La inmensidad, sólo es soportable a través del amor”

Carl Sagan

AGRADECIMIENTOS

A Dios. Por cada instante que me regala día con día, por todas las bendiciones que a lo largo de este camino me ha concedido, y por darme la satisfacción de culminar esta etapa tan importante de mi vida profesional.

A mis papás, Margarita y Gilberto. Por ser increíblemente valientes y esforzarse más allá de lo posible en su deseo de darnos lo mejor de la vida; gracias por amarnos tanto, este logro no es más mío que de ustedes, y no hay mejor regalo que celebrarlo a lado suyo. Los amo.

A mis hermanas Cristina y Margarita. Por estar conmigo en las buenas, pero sobre todo en las malas; gracias porque un día me alentaron a que comenzara este sueño, gracias porque siempre he recibido su apoyo incondicional y su motivación.

A toda mi familia. A mamá Cuquita, a todos mis tíos, mis primos y mis sobrinos. Gracias por siempre estar y por permanecer, y gracias por enseñarnos que lo más valioso que se puede tener en la vida es la familia.

Al Dr. Quintín Rascón Cruz y a la M. C. Tania Siqueiros Cendón. Mis padres académicos. No existen palabras suficientes para expresar mi eterna gratitud y mi cariño hacia ustedes. Gracias por que hace siete años decidieron escuchar y guiar la curiosidad de una niña que anhelaba incursionar en el mundo de la ciencia, y hoy, aun con las adversidades que la ciencia suele poner en nuestro camino, culminamos este gran proyecto juntos. Han sido muchos años de aprendizaje y de crecimiento. Por encima de todo, les agradezco a ustedes y a **Andrea** que me hayan dado una segunda familia en Chihuahua. Los quiero muchísimo.

Al Dr. Edward Alexander Espinoza Sánchez. Gracias por todo tu apoyo y entusiasmo a lo largo de mi formación, y por alentarme desde el inicio para lograr esta gran meta. Gracias por todos estos años de experiencias compartidas en nuestra vida personal y científica.

A Dr. Sigifredo Arévalo Gallegos. Gracias por todos sus valiosos consejos y su incondicional apoyo. Gracias por el tiempo y la disposición que siempre ha tenido en pro de mi aprendizaje.

A Dr. Renato J. Aguilera, director de *Cytometry, Screening and Imaging Core Facility* de la Universidad de Texas en El Paso (UTEP). Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y otorgarme todas las facilidades para la realización de mi estancia de investigación.

A Dr. Armando Varela Ramírez. Gracias por enseñarme con su ejemplo que no hay mayor pasión en el conocimiento, que el deseo por transmitirlo. Gracias por ser mi guía en UTEP, y por todo el tiempo que dedicó a mi aprendizaje y a la realización de este proyecto. Lo admiro y estimo muchísimo.

A Dra. Sugey Sinagawa García. Gracias por brindarme su amistad; gracias por su valiosa asesoría y su apoyo para la realización de mi tesis. Gracias por las amenas charlas y los consejos que siempre me ha dado.

Al **Dr. Igor C. Almeida,** director del *Biomolecule Analysis Core Facility* (UTEP), y a sus alumnos y colaboradores **Uriel Ortega, Cameron Elis e Igor Esteveao,** que también se convirtieron en mis amigos. Gracias por su invaluable apoyo para la realización de mi estancia y las charlas tan amenas que siempre tuvimos.

A mis amigos del laboratorio de Biotecnología I. **José Carlos Trejo, Nayely Robles, Isui García., Amado Sardiña, Liber Mesa, Sayuri Nakamura, Arlett Loya, Nadime García, Jacqueline Chacón, Iván Gómez, Raúl Omar Villa, Salvador Ruiz, Diana Tena, Yair Muñiz, Daniel Castro, Antonio Enríquez, Belen Mendoza, y Samuel Holguín.** Gracias por el gran equipo que formamos, y por siempre apoyarnos y darnos ánimos en todo momento, somos una gran familia académica.

A mis amigos del *Cytometry, Screening and Imaging Core Facility* en UTEP, **Yarely Schiaffino, Edgar Borrego, Paulina Villanueva, Denisse Gutierrez, Sujata Chalise, Lisett Contreras y Gladis Almodovar.** Gracias por que desde el primer día de mi llegada a UTEP me hicieron sentir como en casa, gracias por tan buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. Su amistad es lo más valioso que mi estancia me otorgó.

A amigos de generación. **Isui García, Loria Hajar, Dely Chávez, Luis Soto y Jair Carrasco.** Por haber empezado juntos este gran reto, y porque además de todas las experiencias profesionales, hemos logrado cultivar una bonita amistad.

A mis más queridas amigas, Sandra Chávez, Esmeralda Ángel e Hilda Rascón. Porque aun en la distancia, siempre están conmigo, gracias porque con cada palabra de aliento que me dieron, me motivaron a seguir en este largo camino. Las quiero tanto.

Al Ing. José Carlos Trejo Muñoz. Gracias por tu amistad y tu apoyo dentro y fuera del laboratorio. Gracias por la lealtad y la solidaridad que siempre has tenido conmigo. Es un honor tener tu amistad.

A Mayra Nayely Robles Leyva. Gracias por brindarme tu amistad y por hacerme reír tanto (y enojar a veces). Gracias por todas las charlas amenas, la risas, e incluso las lágrimas, que han fortalecido esta amistad.

A la familia Chaparro Gómez. Especialmente a Elsa, Pancho y a Arisbeth. Gracias por el apoyo que siempre han brindado a mi familia y gracias por ayudarme durante mi estancia en UTEP.

A Daisy Carrasco. Por toda la ayuda que me brindó en esta etapa del doctorado, y por la bonita amistad que surgió.

A Verónica Cano. Mi querida Vero, gracias por tanto cariño, y porque desde que la conozco, no ha hecho otra cosa si no apoyarme en todo momento de mi vida.

A todos mis maestros, que sembraron en mí la semilla del aprendizaje y la ciencia, gracias por compartir conmigo su conocimiento y ayudarme diariamente en el camino de mi formación científica.

Al **Dr. Ildebrando Pérez Reyes,** Secretario de Investigación y Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, y a todo su equipo de trabajo. Gracias por toda la asesoría y el apoyo brindado a lo largo de mi etapa como estudiante de posgrado.

A toda la administración del Dr. Pedro Martínez Ramos, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Gracias por impulsar diariamente a la superación personal y académica **¡Orgullo de ser UACH!**

La presente investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Biotecnología I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua bajo la dirección del Doctor Quintín Rascón Cruz y en el *Border Biomedical Research Center* de la Universidad de Texas en el Paso (EUA) bajo la asesoría externa de los Dr. Renato J. Aguilera y el Dr. Armando Varela Ramírez.

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) otorgó una beca con número de registro 296371 como apoyo económico para la realización de estudios de posgrado dentro del marco de la Convocatoria de Becas Nacionales 2016 Primer Periodo. Asimismo, otorgó una beca de movilidad en el extranjero para la realización de la estancia de investigación.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
I. RESUMEN.....	7
II. ABSTRACT.....	7
III. INTRODUCCIÓN.....	9
IV. MARCO TEÓRICO.....	11
4.1 CÁNCER: UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA.....	11
4.1.1 CÁNCER DE SENO	12
4.1.2 MUERTE CELULAR PROGRAMADA: APOPTOSIS.....	15
4.1.3 TIPOS DE TRATAMIENTOS ACTUALES CONTRA CÁNCER	18
4.2 LACTOFERRINA	19
4.2.1 ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN DE LACTOFERRINA	20
4.2.2 FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA LACTOFERRINA.....	22
4.2.3 ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE LA LACTOFERRINA.....	23
4.2.4 ANTIMICROBIANA DE LA LACTOFERRINA.....	26
4.2.5 ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE LACTOFERRINA.....	28
4.2.6 OTRAS FUNCIONES DE LA LACTOFERRINA	30
4.3 <i>Pichia pastoris</i> COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN	31
4.3.1 TIPOS DE CEPAS HUÉSPED.....	32
4.3.2 EXCRESIÓN DE PROTEÍNAS AL MEDIO DE CULTIVO	32
4.3.3 GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS	33
4.3.4 EXPRESIÓN DE LACTOFERRINA RECOMBINANTE EN <i>Pichia pastoris</i>	35
5 HIPÓTESIS.....	37
6 JUSTIFICACIÓN.....	37
7 OBJETIVOS.....	38
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS PARTICULARES	38
8 MATERIALES Y MÉTODOS.....	39

8.1	Materiales.....	39
	Cepas microbiológicas y condiciones de cultivo	39
	Líneas celulares y condiciones de cultivo	39
8.2	Métodos	40
8.2.1	Diseño <i>in silico</i> de la construcción genética pIGF5.....	40
8.2.2	Transformación genética de bacterias para la conservación y propagación de plásmidos (Hoisington, 1999)	41
8.2.3	Aislamiento de ADN plasmídico (Miniprep) (Bimboim y Doly, 1979).....	42
8.2.4	Preparación de ADN para la transformación genética de <i>Pichia pastoris</i> X3343	
8.2.5	Preparación de células electro competentes de <i>Pichia pastoris</i> para su transformación genética (Cregg y Russell, 1998)	43
8.2.6	Transformación genética de <i>Pichia pastoris</i> X33.....	44
8.2.7	Extracción de ADN genómico y amplificación de genes de interés	45
8.2.8	Inducción de la expresión de proteínas recombinantes de <i>Pichia pastoris</i> (Jiang <i>et al.</i> , 2008).	46
8.2.9	Obtención y purificación de proteínas totales	46
8.2.10	Análisis de proteínas en un gel de acrilamida (Laemmli, 1970)	47
8.2.11	Western blot de proteínas (Hoisington, 1999).....	48
8.2.12	Análisis de glicosilación de Lactoferrina humana recombinante	50
8.2.13	Ensayo de tinción nuclear diferencial.....	51
8.2.14	Determinación del Índice de Citotoxicidad Selectiva (Robles-Escajeda <i>et al.</i> , 2016).....	54
8.2.15	Análisis de la vía apoptosis/necrosis mediante ensayo de Anexina V/FITC (Robles-Escajeda <i>et al.</i> , 2016).....	54
8.2.16	Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	55
8.2.17	Preparación de microplacas para determinar el efecto de lactoferrina en la arquitectura del citoesqueleto	56
8.2.19	Análisis estadístico	57
8.2.18	Tinción y fijación del citoesqueleto.....	58
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
9.1	Diseño y construcción del vector de expresión pIGF5	59
9.2	Caracterización de la construcción genética pIGF5	60

9.3	Transformación genética de <i>Pichia pastoris</i> con la construcción genética pIGF5	61
9.4	Análisis de la expresión de Lactoferrina humana recombinante	62
9.5	Determinación del perfil de glicosilación de Lactoferrina humana recombinante	65
9.6	Efecto anticancerígeno de Lactoferrina humana recombinante	67
9.6.1	Efecto citotóxico de lactoferrina humana en células MDA-MB-231, MDA-MB-231-LM2-4 y MCF-10A.....	67
9.6.2	Papel de los glicanos en el efecto anticancerígeno de lactoferrina humana recombinante	74
9.6.3	Inducción de apoptosis en células MDA-MB-231 mediada por lactoferrina humana recombinante	75
9.6.4	Arresto del ciclo celular en células MDA-MB-231 mediado por lactoferrina humana recombinante	81
9.6.5	Desorganización del citoesqueleto en células MDA-MB-231 mediada por lactoferrina humana recombinante	85
V.	CONCLUSIONES	90
VI.	PERSPECTIVAS	92
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de las principales vías moleculares que conducen a la apoptosis.....	17
Figura 2 Estructura de la Lactoferrina	21
Figura 3 Influencia de la Lactoferrina en células del sistema inmune.	25
Figura 4. Representación esquemática de la unión de Lfcín a LPS	27
Figura 5. Actividad multifuncional de Lf.....	31
Figura 6. Representación esquemática del proceso de glicosilación en levaduras.....	35
Figura 7. Construcción genética pIGF5.....	59
Figura 8. Caracterización de la construcción genética pIGF5.	61
Figura 9. Caracterización del gen hLf en la levadura <i>P. pastoris</i>	62
Figura 10. Purificación de lactoferrina humana recombinante.....	63
Figura 11. Glicanos liberados de lactoferrina humana recombinante.....	65
Figura 12. Citotoxicidad de lactoferrina humana recombinante sobre células MDA-MB-231.	71
Figura 13. Citotoxicidad de lactoferrina humana recombinante sobre células MDA-MB-231-LM2-4.....	72
Figura 14. Citotoxicidad de lactoferrina humana recombinante sobre células MCF-10A.	73
Figura 15. Cambios morfológicos sugestivos de apoptosis en células MB-231 tratadas con rhLf	77
Figura 16. Externalización de fosfatidilserina en las células MDA-MB-231 tratadas con rhLf	80
Figura 17. Perfil del ciclo celular de células MDA-MB-231 tratadas con rhLf.	84
Figura 18. Estructura del citoesqueleto en células MDA-MB-231 tratadas con rhLf.....	88
Figura 19. Estructura del citoesqueleto en células Hs27 tratadas con rhLf Hs27,.....	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración citotóxica de rhLf necesaria para matar al 50% de la población celular (CC ₅₀) para rhLf en un panel de líneas celulares derivadas de cáncer de seno humano y índice de citotoxicidad selectiva (SCI).....	63
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

° C	Grados Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
bLf	Lactoferrina bovina
h	Horas
hLf	Lactoferrina humana
kDa	Kilo Dalton
Lf	Lactoferrina
Lfcin	Lactoferricina
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minute
mL	Mililitro
mM	Millimolar
<i>N</i> -glicosilación	Glicosilación unida a asparagina
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rhLf	Lactoferrina humana recombinante
rpm	Revoluciones por minuto
µg	Microgramo
µL	Microlitro

I. RESUMEN

La lactoferrina es una glicoproteína de mamíferos no hemática de unión a hierro perteneciente a la familia de las transferrinas. La producción más alta se encuentra en calostro y leche, encontrándose también en los diferentes fluidos corporales y dentro de los neutrófilos. Debido a su alta distribución a lo largo del organismo, desempeña múltiples roles fisiológicos, entre los cuales destacan su actividad anticancerígena y su actividad inmunomoduladora. En el presente trabajo, se diseñó un gen sintético a partir de la secuencia que codifica para lactoferrina humana nativa. El gen sintético fue integrado en el sitio AOX1 del genoma de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* X33; a partir de la integración, bajo el control del promotor inducible AOX1 y contiene una secuencia líder para la exportación de proteínas a la vía secretora, se logró expresar lactoferrina humana recombinante a través de la vía secretoria de *Pichia pastoris*. La lactoferrina humana recombinante expresada fue purificada y caracterizada de acuerdo con sus perfiles de glicosilación. Se analizó su actividad anticancerígena sobre células de cáncer de seno (MDA-MB-231) y sobre células metastásicas de pulmón derivadas de cáncer de seno (MDA-MB-231-LM2-4). A una concentración de 50 µg/mL, la lactoferrina humana recombinante demostró tener actividad citotóxica dependiente de la dosis contra ambas líneas celulares. Cuando la lactoferrina humana fue probada en células no cancerígenas (MCF-10A), ésta no mostró tener efecto citotóxico. Los datos obtenidos en el presente trabajo mostraron que el mecanismo de acción anticancerígeno de lactoferrina humana recombinante fue ejercido a través de la inducción de una vía apoptótica, y parte de la citotoxicidad que presentó esta proteína fue obtenida gracias a su perfil de glicosilación.

II. ABSTRACT

Lactoferrin is a non-hematic iron binding glycoprotein from mammals belonging to the transferrin's family. Its highest production is given in colostrum and milk and found it in different body fluids and neutrophils. Due to its high distribution throughout the body, it plays multiple physiological roles, among which its anti-cancer and immunomodulatory activity, between others. In the present work, a synthetic gene was designed from the original sequence that encodes for native human lactoferrin. This synthetic gene was integrated into the AOX1 site of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*; after integration and under the control of the AOX1 inducible promoter, recombinant human lactoferrin was achieved through the secretory pathway of *Pichia pastoris*. The expressed recombinant human lactoferrin was purified and characterized according to its glycosylation profiles. From these results, its anticancer activity was tested on breast cancer cells (MDA-MB-231) and in metastatic lung cells derived from breast cancer (MDA-MB-231-LM2-4). Recombinant human lactoferrin demonstrated to have dose-dependent cytotoxic activity against both cell lines. When recombinant human lactoferrin was tested against non-cancer cells (MCF-10A), there wasn't cytotoxicity effect. The data obtained in the present work showed that mechanism of anticancer activity of recombinant human lactoferrin was carried out through the induction of an apoptotic pathway, and part of the cytotoxicity that this protein presented was obtained because of its glycosylation profile.

III. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el cáncer de seno ocupa uno de los primeros lugares de mortalidad y morbilidad a nivel mundial; tan sólo en México, es la primera causa de muerte en mujeres a partir de los 25 años, y el estado de Chihuahua ocupa el cuarto lugar a nivel nacional en mortalidad a causa de esta enfermedad. Lo anterior representa un problema significativo de salud pública, además, los tratamientos oncológicos que actualmente son utilizados pueden repercutir de manera grave en la salud física y psicológica de los pacientes, por lo que es importante la búsqueda de nuevas terapias anticancerígenas que favorezcan a mantener las mejores condiciones de vida del paciente y con la posibilidad de una curación definitiva. En ese sentido, existen diversas proteínas de origen natural que han sido reportadas con diversas funcionalidades, entre ellas, su actividad anticancerígena. La lactoferrina, una glicoproteína ubicua de los mamíferos, presente en las diversas secreciones corporales, posee propiedades fisiológicas como anticancerígenas, antioxidantes, inmunomoduladoras, antimicrobianas, entre otras. Gracias a su actividad multifuncional, el estudio del mecanismo de acción de dicha proteína ha ganado interés en ciencia y en la industria farmacéutica y alimentaria. No obstante, debido a su baja disponibilidad a partir de fuentes naturales, en los últimos años la lactoferrina ha sido producida mediante técnicas de ingeniería genética, lo cual ha permitido la obtención de lactoferrina en grandes cantidades y con un porcentaje de similitud alto respecto a su contraparte nativa. En el presente trabajo, se logró la expresión de lactoferrina humana recombinante en la levadura *Pichia pastoris* X33; dicha proteína tuvo efecto anticancerígeno dependiente de su perfil de glicosilación, sobre células de cáncer de seno triple negativo y una variante metastásica de pulmón. La lactoferrina

fue administrada a la línea celular de cáncer de seno triple negativo MDA-MB-231 donde indujo un 33% de muerte celular a las 24 h; a la línea celular metastásica de pulmón derivada de cáncer de seno triple negativo MDA-MB-231-LM2-4 donde indujo un 25% de muerte celular a las 24 h; y a la línea celular epitelial no cancerígena (MCF-10A) donde no hubo inducción de muerte celular. La viabilidad celular de la línea celular no cancerígena tratada con lactoferrina fue de 98%, la misma viabilidad alcanzada por células no cancerígenas que no recibieron tratamiento con lactoferrina, lo cual indica que la lactoferrina expresada en este trabajo no tiene un efecto citotóxico sobre la línea celular no cancerígena. Estos hallazgos tienen un significativo impacto para el estudio y la generación de nuevas terapias contra el cáncer a base de proteínas recombinantes, que de manera natural se encuentran en el organismo.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 CÁNCER: UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que el cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo junto a la enfermedad cardíaca; es una de las principales causa de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados y subdesarrollados (Contreras *et al.*, 2018). En 2012, se estimó que a nivel mundial, 975,396 personas tenían algún tipo de cáncer, siendo la incidencia más alta el cáncer de seno, con aproximadamente 191,105 casos presentados en mujeres entre 20 y 39 años, de los cuales, un total de 48,774 murieron a causa de esta enfermedad (Fidler *et al.*, 2017). En Estados Unidos de América, se estimó que en 2016 hubo aproximadamente 1.7 millones de nuevos casos de cáncer, de los cuáles, 595,690 condujeron a la muerte (Contreras *et al.*, 2018). Al 2017, de acuerdo con cifras del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y el Instituto Nacional de Estadística y Geográfica (INEGI), en México, el cáncer de seno es la primera causa de muerte en mujeres mayores de 25 años; en el estado de Chihuahua, se tienen registradas 25.91 defunciones por cada 100 mil mujeres, siendo el estado con la tasa de mortalidad más alta en el país por esta causa, lo cual representa un problema importante de salud pública a nivel tanto estatal, federal como internacional. Desafortunadamente, se espera que estas cifras aumenten (Pilleron *et al.*, 2019).

4.1.1 CÁNCER DE SENO

El cáncer de seno es la neoplasia epitelial maligna que más afecta a las mujeres; y se asocia con las tasas más altas de incidencia y mortalidad en los países occidentales (Berardi *et al.*, 2015). Éste está caracterizado por abarcar un diverso grupo de tumores malignos con distintas características como su evolución clínica, genotipo, fenotipo, respuesta a las posibles formas de terapia y pronóstico (Robles-Escajeda *et al.*, 2016).

Los diferentes tipos de cáncer de seno se clasifican en tres grupos principales basados en marcadores celulares que reflejan las terapias dirigidas disponibles: 1) receptor de estrógeno (ER) o receptor de progesterona (PR) positivo; 2) receptor de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) positivo con o sin ER y PR positivo (Kumar y Aggarwal, 2016) y, 3) células que carecen de expresión de ER, PR y HER2, este último también llamado como cáncer de seno triple negativo (You *et al.*, 2015). que se encuentra entre los tumores más agresivos y más resistentes a la terapia (Badve *et al.*, 2011).

Receptor de estrógeno. Los receptores de estrógeno son factores de transcripción que están involucrados en diferentes procesos fisiológicos. La señalización anormal de estos puede conducir al desarrollo de diferentes enfermedades como cáncer, inflamación, y trastornos metabólicos (Jia *et al.*, 2015). Existen dos tipos de receptores ER, ER α y ER β ; el ER α está expresado en menos del 10% de epitelio glandular mamario sano, mientras que su expresión es de aproximadamente entre 50-80% en cánceres de seno, ya que este promueve la

generación de nuevos tumores y la progresión del cáncer (Huang *et al.*, 2014). Aproximadamente el 80% de las células epiteliales de mama sanas expresan ER β y su expresión puede disminuir e incluso perderse durante el cáncer de seno (Jia *et al.*, 2015); en ese sentido, la pérdida de la expresión del receptor ER β está asociada con un mal pronóstico para el paciente (Omoto *et al.*, 2001). Los ER regulan la transcripción a través del reclutamiento de co-reguladores de transcripción que desempeñan un papel central en la activación o represión de genes (Nassa *et al.*, 2011) que controlan la progresión del ciclo celular y la apoptosis (Chang *et al.*, 2006)

Receptor de progesterona. Los receptores de progesterona, al igual que la progesterona, son esenciales para el desarrollo y la regulación de los tejidos sensibles a las hormonas, incluidos los senos y el tracto reproductivo (Diep *et al.*, 2015). Estos receptores se expresan tanto en el epitelio como en compartimentos estromales del seno y se limitan al 10-15% de las células de la luz mamaria (Briskin, 2013). El receptor de progesterona es regulado por ER que se expresa en más de dos tercios de los cánceres de seno ER positivos (Lim *et al.*, 2016). Estos receptores (PR) pueden suprimir la transcripción mediada por ER en los cánceres de seno (Finlay-Schultz *et al.*, 2018).

Receptor de factor de crecimiento epidérmico humano. La familia de receptores de factor de crecimiento epidérmico humana tiene un papel fundamental en la patogénesis de diversos tipos de cánceres debido a que regulan el crecimiento celular, supervivencia y diferenciación a través de múltiples vías de traducción de señales (Iqbal y Iqbal, 2014). Los receptores HER existen como monómeros en la superficie celular. Tras la unión de los ligandos a sus dominios extracelulares, los

receptores HER se someten a un proceso de dimerización y fosforilación de sus dominios intracelulares (Citri y Yarden, 2006). HER2 no tiene un ligando de activación directa conocido y puede estar constitutivamente en un estado activado o puede activarse en la heterodimerización con otros miembros de la familia como HER1 y HER3. La heterodimerización resulta en la autofosforilación de residuos de tirosina dentro del dominio citoplásmico de los receptores e inicia una variedad de vías de señalización, principalmente la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa (PI3K), y proteína cinasa C (PKC) que resulta en la proliferación celular, supervivencia, diferenciación, angiogénesis e invasión (Fornaro *et al.*, 2011; Moasser, 2007). HER2 induce la carcinogénesis y se encuentra aproximadamente en un 15-30% de los cánceres de seno (Iqbal y Iqbal, 2014).

Los factores etiológicos genéticos que promueven la iniciación y el desarrollo de este tipo de cáncer son aún poco conocidos (Kumar y Aggarwal, 2016); no obstante, se sabe que los pacientes con antecedentes heredo patológicos de cáncer de seno y ovario, tienen un riesgo del 50 al 85% de desarrollar cáncer de seno durante su vida (Evans y Howell, 2012). En ese sentido, las mutaciones de la línea germinal en el gen supresor de tumores BRCA1 (gen de alta susceptibilidad al cáncer de seno) se han asociado con cáncer de seno triple negativo (Lakhani *et al.*, 2002); de un 60 a un 80% de los cánceres de seno portadores de una mutación en BRCA1, muestran un fenotipo de cáncer de seno triple negativo (Atchley *et al.*, 2008). Los genes que están alterados en una neoplasia afectan a una importante vía biológica que normalmente contribuye en la regulación del crecimiento celular y la homeostasis tisular: la apoptosis (Golias *et al.*, 2004). Debido a que el cáncer de

seno de es una enfermedad heterogénea y las terapias específicas no se encuentran completamente disponibles (Denkert *et al.*, 2017), el conocimiento de los mecanismos y la regulación de esta vía de muerte celular ofrece un panorama más amplio en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas (Mitchell *et al.*, 2017).

4.1.2 MUERTE CELULAR PROGRAMADA: APOPTOSIS

La muerte celular programada se define como la muerte celular regulada mediante un programa intracelular (Su *et al.*, 2015). Un tipo de muerte celular programada es la apoptosis, la cual describe los mecanismos mediante los cuales una célula persigue activamente su camino hacia la muerte al recibir ciertos estímulos (Wong, 2011). La apoptosis es caracterizada por la presencia de “burbujas” en la membrana celular (*membrane blebbing*), fragmentación nuclear, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN (Burgess, 2013; Nagasaka *et al.*, 2010).

La apoptosis se desencadena por activación cronológica de la familia de las caspasas a través de dos vías distintas (Figura 1) : la vía intrínseca o vía mitocondrial, activada por estímulos intracelulares como el daño de ADN, la privación del factor de crecimiento y el estrés oxidativo (Lopez y Tait, 2015); y la vía extrínseca, o vía de muerte por receptores, la cual implica interacciones mediadas por receptores transmembrana. Éstos incluyen receptores de muerte que son miembros de la superfamilia de genes del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) (Locksley *et al.*, 2001).

Vía intrínseca de apoptosis. La vía intrínseca es controlada por la familia de proteínas Bcl-2 (Kumar *et al.*, 2014). En primera instancia, existen numerosos

estímulos que pueden desencadenar un aumento en la permeabilidad mitocondrial, lo cual genera que se liberen factores apoptogénicos a través de la membrana externa. Esta disfuncionalidad mitocondrial altera la membrana plasmática y activa a las caspasas, las cuales se filtran en el citosol dando lugar a la activación de la apoptosis (Baig *et al.*, 2017). Hasta este punto, un citocromo *c* es liberado y se ensambla con un factor de activación de apoptosis, dando lugar a un complejo llamado apoptosoma (Hassan *et al.*, 2014); tras la formación del complejo de apoptosoma, el componente clave del apoptosoma llamado factor de activación de la proteasa apoptótica, se une a la procaspasa 9; una vez que se forma el apoptosoma, se activa la cascada de las caspasas efectoras dando lugar a la apoptosis (Su *et al.*, 2015).

Vía extrínseca de apoptosis. La vía extrínseca de la apoptosis es iniciada a través de receptores de muerte; al menos seis receptores de muerte han sido identificado por ser capaces de regular la apoptosis: TNFR1 (TNFR, Receptor de factor de necrosis tumoral) (TNFRSF1A [TNFRSF, TNFR, Nomenclatura: miembro de la superfamilia según corresponda cada número]), Fas/Apo1/CD95, (TNFRSF6), DR3 (DR, Receptor de muerte) (TNFRSF25), DR4 (TNFRSF10A), DR5 (TNFRSF10B), y DR6 (TNFRSF21) (Nair *et al.*, 2014; Wilson *et al.*, 2012). Una vez que un ligando pro-apoptótico se une a receptores DR, generalmente DR4 o DL5, se forma un complejo de señalización de inducción de muerte (DISC) (Ashkenazi, 2008) y recluta al adaptador de dominio de muerte asociado a Fas (FADD) y a las procaspasas 8 y 9 para inducir directamente la muerte celular, o bien, para escindir a BCL2 y activar la vía intrínseca de apoptosis (Su *et al.*, 2015).

A pesar de que el ciclo celular en los mamíferos es un proceso altamente organizado y regulado que garantiza la duplicación del material genético y la división celular (Otto y Sicinski, 2017), en el cáncer, el balance entre la división celular y la muerte celular se encuentra desequilibrado; una proliferación descontrolada, es un sello distintivo de las células cancerígenas (Golias *et al.*, 2004). Este desbalance puede ocurrir en cualquier punto de regulación de la apoptosis (Wong, 2011); en ese sentido, la investigación sobre posibles tratamientos anticancerígenos ha sido guiada en los últimos años hacia la regulación apoptótica de células cancerígenas, por lo cual, la participación de la apoptosis en la patogénesis del cáncer puede ser fundamental para encontrar nuevos tratamientos (Baritaki *et al.*, 2011).

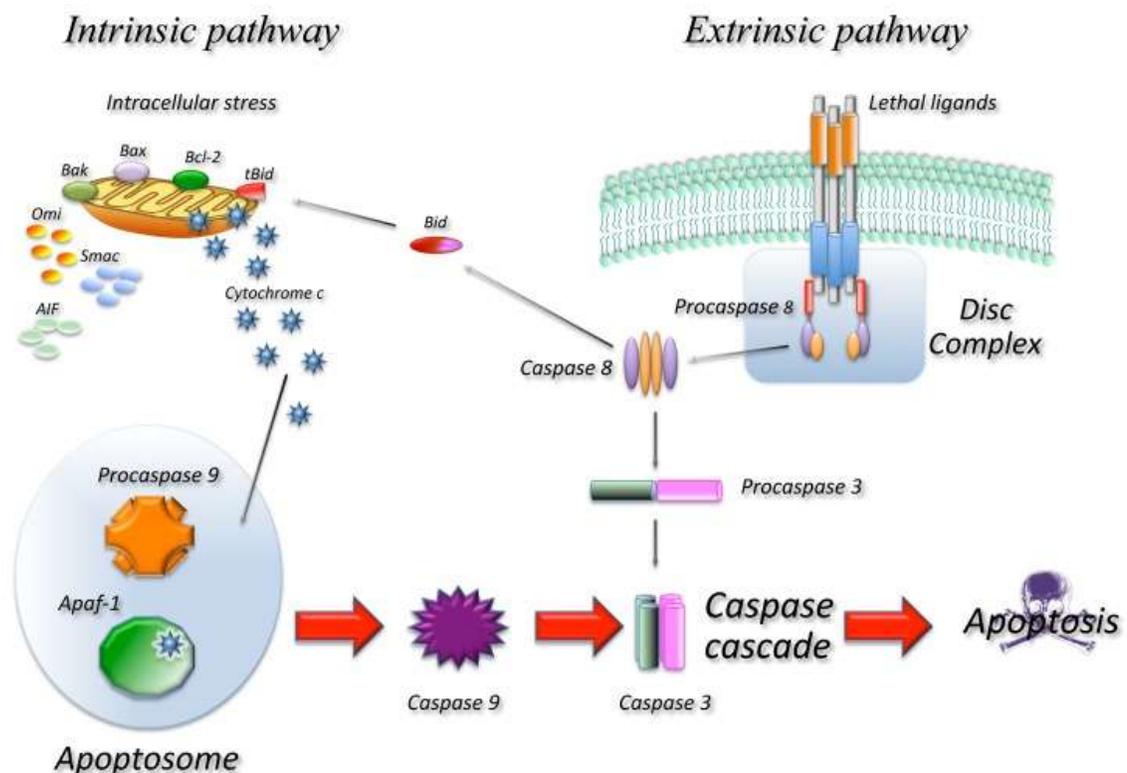


Figura 1. Representación esquemática de las principales vías moleculares que conducen a la apoptosis. En la vía extrínseca, tras la unión del ligando a receptores específicos, se forma el complejo DISC y se activa la

caspasa 8. En la vía intrínseca, la liberación de citocromo c de las mitocondrias da como resultado la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa 9. La caspasa 8 y 9 luego activan las caspasas corriente abajo, como la caspasa 3, que resulta en la muerte celular (Favaloro *et al.*, 2012).

4.1.3 TIPOS DE TRATAMIENTOS ACTUALES CONTRA CÁNCER

A la fecha, los tratamientos oncológicos pueden incluir radiación, quimioterapia y/o cirugías, lo que implica daños fisiológicos y psicológicos graves para los pacientes que se someten a dichos tratamientos; además, en algunos casos, el tratamiento con quimioterapia tiene efectos secundarios sobre la fertilidad y, en el caso de las mujeres, la menopausia prematura, que a su vez conduce a un mayor riesgo de osteoporosis. Otros efectos secundarios que pueden ocurrir con los tratamientos más comunes implican un riesgo de daño cardíaco (Miller *et al.*, 2016).

Debido a lo anterior, la búsqueda de nuevos tratamientos contra el cáncer tiene como objetivo disminuir el daño colateral en pacientes oncológicos sin disminuir la eficiencia en el combate a la enfermedad, por lo que dicha búsqueda debería ser fundamentada principalmente en terapias más naturales. En ese sentido, el ser humano, tiene la capacidad natural de producir varias proteínas que pueden modular algunas funciones del sistema inmunológico, incluidos procesos apoptóticos hacia ciertos tipos de células malignas que podrían favorecer en la creación de una nueva terapia anticáncer. Un ejemplo ampliamente estudiado de proteínas producidas en el organismo con funciones inmunológicas es la lactoferrina (Lf) humana (Siqueiros-Cendón *et al.*, 2014).

4.2 LACTOFERRINA

La lactoferrina (Lf), descrita en los primeros reportes como “fracción roja de la leche”, es una glicoproteína no hemática de unión a hierro secretada principalmente por células epiteliales de la glándula mamaria (Groves, 1960; Nuijens *et al.*, 1996). De acuerdo a su estructura tridimensional conservada y su propiedad de quelar iones hierro, la Lf pertenece a la familia de las transferrinas junto con la ovotransferrina y la melanotransferrina (Baker *et al.*, 2002). Los miembros de la familia de las transferrinas ejercen sus funciones biológicas mediante la regulación de los niveles de hierro libre en fluidos corporales de los mamíferos, por ejemplo, la transferrina está involucrada en el transporte de hierro en plasma y su absorción a través de la mucosa intestinal. Además, actúan como agentes bacteriostáticos en función de su capacidad para privar de hierro de sideróforos a los organismos que los producen (Bullen *et al.*, 1972). Asimismo, la Lf es capaz de unirse a varios tipos de células de mamíferos incluyendo macrófagos, células asesinas naturales, plaquetas, enterocitos, hepatocitos, células dendríticas, fibroblastos y osteoblastos, y regular su migración, crecimiento y diferenciación; por ser fuertemente catiónica, se puede unir además a

moléculas de ADN, heparina, glicosaminoglicanos y endotoxinas (Legrand y Mazurier, 2010; Siqueiros-Cendón *et al.*, 2014). La multifuncionalidad de esta proteína, puede ser explicada por la diversidad de células y moléculas diana en donde tiene su efecto; los datos estructurales y funcionales de la Lf sugieren que su estructura característica confiere sus diversas funciones (Takayama, 2011).

4.2.1 ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN DE LACTOFERRINA

La lactoferrina es una glicoproteína ubicua de los mamíferos que tiene un peso molecular de aproximadamente 80 kDa. La cadena polipeptídica simple incluye aproximadamente alrededor de 700 aminoácidos (dependiendo de la especie; en ese sentido, la similitud que se presenta entre las especies es alta) (Adlerova *et al.*, 2008), plegados en dos lóbulos globulares carboxilo (C) y amino (N) terminales, que son regiones conectadas a través de una α -hélice y están conformadas por dos dominios conocidos como C₁, C₂, N₁ y N₂ que crean una estructura β -plegada (Legrand *et al.*, 2008). La cadena polipeptídica incluye los aminoácidos 1-332, que comprende el lóbulo N-terminal, y los aminoácidos 344-703 que comprende el lóbulo C-terminal (González-Chávez *et al.*, 2009) (Figura 2).

Lf posee tres sitios potenciales de glicosilación en su especie humana (hLf) (Asn138, Asn479 y Asn624) (Spik *et al.*, 1994) y cinco sitios potenciales en lactoferrina bovina (bLf) (Asn233, Asn281, Asn368, Asn476 y Asn545) (Wei *et al.*, 2000). Estos sitios están expuestos en su mayoría en la superficie externa de la molécula y pueden participar en el reconocimiento de ciertos receptores (Latorre *et al.*, 2010).

Lf presenta alta afinidad por el hierro; cada lóbulo puede unirse a un ion férrico; además, puede unir los iones Cu^{+2} , Zn^{+2} y Mn^{+2} (Adlerova *et al.*, 2008; García-Montoya *et al.*, 2012). Los niveles más altos de producción de lactoferrina se atribuyen a la leche y el calostro (1 g/L y 7 g/L, respectivamente), este último tiene un impacto significativo en la proporción de componentes esenciales en el sistema inmunológico de los bebés (Moreno-Expósito, *et al.*, 2018); además, es secretado por varios fluidos corporales como fluidos seminales y vaginales, lágrimas y saliva; otra vía de producción de Lf son los neutrófilos, que en condiciones normales producen alrededor de 0.4 mg/L en plasma humano, aumentando hasta 5000 veces estos niveles de producción en un proceso de infección (Embleton *et al.*, 2013).

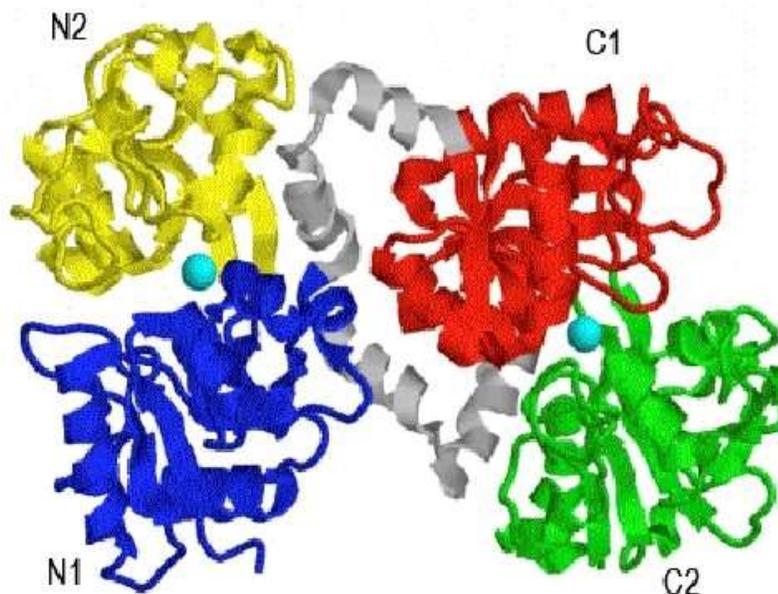


Figura 2 Estructura de la Lactoferrina. Se muestran los dos lóbulos amino y carboxilo terminal (N y C) con sus respectivos dominios N1, N2, C1 y C2. Su estructura β -plegada le permite crear estos dominios en cada lóbulo N y C. Cada lóbulo se encuentra conectado por una región bisagra que contiene una α -hélice entre los aminoácidos 33 y 343, lo cual le confiere una flexibilidad adicional a la molécula. Su capacidad para fijar hierro reside en los dominios N2, C2, donde el ion Hierro (Fe^{+3}) se une sinérgicamente con el ion carbonato (CO_3^{2-}) (González-Chávez *et al.*, 2009)

Los mamíferos producen Lf; su producción se atribuye a las células de la mucosa epitelial dentro de la mayoría de fluidos exocrinos, incluyendo lágrimas, saliva, fluidos vaginales y seminales, secreciones nasales y bronquiales, bilis y jugos gástricos (García-Montoya *et al.*, 2012). Su más alta concentración se encuentra en leche y calostro; el humano produce aproximadamente 2 g/L y 7 g/L en leche y calostro, respectivamente, mientras que en bovinos su concentración en leche y calostro es de 0.2 g/L y 1.5 g/L, respectivamente (Legrand *et al.*, 2008). Una cantidad considerable de Lf es encontrada en los gránulos secundarios de los neutrófilos ($15 \mu\text{g}/10^6$ neutrófilos) (Latorre *et al.*, 2010), y es liberada en el plasma durante un proceso inflamatorio o infeccioso; en condiciones normales, su concentración en el plasma es de 0.4-2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e incrementa hasta 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en infecciones y trastornos inmunológicos (Actor *et al.*, 2009). La concentración de Lf en el plasma no está relacionada con el número de neutrófilos, sino que depende del grado de degranulación de éstos. Asimismo, los niveles de Lf en plasma pueden ser alterados durante la gestación (Adlerova *et al.*, 2008; Takayama, 2011).

La Lf presenta una alta similitud entre especies; entre ellas, la Lf humana (hLf) y la bovina (bLf) presentan el más alto grado de similitud en cuanto a estructura y función; el 78% de la secuencia de Lf humana es idéntica a la Lf bovina (Wally y Buchanan, 2007).

4.2.2 FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA LACTOFERRINA

Debido a su alta afinidad por el hierro, la Lf contribuye a mantener los niveles de éste en los fluidos corporales, con propósitos tanto antimicrobianos como de supresión de la formación de radicales libres, que conlleva a evitar el estrés oxidativo

(Baker *et al.*, 2002); por lo tanto, la Lf está envuelta en el mantenimiento de la homeostasis, actúa como agente antioxidante, anticancerígeno (González-Chávez *et al.*, 2009), es un potente agente antimicrobiano (Jenssen y Hancock, 2009) y está fuertemente implicada en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, ya que tiene una alta afinidad por receptores de células del sistema inmunológico (Siqueiros-Cendón *et al.*, 2014).

4.2.3 ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE LA LACTOFERRINA

Desde el descubrimiento (Sorensen y Sorensen, 1940), y su posterior caracterización (Groves, 1960), el papel de Lf en el sistema inmune se encuentra bien documentado (Figura 3). El papel que desempeña esta molécula durante la respuesta inmune ha sido ampliamente estudiado y es una de las principales características que la han hecho extremadamente atractiva tanto para la industria farmacéutica como para la investigación. Lf está muy involucrada en la respuesta de los procesos inmunológicos frente patógenos, así como a los trastornos inflamatorios, que incluyen alergia, artritis y cáncer (Legrand *et al.*, 2008). En respuesta a un proceso inflamatorio y/o neurodegenerativo, los niveles de secreción de lactoferrina aumentan significativamente; la lactoferrina puede mediar en las acciones de las respuestas inmunes innatas y adaptativas (Siqueiros-Cendón *et al.*, 2014). Aunque los mecanismos moleculares de la acción inmunomoduladora no se han entendido completamente, se sabe que Lf puede regular la producción de mediadores inflamatorios tanto de manera positiva como de manera negativa (Giansanti *et al.*, 2016). Varios autores (Barboza *et al.*, 2012; Figueroa-Lozano *et al.*, 2018) han sugerido que una parte fundamental del mecanismo de acción inmunomoduladora de la Lf está relacionada con la glicosilación de la molécula. El grado de glicosilación de

Lf podría afectar su capacidad para modular la respuesta inmune (Choi *et al.*, 2008; Zimecki *et al.*, 2014). Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los niveles de expresión de citocinas inflamatorias como IL-4 e IL-10, citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12, así como las quimiocinas como IL -8, se alteran en presencia de Lf, que afecta los procesos naturales de crecimiento, diferenciación y activación de las células inmunes (Legrand, 2016). El interesante efecto inmunomodulador de Lf es el hecho de que no solo se limita a la alteración en los niveles de expresión de las células, sino que además, su capacidad para quelar iones de hierro, permite que Lf actúe como un antioxidante natural (Sharma *et al.*, 2015); además, Lf previene la peroxidación causada por los radicales libres (Yuksel *et al.*, 2015).

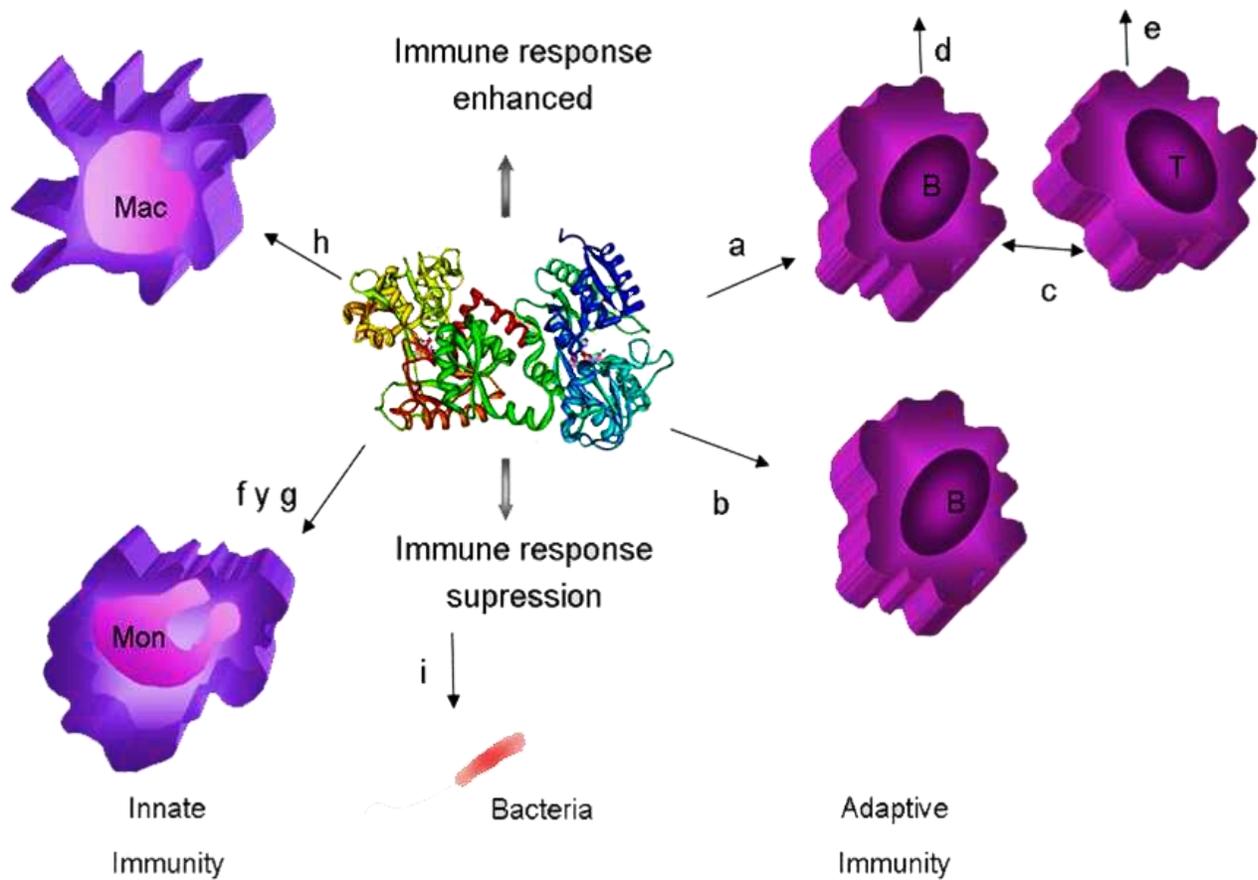


Figura 3 Influencia de la Lactoferrina en células del sistema inmune. a) Promueve la maduración de linfocitos B y T; b) regula negativamente a los linfocitos B a través de la unión a LPS; c) permite la interacción entre linfocitos B y T; d) induce la segregación de IgA e IgG; e) promueve la proliferación de linfocitos T; f) favorece la disminución de la secreción de IL-5 e IL-10; g) regula de manera negativa la activación del $TNF\alpha$ de los monocitos; h) potencia la actividad fagocítica de los macrófagos; i) previene la interacción entre LPS y CD14. Abreviaciones: B, linfocitos B; T, linfocitos T; Mac, macrófagos; Mon, monocitos (Siqueiros-Cendón *et al.*, 2014).

4.2.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA LACTOFERRINA

Lf es capaz de ejercer actividad antimicrobiana contra un amplio espectro de patógenos, incluidas bacterias, hongos, parásitos y virus (González-Chávez *et al.*, 2009). Su capacidad para secuestrar iones de hierro genera una escasez de nutrientes esenciales para el crecimiento y la multiplicación de organismos sideróforos (Kanwar *et al.*, 2015). Además, Lf tiene la capacidad de unirse a la superficie bacteriana causando la liberación de LPS (lipopolisacárido) de la membrana externa, causando daño celular y muerte (Jenssen y Hancock, 2009). Por otro lado, cuando Lf se somete a digestión proteolítica con pepsina, es liberado uno de sus péptidos bioactivos, la lactoferricina (Lfcin), localizada en la región N-terminal, la cual se libera de la molécula completa (Figura 4) (Bellamy *et al.*, 1992) y es un péptido bioactivo que ejerce una actividad antimicrobiana mayor que Lf (Arias *et al.*, 2014). En los últimos cinco años, varios autores han informado sobre los efectos antimicrobianos de la Lf, principalmente en bacterias; en estudios anteriores, se ha reportado la actividad antibacteriana de rbLf (Lactoferrina bovina recombinante) expresada en *Pichia pastoris* contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, donde la mayor actividad antibacteriana se logró utilizando Lfcin (Iglesias-Figueroa *et al.*, 2016). Además, Lf ha sido probado contra *Streptococcus mutans* (Velusamy *et al.*, 2016), *Salmonella enterica* sv *Typhimurium* (Wu *et al.*, 2016) *Helicobacter pylori* (Yuan, *et al.*, 2015), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Velusamy *et al.*, 2014) y *Mycobacterium tuberculosis* (Welsh *et al.*, 2011); sin embargo, el efecto antimicrobiano potencial de Lf y sus péptidos bioactivos se ha documentado durante más de dos décadas (Jones *et al.*, 1994). Finalmente, el uso de Lf y Lfcin contra microorganismos no se ha limitado a patógenos humanos. En 2012, Fukuta y

colaboradores (Fukuta *et al.*, 2012) probaron el efecto de lactoferrina expresada en plantas de tabaco transgénicas. Las plantas fueron sometidas a infección con *Pseudomonas. syringae* pv. *tabaci* y *Botrytis cinerea*; los resultados de este experimento mostraron que las plantas transgénicas sobrevivieron 30 días después de la infección, en contraste con las plantas silvestres que murieron como consecuencia del daño del patógeno. Por otro lado, la Lf bovina puede eliminar una infección por *E. coli* en el ganado (Kieckens *et al.*, 2018). Estos hallazgos proporcionan un campo de aplicación diferente para el tratamiento con lactoferrina, que puede ampliarse para usarse en la agricultura como mejorador de cultivos y en el ganado para prevenir enfermedades.

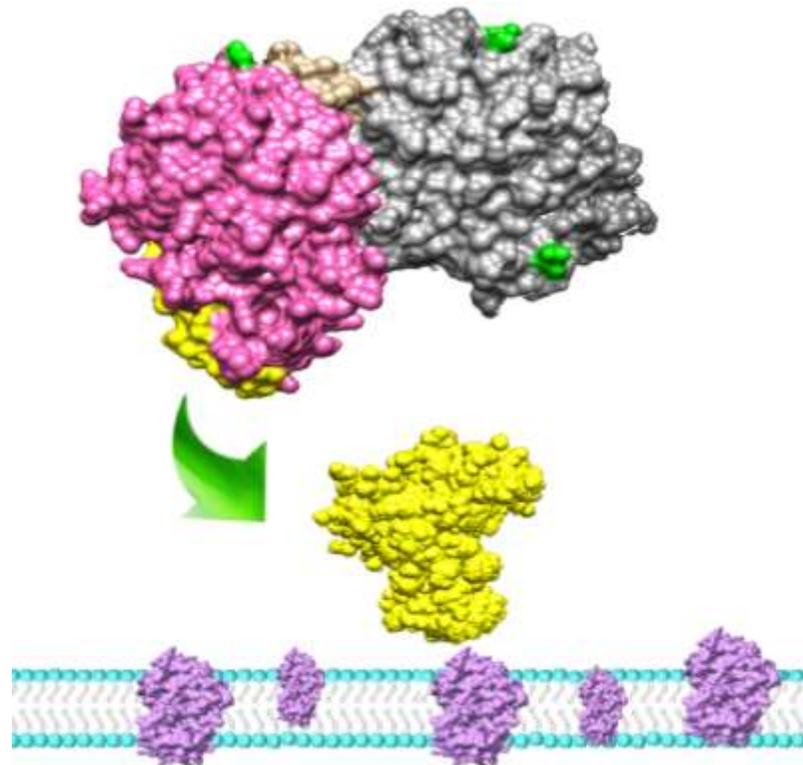


Figura 4. Representación esquemática de la unión de Lfcin a LPS. Cuando se libera Lfcin (amarillo) de Lf, ésta puede unirse a LPS bacteriano (púrpura), activando la respuesta inmune, así como la disrupción de la membrana externa (Modelado con software Chimera [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>]).

4.2.5 ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE LACTOFERRINA

Lf ha sido ampliamente estudiada y su capacidad anticancerígena está bien documentada (Moreno-Expósito *et al.*, 2018). La actividad inmunomoduladora de la lactoferrina podría ser la clave para conocer el mecanismo de acción en la actividad anticancerígena que presenta la molécula. Se ha demostrado que la lactoferrina ejerce actividad citotóxica en diversas células cancerosas (Zhang *et al.*, 2014a), además, Lf y sus péptidos biológicos también pueden inducir el programa de muerte celular en células cancerosas. Asimismo, tiene un papel importante en la detención del ciclo celular; se ha demostrado que puede comprometer diversos niveles del ciclo celular, según el tipo de célula cancerosa (de Mejia y Dia, 2010). Por otro lado, el metabolismo del hierro está fuertemente involucrado en los requerimientos metabólicos de algunas células cancerosas, e incluso puede llevar a la metástasis de las células tumorales (Kazan *et al.*, 2017), por lo que la lactoferrina es una molécula capaz de quelar iones de hierro, también tiene un mecanismo de acción contra el cáncer basado en su capacidad para equilibrar este ion en el organismo (Rosa *et al.*, 2017).

Por otro lado, el suministro de estrógenos representa un factor crucial en el desarrollo de la mayoría de los cánceres de mama; de la misma manera, la homeostasis del hierro se correlaciona con la producción de estrógenos, un nivel reducido de hierro promueve la angiogénesis, mientras que los niveles prominentes de hierro contribuyen al aumento del estrés oxidativo (Zhang y Zhang, 2015). Debido a que la expresión del gen de Lf está modulada por los receptores de esteroides

tiroideos, este gen es sensible a las hormonas, por lo que lactoferrina puede estar involucrada en cánceres dependientes de hormonas, como el cáncer de mama, donde la expresión de estas hormonas parece estar inhibida progresivamente (Gopal y Das, 2016). En este sentido, Lf de diversas especies ha demostrado ser un potente agente contra el cáncer de mama, lo que demuestra su eficacia como posible tratamiento (Abu-Serie y El-Fakharany, 2017; Pereira *et al.*, 2016). La lactoferrina bovina, tanto en su forma de hierro libre como en su forma saturada de hierro, se ha usado con éxito en la inducción de citotoxicidad y en la reducción de la proliferación celular de células de cáncer de mama humano (Gibbons *et al.*, 2015). Del mismo modo, ambas formas de lactoferrina pueden modular algunas moléculas apoptóticas, incluida p53, e inhibir por completo la expresión de survivina, una proteína multifuncional implicada tanto en la inhibición apoptótica como en la regulación del ciclo celular, que genera resistencia a las células cancerosas en quimioterapia y radioterapia (Gibbons *et al.*, 2015; Townley, 2017). En otro estudio, se inocularon modelos murinos con esta misma línea celular de cáncer de mama, donde se probó el efecto de las nanopartículas de fosfato de calcio cargadas con lactoferrina saturada bovina, se determinó que el tratamiento con estas nanopartículas cargadas con lactoferrina fue capaz de disminuir el tamaño del tumor en los ratones (Mahidhara *et al.*, 2015). Por otro lado, péptidos bioactivos de lactoferrina también se han usado para probar su efecto antitumoral, como es el caso de un fragmento de lactoferrina humana que abarca el lóbulo C de la proteína expresada de forma recombinante, que se usó contra el cáncer de mama y se demostró que este péptido también induce la apoptosis celular, generando un importante arresto del crecimiento de células de

cáncer de seno (Hu *et al.*, 2016). Estos datos indican que tanto bLf como hLf tienen una alta eficacia en el control de la proliferación tumoral del cáncer de mama.

4.2.6 OTRAS FUNCIONES DE LA LACTOFERRINA

La actividad de Lf se extiende más allá de su capacidad antimicrobiana aunada a su implicación en la respuesta inmunológica pues debido a la interacción de Lf con receptores implicados en este tipo de trastornos metabólicos, como el receptor *Omentin-1*, implicado en el metabolismo de los lípidos (Mayeur *et al.*, 2016) la Lf tiene una posible aplicación como tratamiento contra obesidad, diabetes e hipertensión (Shi *et al.*, 2012). Por otro lado, la administración de Lf en modelos *in vivo* mostró que esta proteína contribuye al desarrollo neurológico, las funciones cognitivas y la memoria (Jahan *et al.*, 2016). De igual manera, también se encuentra implicada en procesos de regeneración ósea (Görmez *et al.*, 2015). Estos hallazgos proponen que la versatilidad en las propiedades nutraceuticas de molécula abarca casi todos los órganos y sistemas del humano (Figura 5).

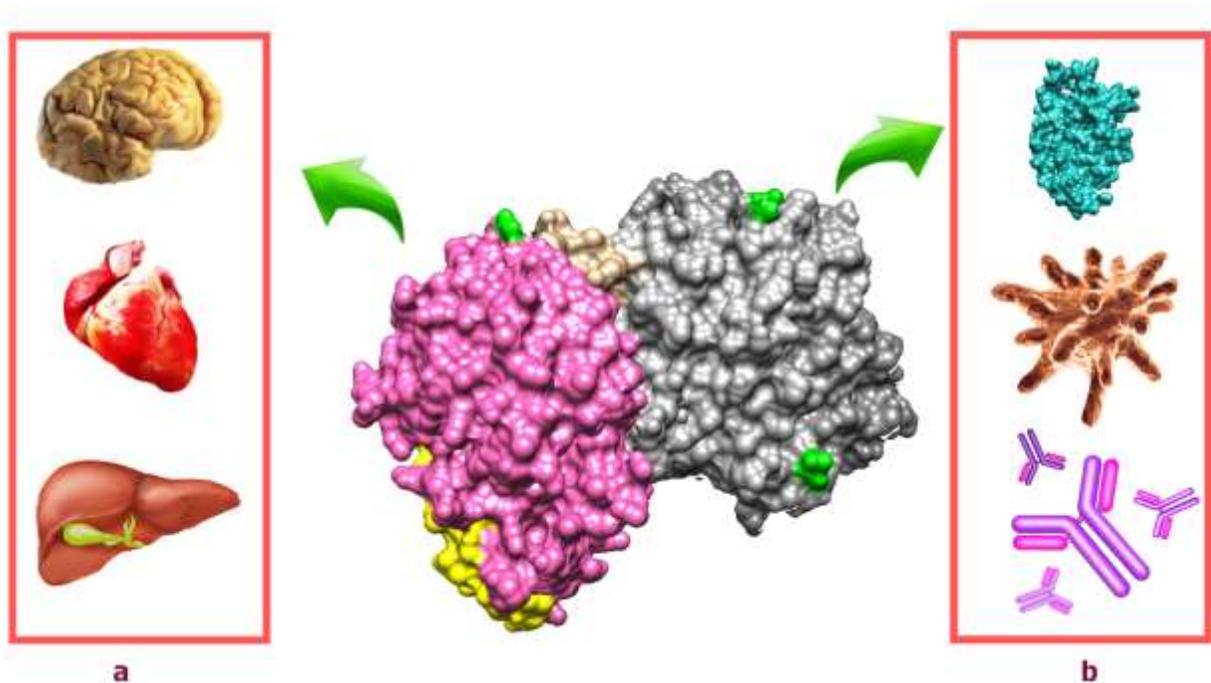


Figura 5. Actividad multifuncional de Lf. A) actividades de Lf no dependientes de microorganismos; Lf tiene implicaciones en el neurodesarrollo y algunas lesiones neurodegenerativas. Además, puede estar involucrado en la prevención de enfermedad cardíaca debido a su efecto sobre los niveles de acumulación de lipoproteínas, y puede ejercer actividad en el metabolismo en diferentes sistemas. B) Actividades de Lf frente a la respuesta infecciosa. Lf puede promover la producción de citocinas, potencia la fagocitosis y estimula la producción de anticuerpos en respuesta a la invasión de microorganismos (Modelado con **software Chimera** [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>]).

4.3 *Pichia pastoris* COMO SISTEMA DE EXPRESIÓN

La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (syn. *Komagataella* sp.) es actualmente uno de los sistemas de expresión de proteínas heterólogas mayormente utilizados gracias a su fácil manipulación genética y a su naturaleza eucariótica (Singsun *et al.*, 2016). En la industria biofarmacéutica, los sistemas de expresión basados en levaduras son altamente valorados; su naturaleza eucariota permite realizar modificaciones postraduccionales que repercuten en la calidad de la proteína que se expresará (Meehl y Stadheim, 2014). *Pichia pastoris* es un sistema de expresión bastante reconocido, gracias a que tiene un crecimiento a altas densidades con un bajo requerimiento de nutrientes, lo que lo hace un sistema de expresión

relativamente económico: por otro lado, sus promotores son estrictamente regulados, con lo cual se logra una producción alta de proteínas por litro de cultivo tanto vía intracelular como secretoria (Ahmad *et al.*, 2014). En ese sentido, es importante considerar las características que la proteína de interés debe tener, para elegir correctamente la cepa huésped, así como los elementos necesarios para la eficiente traducción de proteínas heterólogas.

4.3.1 TIPOS DE CEPAS HUÉSPED

Todas las cepas de expresión de *P. pastoris* son derivadas de la cepa silvestre NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL) (Cereghino y Cregg, 2000). Los diferentes tipos de cepas de *P. pastoris* modificadas genéticamente presentan fenotipos adquiridos por mutación o delección de genes y pueden clasificarse en cepas auxotróficas, cepas deficientes en proteasas y cepas glico-enriquecidas (“glyco-engineered strains”, cepas que han sido modificadas genéticamente para añadir patrones de glicosilación similar a humanos) (Serrano-Rivero *et al.*, 2016).

4.3.2

EXCR

ESIÓN DE PROTEÍNAS AL MEDIO DE CULTIVO

Una de las ventajas más atractivas de los sistemas de expresión basados en *Pichia pastoris*, es la facilidad de obtener las proteínas excretadas en el medio de cultivo. Esta ventaja, ha sido lograda gracias a la adición de péptidos señal que permiten la translocación de proteínas. Existen diferentes tipos de péptidos señal; los de tipo cotraduccional, en donde la preproteína es sintetizada simultáneamente con la

translocación al retículo endoplásmico; y, postraducciona, donde la preproteína se sintetiza por completo y es liberada de los ribosomas antes de la translocación en el retículo endoplásmico (Damasceno *et al.*, 2012). Actualmente, uno de los péptidos señal mayormente utilizado es el factor α MF (alpha-mating factor), un péptido postraducciona proveniente de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Tanghe *et al.*, 2015). Se ha reportado que el uso de α -MF como péptido señal puede incluso conducir a la secreción de mayores cantidades de una proteína recombinante que usando su péptido señal nativo (Daly y Hearn, 2005). La secuencia líder α MF contiene dos regiones: un pre-péptido que consta de 19 aminoácidos y un pro-péptido que consta de 67 aminoácidos. El procesamiento de la señal pre-pro MAT α se produce en tres pasos principales. El primer paso es la eliminación de la señal previa mediante peptidasas iniciales en el RE. Luego, en el aparato de Golgi, la endo-peptidasa Kex2 corta la secuencia pro-péptido entre la C-terminal-arginina y la lisina, y finalmente la proteína Ste13 corta rápidamente las repeticiones de Glu-Ala (Lin-Cereghino *et al.*, 2013) Se cree que el pro-péptido disminuye la velocidad y asegura un plegamiento adecuado de la proteína completa antes y después de la translocación al RE lo que sugiere que la región actúa como una chaperonina molecular para la proteína de carga secretada (Chahal *et al.*, 2017).

4.3.3

GLIC

OSILACIÓN DE PROTEÍNAS

El estado de glicosilación de una proteína recombinante destinada a fines terapéuticos es crítico para su función (Van Landuyt *et al.*, 2019); el interés científico y farmacológico por producir proteínas correctamente glicosiladas radica en su

explotación terapéutica: diferentes tipos de glicosilaciones aberrantes podrían ser causantes de la ineffectividad en diversas terapias (van den Boogert *et al.*, 2017). Las proteínas expresadas en levaduras, tienen la ventaja de contar con la maquinaria necesaria para ser correctamente procesadas, dobladas y ensambladas en moléculas funcionales (Cregg, 2007; Vogl *et al.*, 2013).

Las reacciones de modificación que ocurren dentro del retículo endoplasmático son altamente conservadas entre eucariotas inferiores y superiores; no obstante, todas las reacciones que tienen lugar dentro del aparato de Golgi varían entre cada organismo (Jacobs y Callewaert, 2009); la estructura del glicano al llegar al aparato de Golgi es similar en levaduras y mamíferos, y la ruta difiere significativamente a partir de su ingreso a este organelo. En levaduras, el glicano unido a *N*, se limita a la adición de manosa, manosilfosfato y/o residuos de galactosa, dependiendo de la levadura (Khan *et al.*, 2017). En el aparato de Golgi, las levaduras contienen varias manosiltransferasas así como manosilfosfato transferasas, que producen estructuras de *N*-glicanos que pueden estar manosiladas o hipermanosiladas en distintos grados (Gemmill y Trimble, 1999). La enzima central en la *N*-glicosilación es la oligosaccariltransferasa, que cataliza la transferencia inicial de un determinado glicano del portador lipídico dolicol-pirofosfato a cadenas polipeptídicas que entran en la vía secretora (Wild *et al.*, 2018). A medida que los polipéptidos se sintetizan y se trasladan a la luz del RE, las oligosaccariltransferasas se unen a los oligosacáridos ensamblados para seleccionar la secuencia consenso de polipéptidos que generan enlaces *N*-glicosídicos. Los oligosacáridos que se unen a los polipéptidos se procesan en el RE, que incluye la eliminación de los cuatro monosacáridos terminales (tres residuos de glucosa y una manosa); los oligosacáridos se transfieren a los Golgi para

ser recortado adicionalmente, directamente alargado a través de la adición gradual de residuos de manosa (Residuos de galactosa o N-acetilglucosamina en algunas especies; el número de monosacáridos adicionales añadido depende de la categoría de glicoproteínas) (Ge *et al.*, 2018) (Figura 6)

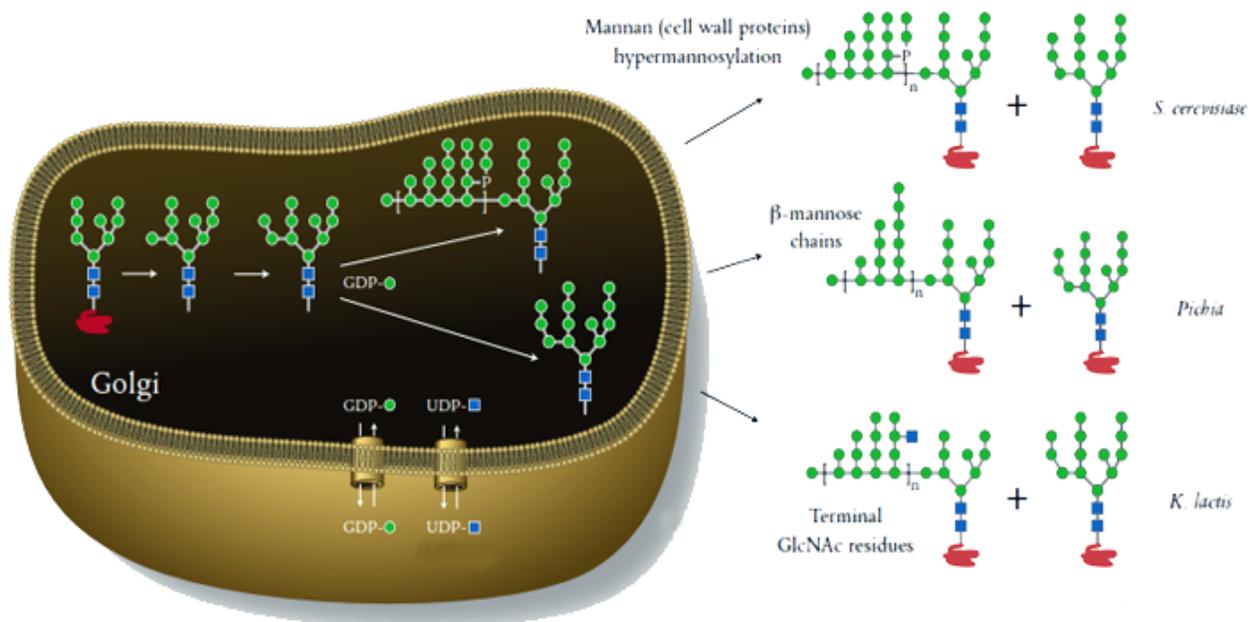


Figura 6. Representación esquemática del proceso de glicosilación en levaduras. Los sistemas de expresión basados en levaduras contienen diferentes enzimas manosiltransferasas que producen diferentes estructuras principalmente de tipo alta manosa. Dependiendo del tipo de levadura, las proteínas destinadas a la vía secretora pueden estar manosiladas o hipermanosiladas (Khan *et al.*, 2017) (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EUA, <https://www.neb.com/>)

4.3.4

EXPRESIÓN DE LACTOFERRINA RECOMBINANTE EN *Pichia pastoris*

La expresión de Lf recombinante de diferentes especies ha sido llevada a cabo con éxito en *P. pastoris*; a la fecha se ha logrado la expresión de Lf equina

(Paramasivam *et al.*, 2002), Lf porcina (Pecorini *et al.*, 2005), Lf humana (Jiang *et al.*, 2008), Lf ovina (Li *et al.*, 2015) y Lf bovina (Iglesias-Figueroa *et al.*, 2016), además, su péptido bioactivo, Lfcin de origen camélido también se ha expresado en este sistema (Chahardooli *et al.*, 2016). El éxito en el uso de esta levadura está influido por el diseño de las estrategias de clonación y expresión de proteínas heterólogas. Aspectos críticos como la elección de la cepa huésped, tipo de promotor, marcador de selección, la posible aplicación de sistemas de excreción hacia el medio de cultivo y el tipo de modificaciones postraduccionales que la proteína heteróloga requerirá, determinan el éxito de la expresión en este sistema (Ahmad *et al.*, 2014).

V. HIPÓTESIS

La lactoferrina nativa ha demostrado tener efecto anticancerígeno sobre células de cáncer de seno; por lo tanto, la lactoferrina humana recombinante expresada en la levadura *Pichia pastoris*, tendrá un efecto anticancerígeno similar a su contraparte nativa.

VI. JUSTIFICACIÓN

La lactoferrina posee la capacidad de modular ciertas funciones de la respuesta inmunológica, incluida su actividad anticancerígena; sin embargo, su mecanismo de acción no ha sido completamente elucidado; en ese sentido, diversos reportes sugieren que la estructura glicosilada de la molécula juega un papel importante en diversas de sus funciones. Debido a lo anterior, el uso de lactoferrina humana recombinante expresada en *Pichia pastoris* puede tener una conformación distinta que potencie sus capacidades funcionales, por lo que es importante establecer si existe relación entre los componentes de la lactoferrina con su función anticancerígena. La obtención de una proteína altamente funcional con capacidad para modular ciertos procesos de la respuesta inmunológica permite explorar nuevas posibilidades en la generación de tratamientos farmacológicos.

VII. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto anticancerígeno de la Lf humana recombinante sobre células de cáncer de seno, así como su posible mecanismo de acción.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener lactoferrina humana recombinante glicosilada a partir de su expresión en la levadura *Pichia pastoris* X33.
2. Demostrar si la lactoferrina humana recombinante presenta efecto anticancerígeno sobre células de cáncer de seno.
3. Determinar qué mecanismos de acción puede desencadenar la lactoferrina humana recombinante al ejercer un efecto anticancerígeno en células de cáncer de seno.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Materiales

Cepas microbiológicas y condiciones de cultivo

Se utilizaron las cepas *P. pastoris* X33 (Donada por el Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo, Cd. Cuauhtémoc, Chih. Méx.) y *E. coli* BL21D3. Se utilizaron los medios YPD (extracto de levadura 10%, dextrosa 20%, peptona 20% pH 6.5) para el cultivo y mantenimiento de levaduras y LB (peptona 10%, NaCl 10% y extracto de levadura 5% pH 7.0) para el cultivo y mantenimiento de bacterias y el medio BMMY (PBS 100 mmol/L⁻¹ pH 6.0, 1% extracto de levadura (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 2% peptona (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 1.34% YNB Sigma-Aldrich, Missouri, EUA, 400 µg-L⁻¹ biotina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) y 0.5% metanol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) para la inducción de la expresión de proteínas recombinantes en levaduras.

Líneas celulares y condiciones de cultivo

La línea celular cáncer de seno triple negativo MDA-MB-231 (ATCC, Manassas, Va, EUA), derivada de un paciente con adenocarcinoma (Cailleau *et al.*,

1974) y su variante de metástasis de pulmón MDA-MB-231/LM2-4 (Munoz *et al.*, 2006) fueron cultivadas bajo condiciones idénticas en medio DMEM (HyClone Logan, UT, EUA) suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado (Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, EUA), 100 U/mL penicilina (Life Technologies, Grand Island NY, EUA) y 100 µg/mL estreptomicina (Life Technologies, Grand Island NY, EUA). La línea celular MCF-10A no cancerígena derivada de epitelio glandular mamario utilizada como control negativo de citotoxicidad fue cultivada en medio DMEM/F12 suplementado con 10% suero fetal bovino, 10 µg/mL insulina humana recombinante (Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, EUA), 20 ng/mL factor de crecimiento epidérmico (Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA), 0.5 µg/mL hidrocortisona (Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, EUA), 2.5 mM L-glutamina (Life Technologies, Grand Island NY, EUA), 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina. Todas las células crecieron exponencialmente hasta alcanzar un porcentaje de confluencia de 60-75% y fueron despegadas del medio por tripsinización, contadas e incubadas en microplacas de 96 pozos a diferentes densidades de crecimiento de acuerdo con el estudio a realizar. Las condiciones de incubación se mantuvieron constantes a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de monóxido de carbono.

8.2 Métodos

8.2.1 Diseño *in silico* de la construcción genética pIGF5

Se utilizaron los programas computacionales SerialCloner 2.6.1 (disponible en http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html), SnapGene (GSL Biotech, disponible en www.snapgene.com), BLAST (National Institute of Health, EUA <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y SignalP 4.1 Server (DTU Bioinformatics,

Technical University of Denmark (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). La secuencia del gen que codifica para lactoferrina humana fue obtenida del GenBank (No. Acceso M83202.1). Se realizaron mutaciones puntuales silenciosas en la secuencia para eliminar sitios de restricción no deseados. La secuencia modificada del gen de lactoferrina humana fue enviada a la empresa GenScript®, donde se sintetizó y clonó en el vector de expresión de levaduras pPICZ α A (Invitrogen®).

8.2.2 Transformación genética de bacterias para la conservación y propagación de plásmidos (Hoisington, 1999)

Para realizar la transformación genética se prepararon células calcio competentes de *Escherichia coli* BL21(DE3) (Invitrogen®, Carlsbad CA, EUA). Las células fueron preparadas inoculando 5 mL de medio de cultivo LB con cepas de *Escherichia coli* BLB21DE3 y crecidas 15 h a 37 °C. Posteriormente, 1 mL del cultivo inicial fue utilizado para inocular 100 mL de medio LB y colocadas a 37 °C en agitación constante hasta obtener una densidad óptica de 0.35-0.4 (OD₆₀₀). El medio se colocó en tubos Falcon® de 50 mL previamente fríos (4°C) y centrifugados a 4000 rpm por 14 min a 4°C. El sobrenadante fue decantado y la pastilla fue resuspendida en 10 mL de MgCl₂ 100 mM frío, posteriormente centrifugado a 3000 rpm por 15 min a 4°C. El sobrenadante fue decantado y la pastilla resuspendida en 20 mL de CaCl₂ 100 mM; la suspensión se colocó en hielo por 20 min. La suspensión fue centrifugada a 3000 rpm por 15 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 5 mL de CaCl₂ 85 mM, 15% glicerol, y centrifugado nuevamente a 2100 rpm por 15 min a 4°C, posteriormente el sobrenadante fue retirado y la pastilla se resuspendió en 2 mL de CaCl₂ 85 mM, 15% glicerol (OD de células ~200-250). 50 μ l de células

competentes fueron colocadas en microtubos de 1.5 mL y congeladas a -80°C . La transformación de células de *E. coli* fue realizada por choque térmico. 100 ng de ADN plasmídico fueron colocados en $50\ \mu\text{l}$ de células competentes mezcladas y colocadas en hielo por 15 min. Posteriormente el tubo fue sometido a choque térmico a 42°C por una hora y colocado en hielo por 5 min; posteriormente se le adicionaron $500\ \mu\text{l}$ de medio LB a la transformación y colocados en agitación por una h. Transcurrido este periodo, las células fueron sometidas a centrifugación a 13200 rpm durante 20 s y se descartaron $150\ \mu\text{l}$ de medio, los $150\ \mu\text{l}$ restantes fueron colocados en caja Petri con medio LB suplementado con zeocina ($25\ \text{mg/ mL}$) e incubadas a 37°C por 16 h.

8.2.3 Aislamiento de ADN plasmídico (Miniprep) (Bimboim y Doly, 1979)

El ADN plasmídico fue extraído de *E. coli* por el método de lisis alcalina. Cultivos bacterianos fueron crecidos en placas LB suplementadas con zeocina ($25\ \text{mg/ mL}$) e incubados a 37°C por 16 h. Las células crecidas fueron colectadas y resuspendidas en $70\ \mu\text{l}$ de agua destilada estéril, posteriormente se adicionaron $350\ \mu\text{l}$ de TENS ($10\ \text{mM Tris-HCl pH 7.5}$, $1\ \text{mM EDTA}$, $0.1\ \text{M NaOH}$, $0.5\% \text{ SDS}$), la solución se mezcló por inversión de tubo y se reposaron 3 min, después de los cuales se le adicionaron $150\ \mu\text{l}$ de acetato de sodio $3.0\ \text{M pH 5.2}$ y mezclados suavemente por inversión, y colocados en hielo 5 min para precipitar proteínas y ADN cromosomal. Posteriormente se centrifugó a 13200 rpm durante 5 min a 4°C , el sobrenadante fue recuperado en un microtubo de 1.5 mL y se le adicionaron $700\ \mu\text{L}$ de etanol absoluto centrifugándolo posteriormente a 13200 rpm durante 10 min. El ADN precipitado fue lavado con $500\ \mu\text{L}$ de etanol 70% y se dejó evaporar a

temperatura ambiente. El ADN fue resuspendido con 20 μL de agua destilada estéril y posteriormente cuantificado y almacenado a -20°C hasta su uso.

8.2.4 Preparación de ADN para la transformación genética de *Pichia pastoris* X33

A partir de 100 mL de cultivo bacteriano suplementado con zeocina (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA) (25 mg/ mL) se aisló ADN plasmídico con el kit comercial ZymoPURE Plasmid Maxiprep Kit (ZYMO RESEARCH) de acuerdo con las condiciones del fabricante, para la obtención de ADN de alta pureza. 1 μg de ADN (previamente cuantificado por espectrofotometría en un equipo Nanodrop® 2000) fue linearizado con la enzima ScaI durante 24 h a 37°C . El ADN cortado fue concentrado con dos volúmenes de etanol absoluto y resuspendido finalmente en un volumen final de 20 μL de H_2O inyectable y almacenado a -20°C hasta su uso.

8.2.5 Preparación de células electro competentes de *Pichia pastoris* para su transformación genética (Cregg y Russell, 1998)

50 mL de medio YPD sin suplementar fueron inoculados con un cultivo fresco de *Pichia pastoris* X33 a 30°C a 150 rpm durante 24 h, hasta alcanzar una densidad de 5×10^7 células/mL. Al día siguiente el cultivo fue centrifugado a 5000 rpm 5 minutos a 4°C . Se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas por vórtex en 5 mL YPD/HEPES (1M, pH 8.0). Se agregaron 125 μL de dithiothreitol (DTT) 1M y se mezcló suavemente. Las células se incubaron durante 15 minutos a 30°C . Transcurrido ese tiempo las células se lavaron con 20 mL de sorbitol 1M frío y las células fueron recuperadas por centrifugación a 5000 rpm 5 minutos a 4°C . Se descartó el sobrenadante y las células fueron lavadas nuevamente con 5 mL de

sorbitol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) 1M frío y resuspendidas por vórtex, llevando el volumen a 25 mL con sorbitol 1M frío. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 5000 rpm 5 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en 1 mL de sorbitol 1M frío y fueron recuperadas por centrifugación a 5000 rpm 5 minutos a 4°C. Finalmente las células fueron resuspendidas en 0.5 mL de sorbitol 1M frío y alicuotadas en viales de 50 µL y almacenadas a -80°C hasta su uso; la concentración final de las células fue de 1×10^9 células/mL.

8.2.6 Transformación genética de *Pichia pastoris* X33

La transformación genética de *P. pastoris* fue llevada a cabo en un electroporador MicroPulser™ Electroporator (BIO-RAD®, Hercules CA, EUA). 500 ng de ADN linearizado con la enzima ScaI fueron mezclados con 50 µL de células electrocompetentes y transferidos a una cubeta de electroporación (MicroPulser/Gene Pulser Cuvettes 0.2 cm gap BIO-RAD®, Hercules CA, EUA) previamente enfriada a -20°C durante 4 h. La cubeta fue colocada dentro del portacubetas de la cámara del electroporador y se deslizó hasta que estuvo en contacto con la base de la cámara. Se utilizaron los parámetros preestablecidos por el electroporador para *P. pastoris* (voltaje 1500V, resistencia 200 Ω, capacitancia 25 mF) y se pulsó una vez. La cubeta fue removida de la cámara e inmediatamente se agregó 1mL de YPD/sorbitol 1M frío y se transfirió el contenido de la cubeta a un microtubo de 1.5 mL estéril. Las células electroporadas fueron incubadas a 30°C durante 2 h. Transcurrido ese tiempo las células fueron centrifugadas y se decantaron 800 µL de sobrenadante, el resto fue resuspendido e inoculado en placas YPD/sorbitol 1M suplementado con 200 µg/mL de

zeocina. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 72-96 h hasta el crecimiento de colonias.

8.2.7 Extracción de ADN genómico y amplificación de genes de interés

Las colonias que crecieron en presencia del agente de selección fueron cultivadas en 5 mL de medio YPD suplementado con 200 µg/mL de zeocina. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 5000 rpm 5 min a 4°C; se decantó el sobrenadante y se agregaron 2 mL de solución de lisis TSNT (2% Tritón X-100, 1% SDS, 0.1M NaCl, 0.01M Tris-HCl pH 8.0 y 0.001M EDTA) y arena estéril 1:1 (p/v) y se resuspendió en vórtex durante 1 min. Se centrifugó a 11000 rpm 10 min a 4°C. El sobrenadante fue colocado en un tubo limpio y se agregaron 3 mL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcló suavemente y se centrifugó a 11000 rpm 10 min a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el ADN. Se centrifugó a 11 rpm 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla de ADN fue lavada con 2 mL de 70% etanol y se centrifugó a 11000 rpm 10 min a 4°C. Finalmente se decantó el sobrenadante y una vez que se evaporó por completo el etanol, el ADN fue resuspendido en 50 µL de dH₂O estéril y fue cuantificado por espectrofotometría. Las amplificaciones de PCR se realizaron utilizando primers específicos para amplificar una región de aproximadamente 2885 pb, que incluye una parte del promotor AOX1 hasta el terminador:

Fw-5' TCTATCGCTTCTGAACCCCG 3' Rv-

5'GAAGCCTGCATCTCTCAGG', bajo las siguientes condiciones: 2 min de desnaturalización a 94°C, seguido por 35 ciclos de amplificación (45 s a 94°C, 45 s a 58°C, 1 min a 72°C) y un ciclo final a 72°C por 5 min.

8.2.8 Inducción de la expresión de proteínas recombinantes de *Pichia pastoris*

(Jiang *et al.*, 2008).

Las clonas obtenidas fueron inoculadas en 20 mL de medio YPD suplementado con 200 µL/mL de zeocina (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e incubadas a 30°C durante 24 h en agitación. Al día siguiente las células fueron recuperadas por centrifugación y se decantó el 80% del medio; posteriormente, fueron resuspendidas e incubadas a una densidad óptica de 0.2 en medio de inducción BMMY (PBS 100 mmol/L⁻¹ pH 6.0, 1% extracto de levadura (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 2% peptona (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 1.34% YNB Sigma-Aldrich, Missouri, EUA, 400 µg-L⁻¹ biotina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) y 0.5% metanol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) a 30°C a 150 200 rpm para inducir la expresión de rhLf. El metanol fue adicionado a una concentración final de 0.5% (v/v) cada 24 h para mantener la inducción. La inducción de proteínas fue mantenida durante 96 h de crecimiento.

8.2.9 Obtención y purificación de proteínas totales

Las proteínas totales fueron recuperadas a partir del medio de cultivo. Después de 96 h de inducción, las células fueron separadas del medio de cultivo por centrifugación a 5000 rpm 5 min a 4°C. El medio de cultivo sobrenadante fue dializado contra 1X PBS pH 7.4 durante 24 h a 4°C a 100 rpm. Al día siguiente las proteínas fueron concentradas 10 veces de la siguiente manera: se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto frío y se incubaron en hielo durante 10 min; posteriormente las proteínas fueron centrifugadas a 10000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante y las proteínas fueron resuspendidas en agua estéril. Después de la diálisis, los extractos de proteínas se purificaron utilizando una resina

comercial cargada con Níquel de alta afinidad (GenScript®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para obtener lactoferrina purificada. El contenido de los niveles de endotoxinas en lactoferrina purificada se determinó con el kit de detección de endotoxinas ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript®), que puede detectar hasta 0.25 EU/mL, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

8.2.10 Análisis de proteínas en un gel de acrilamida (Laemmli, 1970)

Se utilizó una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems (BIO-RAD, Hércules, CA, EUA); se colocaron en el soporte de preparación dos vidrios para electroforesis con una separación de 1 mm entre cada uno, previamente lavados con etanol al 70%. Se preparó el gel concentrador con dH₂O (2.9 mL), Poliacrilamida Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) 30% (3.0mL), Tris Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) 1 M pH=8.8 (4.0 mL), SDS 10% (0.100 mL), APS (Bio Basic Inc, Canadá) 10% (0.100 mL) y TEMED (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) (0.006 mL). El gel se vertió y se dejó polimerizar en condiciones de anaerobiosis durante 30 min. Una vez polimerizado se preparó el gel separador con dH₂O (2.85 mL), Poliacrilamida 30% (0.35mL), Tris 1 M pH=6.8 (0.570 mL), SDS 20% (0.020 mL), APS 10% (0.038 mL) y TEMED (0.005 mL). El gel concentrador se colocó en el espacio restante de los vidrios y una vez dentro, se colocó un peine de 10 o 15 pozos. Cuando el gel quedó completamente polimerizado se sacó del soporte de preparación y se colocó en la cámara de electroforesis previamente llenada con buffer de corrida 1X (3 g Tris base, 14.4 g glicina, 1 g SDS pH=8.3 aforado a 1 litro de agua destilada); se retiró el peine del gel y los pozos fueron lavados con buffer de corrida. En un microtubo de 1.5 mL Se

colocaron 100 µg de cada muestra y se mezclaron en 10 µl de buffer de carga 4X (0.125 M Tris HCl (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 0.5 M pH=6.8, 20% glicerol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 0.715 M β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 0.005% azul de bromofenol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) y 4% (p/v) SDS); las muestras se calentaron a ebullición durante 5 min y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, después fueron cargadas en el gel. Se corrió el gel a 85 Volts durante tres h. Transcurrido ese tiempo el gel fue retirado de la cámara y colocado en solución fijadora (500 mL metanol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 70 mL ácido acético glacial (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), 430 mL de agua destilada) durante 15 minutos en agitación suave. Posteriormente el gel fue teñido durante 1 h con solución de teñir (200 mL metanol, 265 mL dH₂O, 35 mL ácido acético y 0.5 g azul de Coomassie R-250); transcurrido este tiempo el gel se colocó en solución de desteñir (200 mL metanol, 100 mL etanol, 50 mL ácido acético, 650 mL dH₂O). Durante 1 h. Los geles fueron visualizados y analizados en un fotodocumentador KODAK[®] Gel Logic 100 System (KODAK, NY, EUA)

8.2.11 Western blot de proteínas (Hoisington, 1999)

Se realizó una electroforesis en gel de acrilamida de acuerdo con las condiciones previamente descritas; una vez terminada la electroforesis se cortó una membrana de PVDF (BIO-RAD, Hércules, CA, EUA) de las mismas dimensiones del gel y fue activada en metanol durante 20 s; posteriormente se lavó con dH₂O durante 20 segundos y finalmente fue equilibrada en buffer de transferencia (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 20% metanol pH=8.3) durante 15 minutos. El resto de los componentes de la transferencia (dos cojines de fibra, 2 hojas de papel filtro de 7.0 x

10.5 cm y la membrana) y el gel también fueron equilibrados en buffer de transferencia durante 15 minutos. Se construyó el blot en el siguiente orden: casete negro/fibra/papel filtro/gel/membrana/papel filtro/casete blanco. Se cerró y se colocó en una cámara de transferencia Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD, Hércules, CA, EUA) y se agregó buffer de transferencia hasta el indicador de la cámara. El buffer de transferencia dentro de la cámara se mantuvo a 4°C en agitación y se realizó la transferencia a 100 Volts durante dos h. Al término de la transferencia, se retiró la membrana de PVDF y se bloqueó durante 2 h con solución de bloqueo al 5% (leche Svelty 0% Nestlé® diluida en TBS-Tween 20) a 40 rpm. Posteriormente la membrana fue incubada durante 24 h a 4°C en agitación con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-6XHistidina (Origene Technologies, Inc., Rockville, MD EUA) (1:1000 diluido en TBS-Tween 20 + 2% leche Svelty Nestlé®). Después de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron dos lavados de 10 minutos con TBS-Tween 20 (125 nM NaCl, 25 mM Tris pH=8.0 + 0.05% Tween 20) en agitación. Posteriormente la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA) (1:10000 diluido en TBS-Tween 2 + 2% leche Svelty Nestlé®) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Al término de la incubación con el anticuerpo secundario se realizaron dos lavados de 10 minutos con TBS-Tween 20 en agitación. Posteriormente, se agregó el sustrato ECL (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA) y la membrana se expuso a un sistema de detección quimioluminiscente (iBright FL1000; Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA).

8.2.12 Análisis de glicosilación de Lactoferrina humana recombinante

5.2.12.1 Espectroscopía de masas

100 µg de rhLf fueron congelados a -80°C durante una h y posteriormente se liofilizaron durante 12 h. Al día siguiente la muestra liofilizada fue resuspendida en buffer Tris-HCl 100 mM pH 7 y fue incubada cinco minutos a 100°C con la finalidad de ser desnaturalizada. Posteriormente la muestra fue digerida con 1 mg/mL de tripsina de origen bovino (Millipore-Sigma, Carlsbad, CA, EUA) a 37°C durante 12 h. Al día siguiente la reacción se detuvo incubando la muestra a 100°C durante cinco minutos. Posteriormente la muestra fue digerida con 1500 UI de la enzima PGNasa F (New England Biolabs, Massachusetts, EUA) a 37°C durante 12 h con la finalidad de liberar los glicanos de la cadena polipeptídica. Después de la digestión, las muestras fueron purificadas con el kit comercial Solid Phase Extraction (Millipore-Sigma, Carlsbad, CA, EUA) de acuerdo con las condiciones del fabricante para separar los péptidos de los glicanos. Los péptidos fueron almacenados a -20°C para su uso posterior y los glicanos fueron hiper-metilados para exponer los residuos de carbohidratos para su posterior análisis, de acuerdo con el siguiente protocolo establecido por (Morelle *et al.*, 2009). El microtubo que contenía los glicanos fue saturado al vacío en una atmósfera de argón y se agregaron 500 µL de DMSO (Millipore-Sigma, Carlsbad, CA, EUA). A la muestra se le adicionaron 25 mg de NaOH y después se agregaron 300 µL de yodometano en una corriente de argón. La mezcla fue homogenizada vigorosamente y se incubó en baño de ultrasonido durante dos h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la reacción fue detenida agregando un mL de dH₂O. Una vez detenida la reacción, se agregaron 600 µL de cloroformo y se mezcló en vórtex. Cuando la muestra se separó en dos fases, se transfirió la fase orgánica a

otro tubo limpio y se repitió la extracción dos veces más. Posteriormente, se realizaron seis lavados sucesivos a la fase orgánica con un volumen de agua y la fase orgánica fue secada bajo una corriente de nitrógeno en una campana de extracción. Finalmente, a la muestra seca se le adicionaron 200 μ L de metanol 100%. Una vez terminada la hipermetilación de la muestra, se procedió a correr un espectro de masas por infusión directa (Electrospray, ESI) utilizando en equipo LCQ Fleet (Thermo Scientific TM). Los datos obtenidos en el cromatograma fueron analizados con el software GlycoWorkBench 2.0 (Diseñado por Alessio Ceroni, Division of Molecular Biosciences, Imperial College London, UK).

8.2.13 Ensayo de tinción nuclear diferencial

Las células MDA-MB-231, MDA-MB-231-LM2-4 y MCF-10A crecieron en una fase exponencial media (60 a 70% de confluencia) y se lavaron con medio fresco para eliminar los restos celulares y células flotantes, que corresponden principalmente a las células muertas. Luego, las células adherentes (vivas) se separaron mediante la adición de solución de tripsina al 0,25% (Invitrogen, Carlsbad, CA), se diluyeron en medio DMEM (Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, EUA) libre de suero y se incubaron durante aproximadamente 10 min a 37°C (Varela-Ramirez *et al.*, 2011). Después de ser cultivadas, las células se contaron utilizando una cámara de Neubauer y se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pozos a una densidad de 10000 células en 100 μ l de medio completo en cada pozo, seguido de incubación durante la noche. A continuación, las células se trataron con 5, 10 y 50 μ g/mL de lactoferrina humana durante 24 h. Los siguientes controles se incluyeron simultáneamente en esta serie de experimentos: 5% v/v H₂O como control de disolvente, células no tratadas y como

control positivo para citotoxicidad, células tratadas con 2 mM de H₂O₂. Para determinar los porcentajes de muerte celular, se utilizó el ensayo de tinción nuclear diferencial (DNS) (Lema *et al.*, 2011; Santiago-Vázquez *et al.*, 2016); Brevemente, se usaron dos colorantes de unión a ADN fluorescente: Hoechst 33342 (Invitrogen, Eugene, OR), un fluoróforo permeable a la membrana celular que marca células vivas y muertas, proporcionando así el número total de células y yoduro de propidio (PI; MP Biomedicals, Solon, OH, EUA), un colorante que tiñe las células con membrana plasmática comprometida, especificando el número total de células muertas. Dos horas antes de completar el tiempo de incubación de 24 h, se añadió una mezcla de Hoechst (blue signal; Invitrogen, Eugene, OR, USA) y Ioduro de propidio (red signal; MP Biomedicals, Solon, OH, EUA) a las células con fines de tinción, alcanzando una concentración final de 5 µg/ mL de cada colorante. Posteriormente, las imágenes se capturaron en forma de células vivas directamente desde cada pozo, utilizando el sistema de bioimagen IN CELL 2000 (GE Healthcare, Chicago, IL). Para adquirir números adecuados de regiones de interés (ROI = células), se adquirieron montajes 2X2 de cuatro campos de imagen adyacentes por pozo utilizando un objetivo 10x y de dos canales de fluorescencia individuales; señales de emisión Hoechst (azul; 461 nm) y PI (rojo, 617 nm). El análisis de los datos y la segmentación de la imagen se lograron mediante el uso del software IN Cell Investigator (GE Healthcare). A continuación, la concentración de lactoferrina humana que mata al 50% de la población celular (concentración citotóxica 50%; CC₅₀) se calculó mediante interpolación lineal (<https://www.johndcook.com/interpolator.html>).

La toxicidad fue comprobada utilizando las líneas derivadas de cáncer de mama humano mencionadas anteriormente, así como la línea celular derivada de

mama epitelial no cancerosa humana. La toxicidad celular se controló utilizando un ensayo de bioimagen con tinción nuclear diferencial (DNS) de células vivas (Lema *et al.*, 2011). Las células se sembraron en microplacas de 96 pozos y se incubaron durante la noche para permitir la adherencia. A continuación, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de rhLf (5, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 h. Se incorporaron varios controles en cada ensayo, que incluyeron agua como control de solvente, peróxido de hidrógeno como control positivo y células no tratadas como control negativo. Una h antes de la obtención de imágenes, se añadió una mezcla de yoduro de propidio y Hoechst 33342, dos intercaladores fluorescentes de ácidos nucleicos, a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en ambos casos. La señal de fluorescencia de cada fluoróforo individual emitido por los núcleos de la célula se adquirió en dos canales separados de acuerdo con los requisitos de excitación / emisión de los colorantes respectivos. Las imágenes se capturaron directamente de las microplacas de cultivo celular utilizando un sistema de bioimagen BD Pathway 855 (BD Biosciences Rockville, MD, EE. UU.). Para evaluar un número adecuado de regiones de interés (ROI, equivalentes a la cantidad de núcleos/células), se capturaron montajes de cuatro campos de imagen adyacentes por pozo utilizando un objetivo 10x. La adquisición de imágenes y el análisis de datos para determinar el porcentaje de células muertas de cada pozo individual se lograron utilizando el software BD AttoVision™ v1.6.2 (BD Biosciences). Los puntos de datos experimentales, así como todos los controles, se evaluaron por cuadruplicado. Los valores CC se calcularon en base a una ecuación de interpolación lineal utilizando el rango de concentraciones de lactoferrina humana descrito anteriormente.

8.2.14 Determinación del Índice de Citotoxicidad Selectiva (Robles-Escajeda *et al.*, 2016)

El índice de selectividad citotóxica (SCI) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{SCI} = \text{CC}_{50} \text{ de células no cancerosas} / \text{CC}_{50} \text{ de células cancerígenas.}$$

8.2.15 Análisis de la vía apoptosis/necrosis mediante ensayo de Anexina V/FITC (Robles-Escajeda *et al.*, 2016)

Células MDA-MB-231 se cultivaron en una placa de 24 pozos a una densidad de 100 000 células/pozo en 1 mL de medio de cultivo. Las placas fueron incubadas durante la noche para permitir la unión celular, después se agregaron 100 µg/ mL de lactoferrina humana purificada y se incubaron durante 48 h. En esta serie de experimentos, los controles incluidos fueron 5% v/v dH₂O estéril como control de solvente, células no tratadas, y como control positivo de apoptosis, células tratadas con 2 mM de H₂O₂. Una vez que las células se colectaron, se lavaron con PBS frío en un tubo para citómetro de flujo, se tiñeron dos veces con 100 µL de buffer de unión que contenía anexina V-FITC y PI siguiendo las recomendaciones del fabricante (Beckman Coulter, Miami, FL). Brevemente, después de una suave homogeneización, las células resuspendidas con la solución de la mezcla de tinción se incubaron en hielo durante 15 min en oscuridad y luego se añadieron 300 µL del buffer de unión frío y se analizaron inmediatamente mediante citómetro de flujo (Gallios, Beckman Coulter). Aproximadamente, se adquirieron 10 000 eventos (células) para cada muestra individual. Se utilizaron gráficos de puntos citométricos de flujo de dos parámetros separados en cuatro cuadrantes para adquirir los porcentajes de valores de apoptosis y necrosis. Para este propósito, los detectores FL1 y FL2 se colocaron a

lo largo del eje X, y el eje Y, respectivamente. Todos los puntos experimentales y controles se realizaron por cuadruplicado. La adquisición de datos y el análisis se realizaron utilizando el software Kaluza (Beckman Coulter, Miami, FL, EUA).

8.2.16 Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Las células MDA-MB-231 (cultivos en fase de crecimiento logarítmico) se expusieron a lactoferrina a dosis crecientes, y los cambios concomitantes en los perfiles del ciclo celular se determinaron mediante contenido de ADN usando un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter, Miami, FL, EUA). Este citómetro de flujo está equipado con un láser violeta de 405 nm de estado sólido capaz de excitar el intercalador de ácido nucleico DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro), que se usó para marcar el ADN. Las células se cultivaron en placas de 24 pozos como se detalló anteriormente y se trataron con lactoferrina durante 72 h. Como control positivo de inhibición del ciclo celular se utilizó el antibiótico G418 a una concentración final de 1 µg/mL. Las células flotantes se recuperaron en un tubo de citometría de flujo y se colocaron en hielo. Las células adherentes restantes fueron recolectadas después del desprendimiento con 300 µL de solución de tripsina al 0.25% durante 5 minutos a 37 °C. Las células de cada pozo individual (tanto desprendidas como flotantes) fueron centrifugadas a 263×g durante 5 minutos. El pellet de células resultantes fue resuspendido en 100 µL de medio fresco. Posteriormente, 200 µL solución de medio de aislamiento nuclear (NIM) -DAPI (NPE Systems, Inc. Pembroke Pines, FL, EE. UU. Y Beckman Coulter) fue añadido a las suspensiones celulares, y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Posteriormente se analizaron por citometría de flujo. Las

distribuciones de fase del ciclo celular se analizaron usando Gallios Software CXP 9.1 (Beckman Coulter).

Las células MDA-MB-231 sembradas a una densidad de 25000 células/mL de medio completo en cada pozo se expusieron a 9.4 y 6.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lactoferrina durante 72 h; se usaron placas de 24 pozos para este propósito. A continuación, se colectaron células flotantes y adherentes (separadas con tripsina), se centrifugaron y se resuspendieron suavemente en 100 μL de PBS. Luego, se le agregaron 200 μL de medio de aislamiento nuclear (NIM)-solución de 4,6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI) (NIM-DAPI; Beckman Coulter) y se procesaron inmediatamente mediante citometría de flujo (Gallios, Beckman Coulter). Aproximadamente, se adquirieron 20000 eventos por muestra mediante el uso de un citómetro de flujo equipado con un láser de 405 nm (Gallios; Beckman Coulter), una puerta de celda única y un detector FL9. El análisis de la distribución de fase del ciclo celular se realizó a través del software Kaluza (Beckman Coulter) estableciendo cuatro compuertas en cada histograma de parámetros individuales: como un indicador de la fragmentación de ADN inducida por apoptosis, sub-G0/G1, hipodiploidía; G0/G1, diploidia; S, hiperdiploidia; y G2/M, tetraploidía (Robles-Escajeda *et al.*, 2013). Se realizaron cuatro réplicas para cada punto experimental y sus controles correspondientes.

8.2.17 Preparación de microplacas para determinar el efecto de lactoferrina en la arquitectura del citoesqueleto

Para esta serie de experimentos, se utilizó un microscopio confocal y la línea celular MDA-MB-231. Antes de preparar una placa experimental de 96 pozos, las células se procesaron como se describió anteriormente en la sección de líneas

celulares y condiciones de cultivo y se sembraron a una densidad de 2500 células en 100 μ L de medio DMEM completo para cada pozo; para este experimento se utilizaron placas de 96 pozos ópticamente transparentes (BD Falcon, Cat. No. 353219). Debido a que se utilizó un objetivo de 100X de aumento para capturar las imágenes, no se utilizaron los pozos periféricos de la placa. Las microplacas se incubaron a 37°C durante la noche para promover la unión celular. A continuación, las células MDA-MB-231 se incubaron con 100 μ g/ mL (CC_{50}) de lactoferrina durante 2 y 4 h, respectivamente. En esta serie de experimentos se incluyeron tres fármacos conocidos por su capacidad de afectar la organización del citoesqueleto: 5 μ g/ mL de citocalasina D (Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, EUA), un potente inhibidor de la polimerización de actina, 1 μ M de forbol 12-miristato 13- acetato (PMA) (Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, EUA), un inductor de cambios morfológicos celulares y reorganización del citoesqueleto, y 1 μ M de paclitaxel un inhibidor de la despolimerización de microtúbulos. Se incluyó H₂O como un control de disolvente.

8.2.19 Análisis estadístico

Todos los experimentos se repitieron cuatro veces y se reportaron como el promedio de triplicados con las desviaciones estándar correspondientes. La significación estadística de las diferencias entre dos muestras experimentales se realizó mediante prueba T-Student emparejada de dos colas. Para las comparaciones de dos grupos de muestras independientes, se consideró significativo un valor de $P < 0.05$.

8.2.18 Tinción y fijación del citoesqueleto

Después de terminado el tiempo de incubación, sin retirar el medio de cultivo, a cada pozo se añadieron 100 μ L de formaldehído (Sigma-Aldrich, Carlsbad, CA, EUA) al 8% recién preparado (alcanzando una concentración final de formaldehído del 4%) como solución de fijación y la placa se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó la solución de fijación y a cada pozo se le añadieron 200 μ L de Tween20 al 0.1% en PBS para fines de lavado y permeabilización, y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados adicionales con la última solución (Tween20 en PBS al 0.1%). Posteriormente, después de eliminar la solución permeabilizante, se agregaron a cada pozo 200 μ L de BSA al 5% en TBS-T y se incubaron durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Luego, las células se tiñeron tres veces con 50 μ L por pozo con una solución de PBS Tween20 al 0.1% que contenía 5 μ g / mL de DAPI, 0.156 μ M de phalloidina conjugada con Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) y 0.5 μ g/ mL de anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina conjugado con Alexa Fluor 488 (clon DM1A; Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) incubando 1 h a temperatura ambiente en oscuridad en agitación. A continuación, las células se lavaron tres veces usando 200 μ L de la solución de permeabilización como se describió anteriormente; al final, se dejaron 200 μ L de la solución de permeabilización en el pozo. Durante todo el proceso, las células nunca permanecieron secas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Diseño y construcción del vector de expresión pIGF5

El gen de lactoferrina humana (HLF1) comprende un marco de lectura abierto (ORF) de 2331 pb de tamaño, que codifica un polipéptido de 711 aminoácidos con un peso molecular estimado de 78.4 kDa y un PI estimado de 8.12 (calculadora de proteínas v3.4 <http://protcalc.sourceforge.net/cgi-bin/protcalc>). A partir de dicho gen, se realizaron mutaciones puntuales silenciosas para eliminar sitios de restricción no deseados en la secuencia y obtener el gen que codifica para lactoferrina humana, el cual quedó flanqueado por la secuencia del factor de excreción α Factor en el extremo 5' y por una cola de seis histidinas en el extremo 3', y fue clonado en el vector comercial pPICZ α (INVITROGEN®) en los sitios de restricción *EcoRI* Y *XbaI* para dar origen a la construcción pIGF5 (Figura 7).

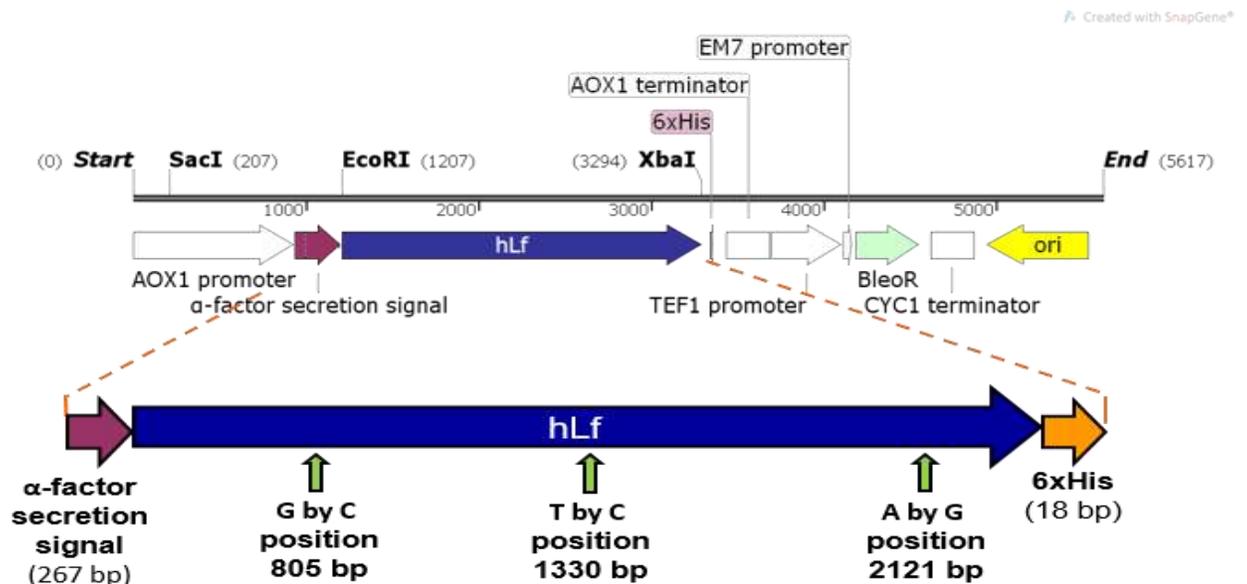


Figura 7. Construcción genética pIGF5. El marco abierto de lectura del gen hLf se clonó en el vector pPICZ α (Invitrogen), flanqueado por la señal de secreción del factor α y la etiqueta 6xHis, en el extremo 5' y 3', respectivamente. Además, se introdujeron varias mutaciones puntuales silenciosas para eliminar los sitios de restricción no deseados y se indican mediante flechas verticales, incluido el

cambio de nucleótido y la posición (bp) en la secuencia rhLf. El plásmido resultante se denominó pIGF5 (IGF-Iglesias Figueroa); AOX1, promotor alcohol oxidasa 1 de *P. pastoris*. El gen BleoR que confiere resistencia a la zeocina, se incluyó como gen marcador de selección.

La construcción genética pIGF5 (Figura 5) contiene un gen que codifica para lactoferrina humana bajo el control del promotor AOX1 (Alcohol oxidasa 1) para su expresión en la levadura *Pichia pastoris*. El gen completo tiene un tamaño de 2079 pb. Dicha construcción cuenta también con un gen marcador de selección que le confiere resistencia a zeocina, un péptido líder α F proveniente de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que permite la exportación de proteínas a vía secretora de la levadura, y finalmente, cuenta con un origen de replicación en bacterias.

9.2 Caracterización de la construcción genética pIGF5

La construcción fue propagada en *E. coli* BL21DE3 y a partir de una extracción de ADN plasmídico se caracterizó mediante digestión con enzimas de restricción. Se realizaron cortes con las enzimas *EcoRI/XbaI* para liberar el gen de lactoferrina humana y con la enzima *SacI* para caracterizar el sitio de recombinación homóloga en *Pichia pastoris*, el cual se encuentra dentro del promotor AOX1. Se obtuvieron dos fragmentos de 3591 y 2079 pb correspondientes al corte con las enzimas *EcoRI/XbaI* y se obtuvo un fragmento linearizado de 5617 pb correspondiente al corte con la enzima *SacI* (Figura 8a). Por otro lado, se amplificó una región de 2885 pb que abarca una región interna del promotor AOX1, el gen completo de lactoferrina humana y el terminador AOX1 (Figura 8b).

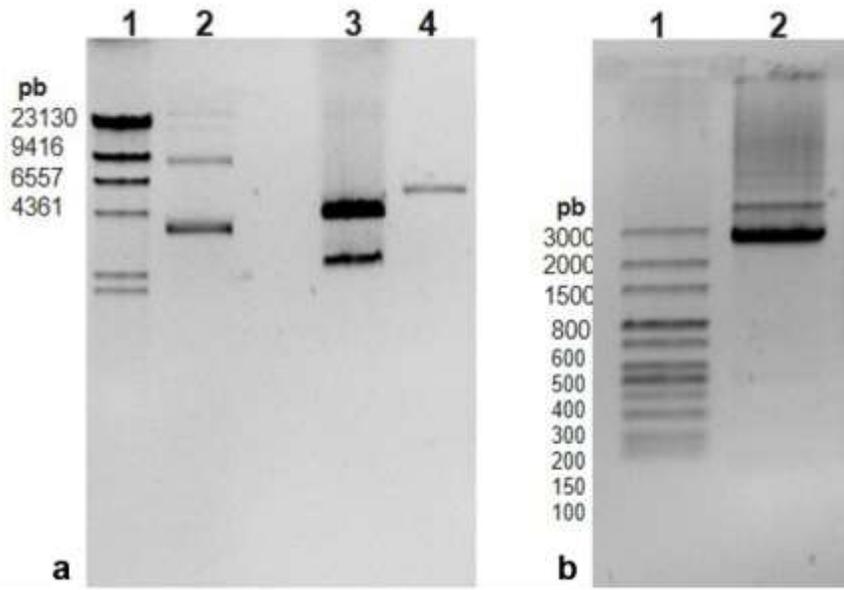


Figura 8. Caracterización de la construcción genética pIGF5 a) Digestión con enzimas de restricción. Carriles 1) MPM λ HindIII, 2) ADN no cortado, 3) ADN cortado con *EcoRI/XbaI*. 4) ADN linearizado con *SacI*. b) Amplificación del gen shLf que incluye una región del promotor y terminador AOX1. Carril 1) MPM 100 pb, 2) producto de amplificación de aproximadamente 2285 pb.

9.3 Transformación genética de *Pichia pastoris* con la construcción genética pIGF5

Después de la transformación de *P. pastoris* con el vector pIGF5, crecieron colonias posiblemente transformadas a partir de 48 h de incubación. Múltiples eventos de inserción de genes en un solo *locus* en una célula ocurren espontáneamente con una frecuencia baja pero detectable, entre el 1 y el 10% de todas las colonias contienen el gen de interés integrado en el genoma de *Pichia pastoris* (Cregg y Russell, 1998). Para confirmar la eficiente transformación e integración del gen de interés, se realizó un análisis de PCR. Seis clonas fueron aisladas y a partir de la extracción de ADN genómico se amplificó la región terminadora del gen AOX1 que incluye el gen de lactoferrina humana en una de las clonas previamente aisladas, en donde se obtuvo un producto de amplificación de 2885 pb aproximadamente. Esta

colonia se denominó C2-pIGF5-Pp (C2 corresponde al número de clona aislada; pIGF5 corresponde al plásmido que contiene la clona y Pp se refiere al organismo que la expresa, en este caso, la levadura *Pichia pastoris*) y se identificó como una clona positiva que contiene el gen que codifica para lactoferrina humana (Figura 9). Estos resultados también confirmaron que la clona C2-pIGF5-Pp incluye un gen que codifica para lactoferrina humana recombinante integrado en el locus AOX del genoma de *Pichia pastoris*.

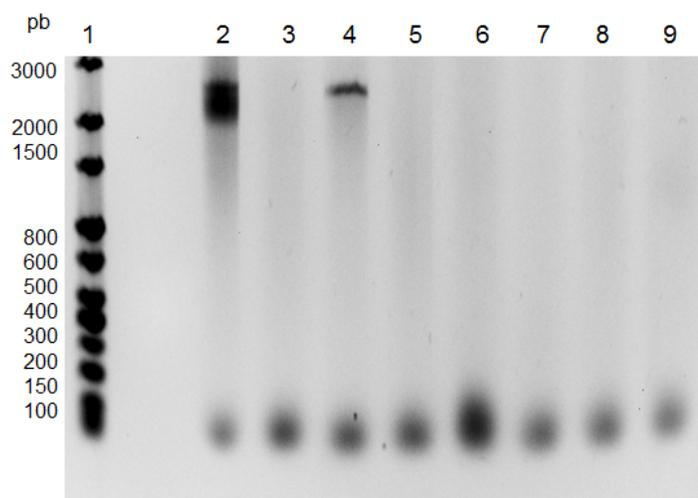


Figura 9. Caracterización del gen hLf en la levadura *P. pastoris*. Carril 1) Marcador de peso molecular; carril 2) control positivo de amplificación; carriles 3-8) ADN genómico de *P. pastoris* transformada; carril 9) ADN genómico de *P. pastoris* sin transformar. Se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 2885 pb, que coincide con el peso molecular esperado de una clona que contiene un gen que codifica para lactoferrina humana recombinante, integrado en el genoma de *Picha pastoris*.

9.4 Análisis de la expresión de Lactoferrina humana recombinante

Después de la transformación de *P. pastoris* con pIGF5 que contiene el gen hLf, se cultivó una sola colonia proveniente de la clona C2-pIGF5-Pp en medio de inducción de proteínas; después de 96 h de inducción con metanol, los extractos

proteicos totales se recuperaron a partir del medio de cultivo y se purificaron. Se comprobó que los extractos de medio de cultivo de la clona C2-pIGF5-Pp contenían una proteína de aproximadamente 80 kDa en un gel SDS-PAGE (12%), que coincide con el peso molecular reportado de la lactoferrina humana nativa (Wally y Buchanan, 2007) (Figura 10A); por otro lado, *P. pastoris* secreta niveles muy bajos de proteínas nativas al medio de cultivo (Mokdad-Gargouri *et al.*, 2012); en consecuencia, rhLf estuvo altamente representada en las proteínas totales secretadas, lo cual, facilitó su proceso de purificación, resultado que se confirmó cuando se utilizó un anticuerpo anti-6His para reconocer el extremo carboxilo-terminal de la proteína, flanqueado por una secuencia de seis histidinas, en un análisis de transferencia tipo Western blot, y se observó la presencia de una única banda homogénea equivalente al peso molecular de hLf (~ 80 kDa; Figura 10B).

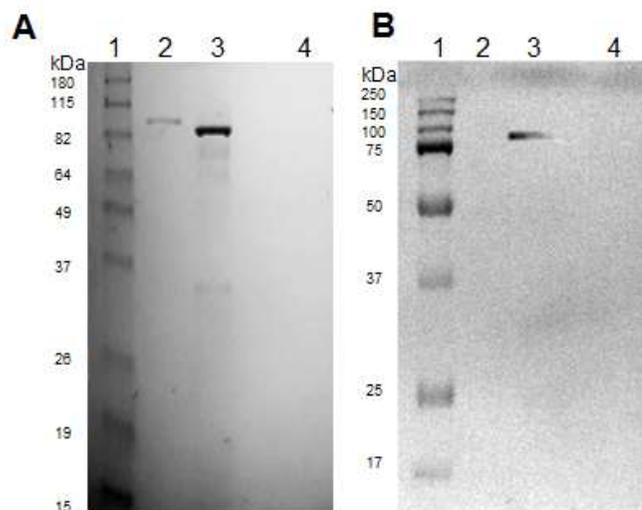


Figura 10. Purificación de lactoferrina humana recombinante. A) Tinción de proteínas con azul de Coomassie brillante; 1) marcador de peso molecular BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder (Invitrogen); 2) lactoferrina bovina comercial utilizada como control positivo; 3) lactoferrina humana producida en *Pichia pastoris*; 4) Extractos de proteína de *Pichia pastoris* no transformada (control negativo). B) Purificación de lactoferrina humana detectada con anticuerpo policlonal anti-6His; las proteínas fueron separadas electroforéticamente y transferidas a una membrana PVDF para su detección. 1) Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Estándar (Bio-Rad); 2) lactoferrina bovina comercial (no detectada); 3.) lactoferrina humana producida en *Pichia pastoris*; 4) extractos de proteína de *Pichia pastoris* no transformada (control negativo, no detectado).

En términos de rendimiento, se lograron obtener 6.15 mg/mL de rhLf a partir de 0.9 g de biomasa, cultivada en 100 mL de medio de cultivo. Las levaduras son organismos hospedadores adecuados para la expresión de proteínas heterólogas porque combinan un rápido crecimiento en densidades de células medianas a altas de bajo costo. Anteriormente se ha logrado expresar lactoferrina bovina recombinante con un rendimiento de 3.5 g/L; sin embargo, la expresión de esta proteína fue realizada de manera intracelular (Iglesias-Figueroa *et al.*, 2016), y en la cepa SMD1168, la cual, aun cuando tiene la ventaja de ser deficiente en proteasas, tiene un nivel de expresión menor que la cepa X33 utilizada en este trabajo (Cereghino y Cregg, 2000). Por otro lado, el uso de una cepa deficiente en proteasas para expresar rhLf no fue necesario debido a que está reportado que hLf es altamente resistente a la proteólisis, particularmente a la digestión con tripsina; se ha reportado que la lactoferrina de origen humano puede llegar a ser hasta 100 veces más resistente a la proteólisis en comparación con la lactoferrina de origen bovino (O'riordan *et al.*, 2014). Una de las razones posibles por las que hLf puede ser más resistente a la proteólisis es debido a sus sitios de glicosilación presentes (van Veen *et al.*, 2004). Otros autores han reportado recientemente la expresión de lactoferrina de origen humano en esta levadura; sin embargo, en dicho trabajo no se reportó la concentración de lactoferrina obtenida (Chahardooli *et al.*, 2016). Por otro lado, en esta levadura se han producido proteínas nativas de bacterias, hongos, invertebrados, vertebrados no humanos, humanos, plantas y virus; al año 2005, los niveles de expresión de proteínas de origen humano oscilaron entre 4.0 pmol/mg de proteína total hasta 180 mg/L de cultivo (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). También, el uso de *Pichia pastoris*

puede garantizar la producción de proteínas libres de endotoxinas (Damasceno *et al.*, 2012); los altos niveles de expresión de lactoferrina humana recombinante purificada y libre de endotoxinas (> 0.25 EU/mL) obtenidos en este trabajo, fueron adecuadas para realizar los experimentos posteriores.

9.5 Determinación del perfil de glicosilación de Lactoferrina humana recombinante

El cromatograma obtenido de la fragmentación de glicanos provenientes de lactoferrina humana recombinante indicó la presencia de estructuras de alta manosa que exhiben iones $[M + Na]^+$ a 259.17, 477.42, 681.50 y 885.67 m/z. Estas estructuras son consistentes con las estructuras Hex₁ (hexosa), Hex₂, Hex₃ y Hex₄, respectivamente reportadas en la base de datos del software GlycoWorkBench 2.0, el cuál fue utilizado para la obtención de dichas estructuras (Figura 11). Se analizaron un total de ocho fragmentaciones a partir del primer espectro de 885.67 m/z y se

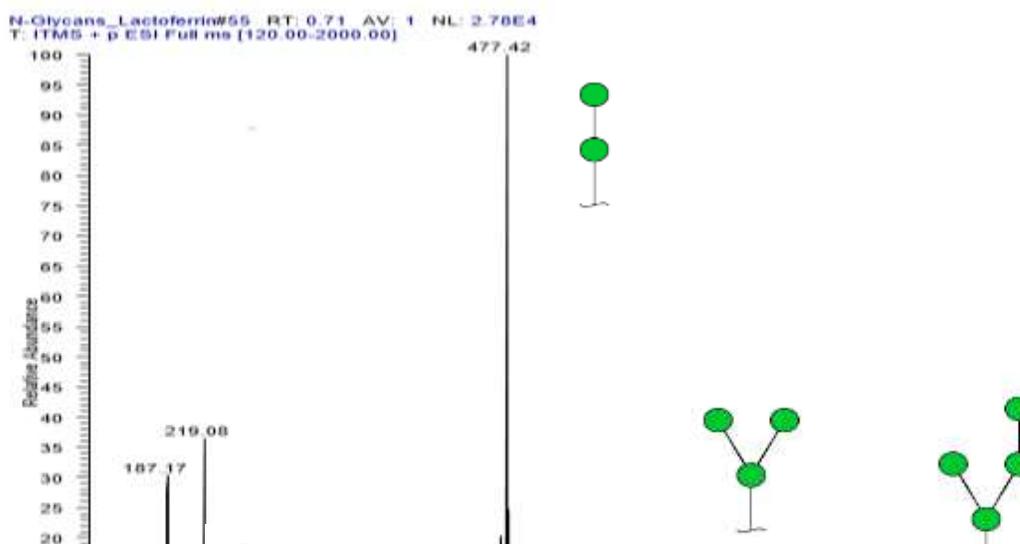


Figura 11. Glicanos liberados de lactoferrina humana recombinante. La fragmentación de iones demostró que la conformación glicosídica de lactoferrina humana recombinante consiste en estructuras de alta manosa a partir de un pentasacárido común en levaduras. Cada círculo verde corresponde a una molécula de manosa.

confirmó que el perfil de lactoferrina humana recombinante consiste en estructuras de alta manosa.

De acuerdo con reportes anteriores, el perfil de glicosilación que añade la cepa *Pichia pastoris* X33 a proteínas destinadas a la vía secretora, consiste únicamente en estructuras de alta manosa (Hamilton y Zha, 2015), que incluso pueden llegar a añadir hasta un 39% del peso total de la proteína (Blanchard *et al.*, 2008). A diferencia de la lactoferrina humana recombinante expresada en este trabajo, de manera natural, la lactoferrina humana presenta un perfil de glicosilación bastante complejo; sus potenciales sitios de *N*-glicosilación (Asn138, Asn479 y Asn624) están conformados por un núcleo común formado a partir de dos grupos *N*-acetilglucosamina y tres grupos manosa; a partir de éstos, sus antenas secundarias pueden ramificarse e incluir grupos manosa, galactosa, acetilglucosamina, fucosa y ácido siálico (Le Parc *et al.*, 2017; Legrand *et al.*, 2006); sin embargo, la función específica de cada uno de estos grupos de glicanos no está completamente estudiado (Karav *et al.*, 2017). Aun cuando el perfil de glicosilación de rhLf expresada en *Pichia pastoris* difiere considerablemente de su contraparte nativa, la funcionalidad que esta proteína presentó, por efecto de dicho perfil de glicosilación, resultó ser de gran importancia, resultado que será discutido más adelante en este trabajo. Por otro lado, una característica importante del perfil de glicosilación de lactoferrina nativa es que, dependiendo de la etapa de lactación, este perfil puede tener diferentes glicoformas; en ese sentido, se han observado cambios en la glicosilación tanto de lactoferrina bovina como de lactoferrina humana, ambas de origen nativo a lo largo del periodo de lactancia (Barboza *et al.*, 2012); en las primeras etapas de lactancia, existe mayor

cantidad de ácido siálico en la lactoferrina (O'riordan *et al.*, 2014). A su vez estos hallazgos nos sugieren que la funcionalidad de lactoferrina nativa dependiente de sus carbohidratos puede variar en función de la etapa de lactancia; en contraste, el uso de *Pichia pastoris* X33 para la expresión de rhLf, donde los factores de crecimiento, temperatura y tiempo fueron mayormente controlados, permitió la obtención de lactoferrina humana recombinante con un perfil de glicosilación homogéneo en diferentes lotes de la producción.

9.6 Efecto anticancerígeno de Lactoferrina humana recombinante

9.6.1 Efecto citotóxico de lactoferrina humana en células MDA-MB-231, MDA-MB-231-LM2-4 y MCF-10A

La lactoferrina humana recombinante utilizada en el presente trabajo mostró tener una alta especificidad contra células cancerígenas de cáncer de seno y su variante metastásica de cáncer de pulmón, a diferencia de células no cancerígenas derivadas de epitelio glandular mamario, donde de acuerdo con los porcentajes de inhibición obtenidos (2% de muerte celular), su especificidad fue sumamente baja. Los efectos citotóxicos de rhLf se cuantificaron usando un ensayo DNS (Tinción nuclear diferencial). En la Figura 12A se observa la gráfica correspondiente a los porcentajes de inhibición, y cinco imágenes representativas de células vivas y muertas (12B, C, D, E, F) utilizadas para cuantificar el porcentaje de citotoxicidad mediada por lactoferrina humana en células MDA-MB-231 derivadas de cáncer de seno. Células no tratadas fueron utilizadas como control negativo. Las células tratadas con H₂O₂ 2 mM (control positivo) que da como resultado un aumento significativo de células muertas/positivas para PI, muestran un color magenta debido a la co-localización de las señales azules (Hoechst) y rojas (PI). Las células tratadas con rhLf lograron inhibir en 24 h un 33%

de la población celular, estos datos exhiben un patrón muy similar al efecto citotóxico del peróxido de hidrógeno. Cuando las células fueron tratadas con rhLf libre de carbohidratos, no se logró un efecto citotóxico (Figura 11A, C), por lo cual, fue indispensable el uso de rhLf en su glicofoma completa, es decir, sin liberarla de los glicanos que la conforman, para poder generar un efecto citotóxico, este resultado se obtuvo en las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-231-LM; se logró inhibir el crecimiento de las células MDA-MB-231-LM, la cual es una línea metastásica de pulmón derivada de cáncer de seno. Para esta línea celular se logró la inhibición de un 25% de la población celular en 24 h (Figura 13). Finalmente, la lactoferrina fue probada en la línea celular MCF10A, una línea celular epitelial no cancerígena, en donde los porcentajes de citotoxicidad mediada por lactoferrina no lograron alcanzar más del 2% (Figura 14). Estos datos indican la alta selectividad que tiene rhLf sobre células cancerígenas, y no sobre células normales, lo cual la convierte en un potencial tratamiento anti cáncer que no genera daño sobre el resto de las células sanas, a diferencia de los tratamientos actuales más usados para quimioterapias, provocan no solo daño en el ADN de células cancerígenas, si no que generan daños colaterales significativos en tejidos normales (O'Connor, 2015); el paclitaxel, a pesar de ser una droga utilizada con gran éxito para provocar muerte celular en tumores, como consecuencia del arresto mitótico, requiere altas concentraciones para provocar este daño (Zasadil *et al.*, 2014), y a diferencia de rhLf utilizada en este trabajo, es un compuesto que causa un impactante daño celular en células no cancerígenas. De la misma manera, la citotoxicidad provocada por un gradiente de concentración de rhLf purificada en las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-231 LM2-4 y MCF-10A se cuantificó después de 24 h de incubación. En esta serie de experimentos, solo se

incluyeron células derivadas de donadoras para eludir las diferencias relacionadas con el género (Nunes *et al.*, 2014). Para eliminar el fondo de muerte celular, inherente al cultivo celular y las manipulaciones comunes, los datos se normalizaron restando de cada valor experimental el porcentaje de muerte celular obtenido de células tratadas con H₂O (control del disolvente), seguido del cálculo del CC₅₀ por interpolación lineal (<https://www.johndcook.com/interpolator.html>). Los resultados indican que el CC₅₀ de rhLf en células MDA-MB231 y MDA-MB-231-LM2-4 es de 109.46 y 94 µg/ mL, respectivamente. En el caso de las células MCF-10A, cuando se probó una concentración elevada de rhLf (50 µg/ mL), el porcentaje de células muertas fue de 2.05%, por lo tanto, se obtuvo el CC₅₀ de rhLf en células no cancerígenas, revelando que se requieren 1279.4 µg/ mL para que la lactoferrina humana mate al 50% de la población celular no cancerígena; rhLf reveló ser similarmente efectiva en las células MDA-MB-231 no metastásicas y MDA-MB-231-LM2-4 metastásicas, con un índice citotóxico de alta selectividad (11.68 y 13.99 en células MDA-MB-231 y MDA-MB-231-LM2-4, respectivamente) (Tabla 1). Una razón crucial por la cual el cáncer es altamente difícil de tratar es porque las células cancerosas son células propias pero diferentes de las células normales, ya que proliferan fuera de control. Por lo tanto, la estrategia de utilizar células cancerosas y no cancerosas del mismo tejido y origen de género, y comparar la citotoxicidad de un compuesto experimental nuevo en ambos, es importante para determinar con precisión cercana la citotoxicidad selectiva de un medicamento mediante el cálculo de su SCI. Los valores de SCI de 1 o menos son indicativos de la falta de citotoxicidad selectiva de un compuesto para destruir una célula cancerosa, mientras que los valores de SCI mayores que 1 son indicativos de toxicidad selectiva de un compuesto

frente a células cancerosas en comparación con células no cancerosas; se requieren altos valores de SCI para cualquier medicamento contra el cáncer potencial (Robles-Escajeda *et al.*, 2016); otros autores han reportado que Lf posee citotoxicidad selectiva en células de cáncer de seno, en comparación con las células MCF-10A; sin embargo, el SCI no se obtuvo (Zhang *et al.*, 2014a). Por otro lado, otros autores también reportaron que Lf tiene citotoxicidad selectiva a través de la apoptosis de las células de cáncer de seno, sin embargo, el SCI tampoco se calculó (Pereira *et al.*, 2016). En este estudio, rhLf exhibió citotoxicidad selectiva en células MDA-MB-231 no metastásicas y metastásicas (11.68 y 13.99, respectivamente). Respecto a su SCI, rhLf es un fármaco atractivo contra el cáncer de seno.

Tabla 1. Concentración citotóxica de rhLf necesaria para matar al 50% de la población celular (CC₅₀) para rhLf en un panel de líneas celulares derivadas de cáncer de seno humano y índice de citotoxicidad selectiva (SCI).

Línea celular	CC₅₀ (µg/ mL)	SCI
MDA-MB-231	109.46	11.68
MDA-MB-231 LM2-4	91.4	13.99
MCF-10^a	1279.48	

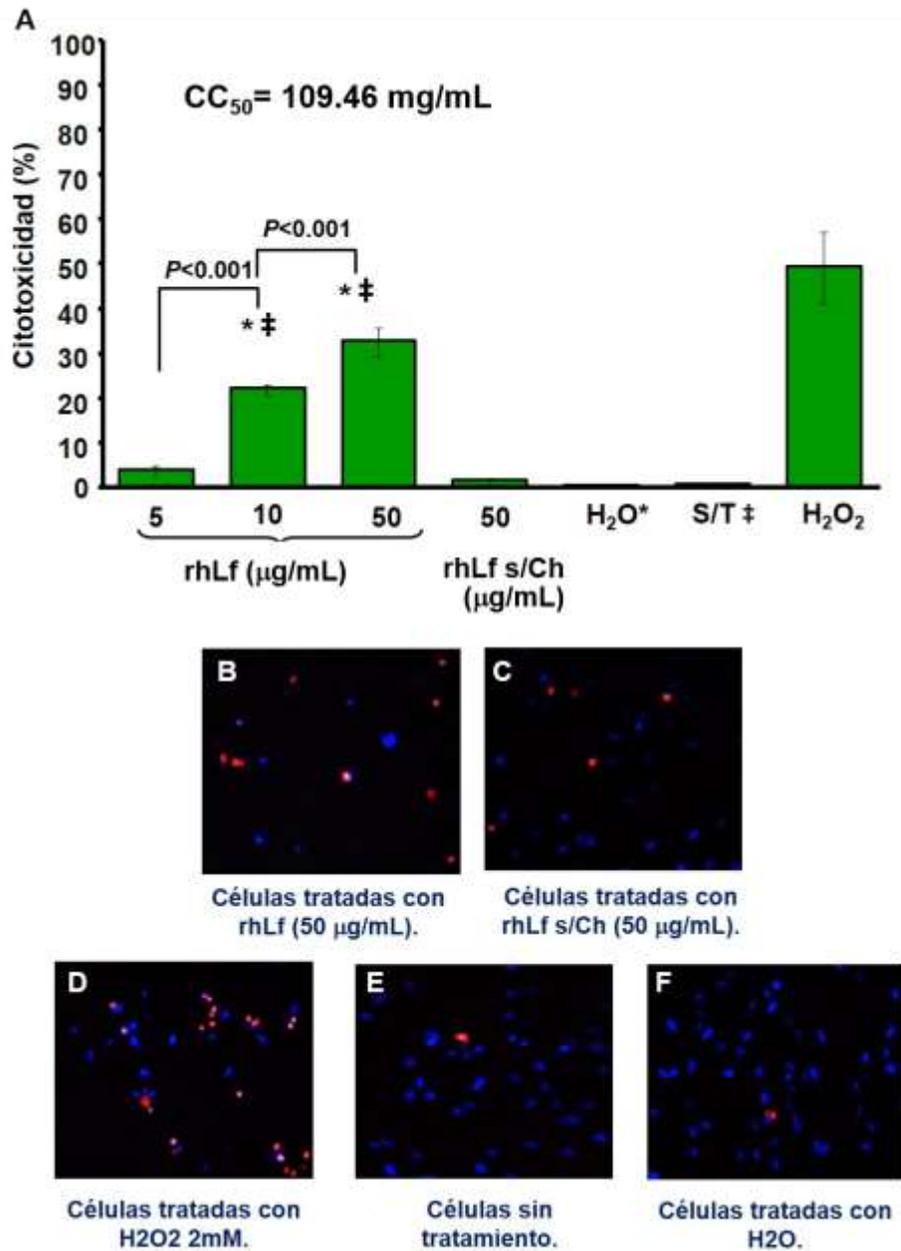


Figura 12. Citotoxicidad de lactoferrina humana recombinante sobre células MDA-MB-231. A) Las células se expusieron a un gradiente de concentración de lactoferrina humana y se incubaron durante 24 h. Ensayo de tinción nuclear diferencial. Se utilizó el sistema “Bioimagen System” para determinar porcentajes de citotoxicidad (eje de las y). Cuando las muestras experimentales (B) se compararon con rhLf sin glicanos (S/Ch) (C), solvente, 5% v/v H₂O (F) (*), y células control no tratadas (E) (S/T) (‡), los valores P fueron de <0.0001 y <0.0001, respectivamente. Las células tratadas con 2 mM de H₂O₂ (D), se usaron como control positivo para la citotoxicidad. Cada punto experimental representa el promedio de cuatro réplicas y las barras de error desviación estándar correspondiente. Una porción de imágenes representativas de células vivas, fusionando el Hoechst y los canales de yoduro de propidio (PI), utilizados para obtener la actividad citotóxica se representan. Los núcleos que muestran una señal azul se consideran células vivas, mientras que los núcleos exhiben color magenta, como consecuencia de la señal de co-localización azul y roja, se consideran células muertas.

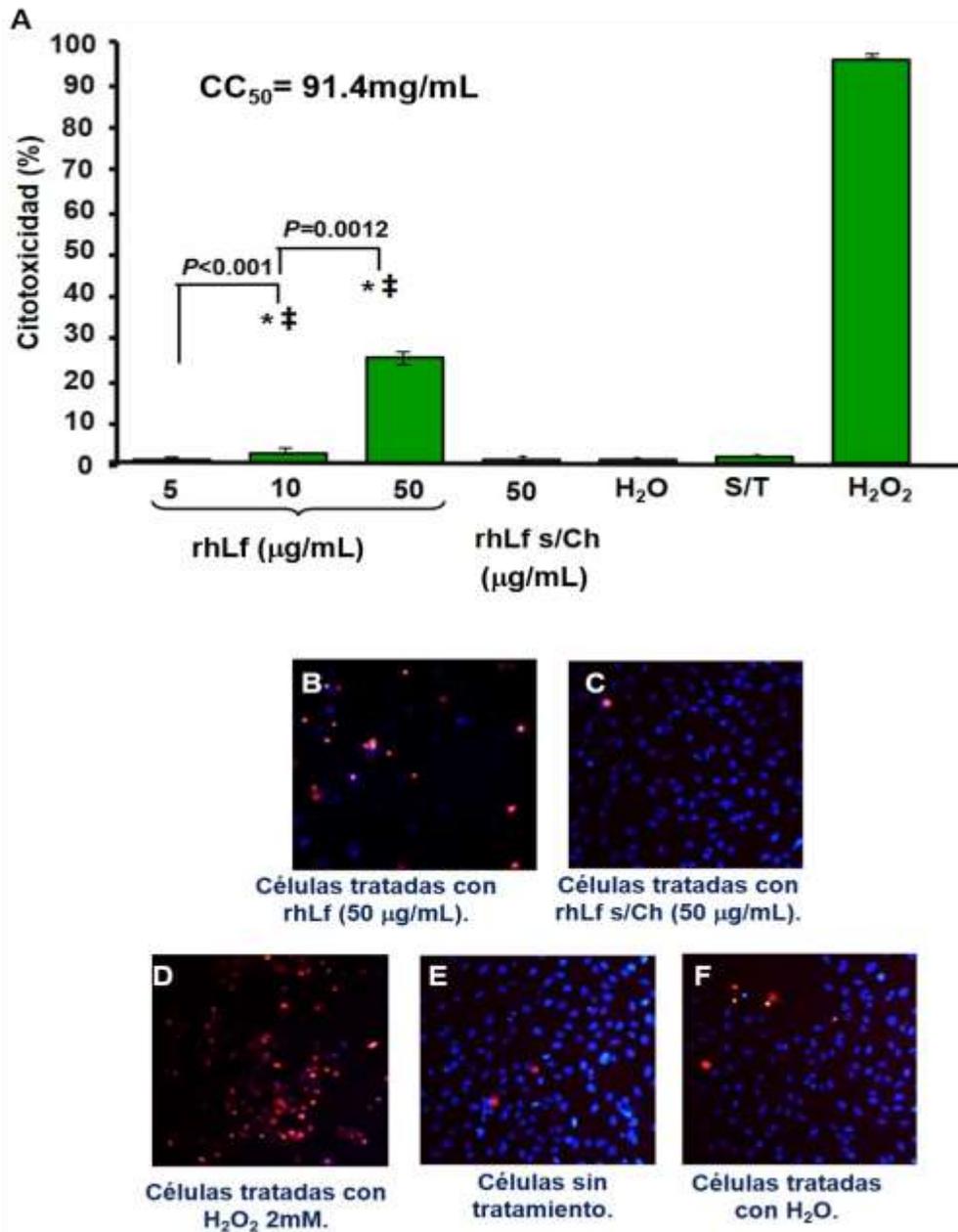


Figura 13. Citotoxicidad de lactoferrina humana recombinante sobre células MDA-MB-231-LM2-4. A) Las células se expusieron a un gradiente de concentración de lactoferrina humana y se incubaron durante 24 h Ensayo de tinción nuclear diferencial. Se utilizó el sistema “Bioimagen System” para determinar porcentajes de citotoxicidad (eje de las y). Cuando las muestras experimentales (B) se compararon con solvente, 5% v/v H₂O (F), (*) y células control no tratadas (E) (‡), los valores P fueron de <0.0001 y <0.0001, respectivamente. Las células tratadas con 2 mM de H₂O₂ (F) se usaron como control positivo para la citotoxicidad. Cada punto experimental representa el promedio de cuatro réplicas y las barras de error desviación estándar correspondiente. Una porción de imágenes representativas de células vivas, fusionando el Hoechst y los canales de yoduro de propidio (PI), utilizados para obtener la actividad citotóxica se representan. Los núcleos que muestran una señal azul se consideran células vivas, mientras que los núcleos exhiben color magenta, como consecuencia de la señal de co-localización azul y roja, se consideran células muertas.

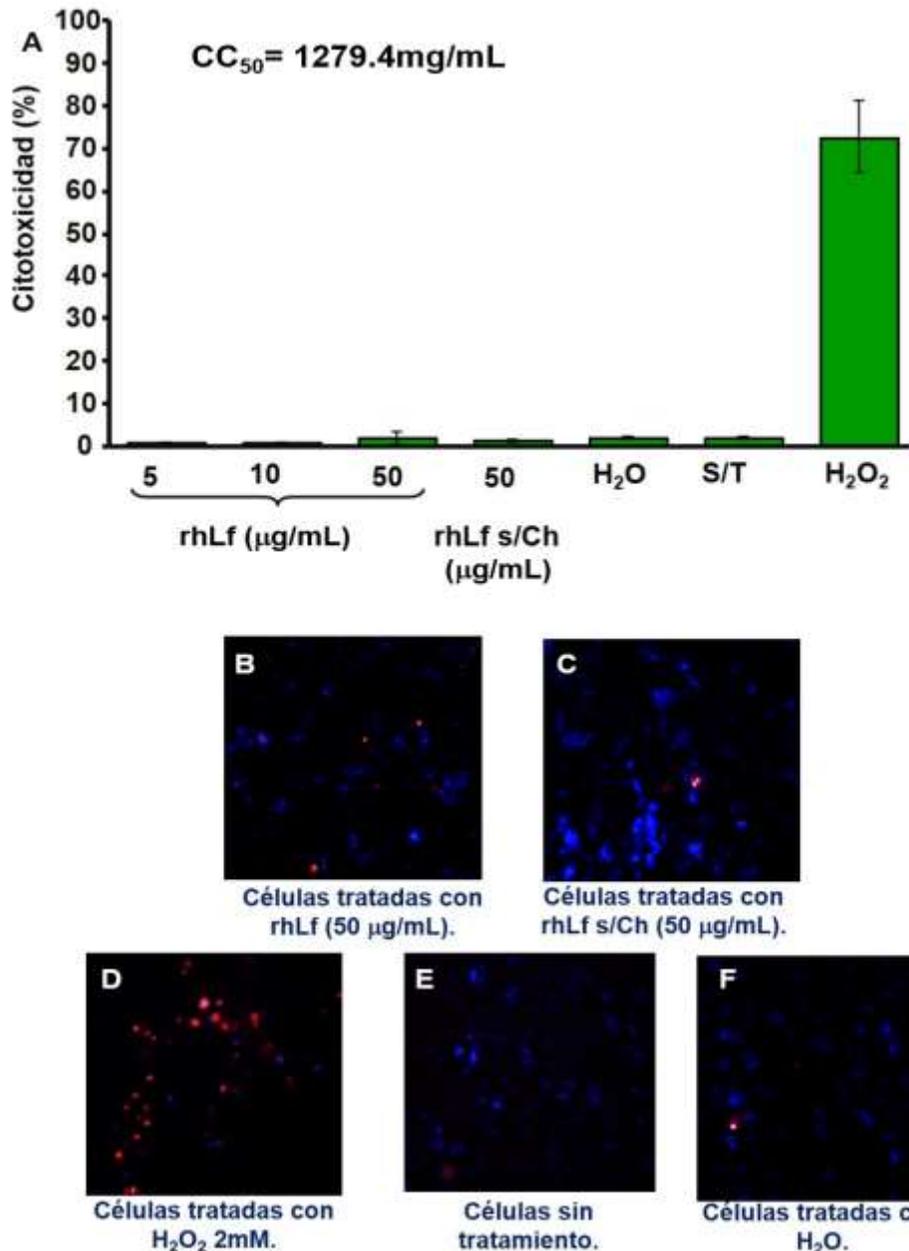


Figura 14. Citotoxicidad de lactoferrina humana recombinante sobre células MCF-10A. A) Las células se expusieron a un gradiente de concentración de lactoferrina humana y se incubaron durante 24 h Ensayo de tinción nuclear diferencial. Se utilizó el sistema “Bioimagen System” para determinar porcentajes de citotoxicidad (eje de las y). Cuando las muestras experimentales (B) se compararon con solvente, 5% v/v H₂O (F), (*) y células control no tratadas (E) (‡), los valores P fueron de <0.0001 y <0.0001, respectivamente. Las células tratadas con 2 mM de H₂O₂ (D) se usaron como control positivo para la citotoxicidad. Cada punto experimental representa el promedio de cuatro réplicas y las barras de error desviación estándar correspondiente. Una porción de imágenes representativas de células vivas, fusionando el Hoechst y los canales de yoduro de propidio (PI), utilizados para obtener la actividad citotóxica se representan. Los núcleos que muestran una señal azul se consideran células vivas, mientras que los núcleos exhiben color magenta, como consecuencia de la señal de co-localización azul y roja, se consideran células muertas.

9.6.2 Papel de los glicanos en el efecto anticancerígeno de lactoferrina humana recombinante

Como se describió anteriormente en este trabajo, la lactoferrina humana recombinante presentó un efecto citotóxico contra las líneas celulares cancerígenas MDA-MB-231 y MDA-MB-231-LM2-4. Dicho efecto fue dependiente del estado de glicosilación de rhLf; cuando se probaron diferentes concentraciones de rhLf libre de glicanos (5, 10 y 50 µg/mL), no se observó muerte celular en comparación al uso de rhLf completa (Figuras 11 y 12). Estos hallazgos confirman la teoría de que ciertas funciones de la lactoferrina dependen del estado de glicosilación que presenta dicha proteína (Karav *et al.*, 2017; Zimecki *et al.*, 2014). Anteriormente se reportó que la lactoferrina desencadena varias vías de señalización de la respuesta inmunitaria únicamente cuando esta proteína se encuentra completamente glicosilada (Zimecki *et al.*, 2014); también se ha reportado la importancia de su nivel de glicosilación para combatir algunos patógenos como *Salmonella enterica* spp. y *Listeria monocytogenes*, ya que la mayor actividad antibacteriana frente a estos patógenos es generada por lactoferrina en su glicoforma completa (Barboza *et al.*, 2012). No obstante, poco se conoce sobre el papel de los glicanos en el efecto anticancerígeno de la lactoferrina. En ese sentido, se han encontrado diversos hallazgos sobre el efecto anticancerígeno de lactoferrina frente a diferentes tipos de cáncer, incluyendo cáncer de seno (Gopal y Das, 2016), cáncer de colon (Jiang y Lönnnerdal, 2016), carcinoma de células escamosas (Chea *et al.*, 2018) y leucemia (Abu-Serie y El-Fakharany, 2017). A pesar de la evidencia de estos hallazgos, la base molecular del mecanismo de acción anticancerígena de la lactoferrina no fue descrita; no

obstante, diversos estudios anticancerígenos señalan la relación que existe entre las funciones de los *N*-glicanos con respecto a la señalización y adhesión celular en el cáncer. Los cambios en las estructuras de oligosacáridos están asociados con muchos eventos fisiológicos y patológicos, que incluyen el crecimiento celular, la migración, la diferenciación, la invasión de tumores, las interacciones huésped-patógeno, el tráfico celular y la señalización transmembrana (von Roemeling *et al.*, 2017); por otro lado, receptores como el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), integrinas y el receptor del factor de crecimiento transformante (TGFR), presentes también en células cancerígenas, pueden ser afectados por la presencia de oligosacáridos modificados, ya que estos últimos tienen la habilidad de interferir en interacciones carbohidrato-carbohidrato y carbohidrato-proteína, dando como resultado la alteración en diferentes eventos fisiológicos y/o patológicos, incluyendo procesos tumorales (Zhao *et al.*, 2008), por lo que es de esperarse que la presencia de glicoformas tipo manosa de rhLf frente a células cancerígenas desencadenara diferentes procesos de señalización que dieran paso a la activación de la muerte celular. Incluso, las glicoformas de tipo manosa han sido utilizadas como dianas celulares acopladas a fármacos anticancerígenos encapsulados como una posible terapia dirigida contra células cancerígenas (Pinho y Reis, 2015; Yin *et al.*, 2015).

9.6.3 Inducción de apoptosis en células MDA-MB-231 mediada por lactoferrina humana recombinante

Actualmente, dirigir la apoptosis para el tratamiento del cáncer se ha convertido en una estrategia cada vez más atractiva, con agentes en desarrollo para desencadenar la apoptosis extrínseca exclusiva para células cancerígenas

(Fox y MacFarlane, 2016). Nicolau y colaboradores, en 2014, mostraron que bLf no pudo provocar cambios morfológicos asociados con la apoptosis en células MDA-MB-231 (Zhang *et al.*, 2014b); no obstante, en el presente trabajo, rhLf mostró infligir cambios morfológicos celulares indicativos de un proceso apoptótico. Las células de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 que crecieron en placas de 96 pozos se trataron con 50 µg/ mL rhLf durante 24 h, seguido del ensayo de tinción nuclear diferencial (DNS) de células vivas Hoechst y PI. Luego, para monitorear los cambios morfológicos celulares, las imágenes se capturaron en un modo de células vivas a través de un microscopio confocal. Los resultados indicaron que rhLf inflige muerte celular, provocando cambios morfológicos asociados con la apoptosis en células MDA-MB-231, tales como contracción celular, formación de ampollas y condensación nuclear (Figura 15). Además, fue notable la presencia de una señal fluorescente rojiza dentro de las ampollas, muy probablemente debido a la presencia de pequeños fragmentos de ADN liberados de los núcleos al citoplasma y formando complejos con PI, debido a que el PI tiene la capacidad de unirse a las células con membrana plasmática comprometida, especificando el número total de células muertas. Esta observación sugiere que lactoferrina humana también puede causar la fragmentación de ADN inducida por apoptosis. Por lo tanto, con base a los cambios morfológicos celulares, se postula que la lactoferrina está utilizando la vía de apoptosis, como un mecanismo para infligir su citotoxicidad.

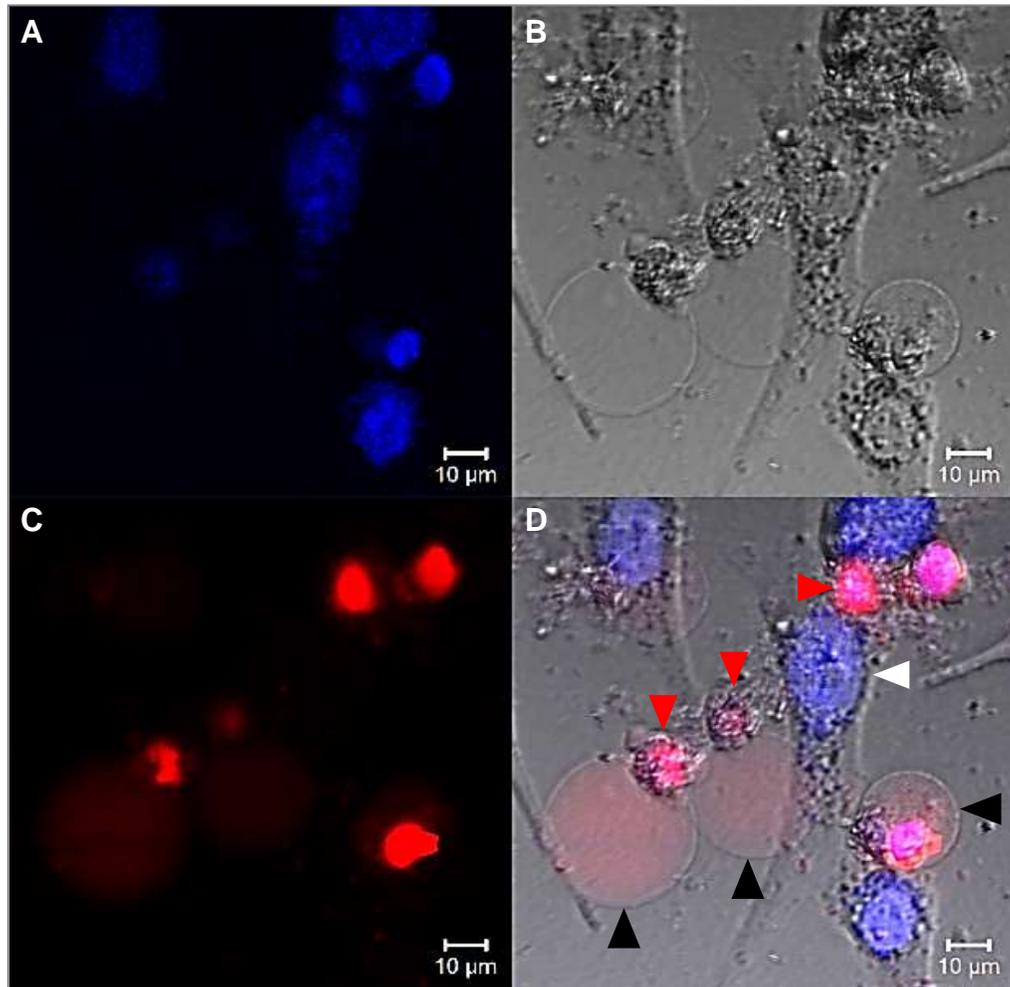


Figura 15. Cambios morfológicos sugestivos de apoptosis en células MB-231 tratadas con rhLf. Imágenes representativas del microscopio confocal de células vivas, capturadas utilizando el canal Hoechst (A), DIC (B), canal de yoduro de propidio (C) y superposición de las tres imágenes anteriores (D), Las flechas indican la formación de ampollas (negro), contracción celular y condensación de cromatina (rojo; células muertas positivas a PI) y sin condensación núcleo (blanco; célula viva negativa PI).

El probable mecanismo de acción apoptótico de lactoferrina humana se examinó con más detalle utilizando el ensayo de anexina V-FITC/PI y citometría de flujo reportado en la literatura (Varela-Ramirez *et al.*, 2011). Un evento bioquímico en células que experimentan apoptosis es la externalización de fosfatidilserina (PS) a la valva externa de la membrana plasmática; un sello distintivo e indicador temprano de la apoptosis (Leventis y Grinstein, 2010). En la homeostasis, la distribución de los fosfolípidos es asimétrica en la membrana plasmática de las células eucariotas. Esta distribución asimétrica de fosfolípidos tiene funciones importantes *in vivo* (Fadeel y Xue, 2009). Normalmente, la fosfatidilserina (PS) se limita predominantemente a la lámina citoplásmica de la membrana plasmática, y la interrupción de esta asimetría, lleva a la externalización de la PS a la superficie de la célula (Leventis y Grinstein, 2010). Este evento se detecta fácilmente mediante el uso de una proteína anexina V (~36 kDa), que posee una alta afinidad por PS (Lema *et al.*, 2011). Además, cuando se utiliza el método de tinción con anexina V-FITC y PI y la citometría de flujo, es posible discernir si un compuesto experimental citotóxico está utilizando la vía de apoptosis o necrosis para infligir su muerte celular (Varela-Ramirez *et al.*, 2011). Estudios previos han demostrado que al utilizar líneas celulares de cáncer de mama y bLf, no se detectaron células apoptóticas con PS externalizada después de un período de tratamiento de 72 h (Zhang *et al.*, 2014b). Un estudio contrario mostró que bLf provocó la externalización de la PS en las líneas celulares Hs578T y MDA-MB-231 de cáncer de seno después de 48 h de tratamiento (Pereira *et al.*, 2016). Más recientemente, se informó que bLf activó la apoptosis a través de la externalización de la PS en células de cáncer de próstata PC-3 y osteosarcoma MG-63 después de 48 h y 72 h de incubación, respectivamente (Guedes *et al.*, 2018). En el presente trabajo,

rhLf provocó una externalización significativa de PS ($P=0.004$) en células MDA-MB-231 triple negativas después de 24 de exposición. Este resultado sugiere que rhLf expresado en *P. pastoris* puede usar la vía de apoptosis para infligir su citotoxicidad.

Las células MDA-MB-231 se trataron con rhLf (100 µg/ mL) durante 24 h y los resultados especificaron que las células tratadas con rhLf mostraban preferentemente células apoptóticas (28.03%), en comparación con la subpoblación necrótica (0.85%). Además, después de los porcentajes de apoptosis de las células tratadas con rhLf, se compararon con las células tratadas con H₂O y las no tratadas: el análisis de varianza una significancia de $P= 0.004123$ y $P= 0.002712$ respectivamente, consistentemente en ambas circunstancias; estos valores apoyan que la lactoferrina humana recombinante está utilizando la vía apoptótica para infligir su citotoxicidad, como se evidencia por la de externalización de PS. Las células tratadas con control de disolvente (H₂O) y las células no tratadas no mostraron un aumento sustancial tanto en los porcentajes de apoptosis como de necrosis. Como era de esperar, las células tratadas con H₂O₂ (2 mM) mostraron un alto porcentaje de células de apoptosis (53.6%) (Figura 16).

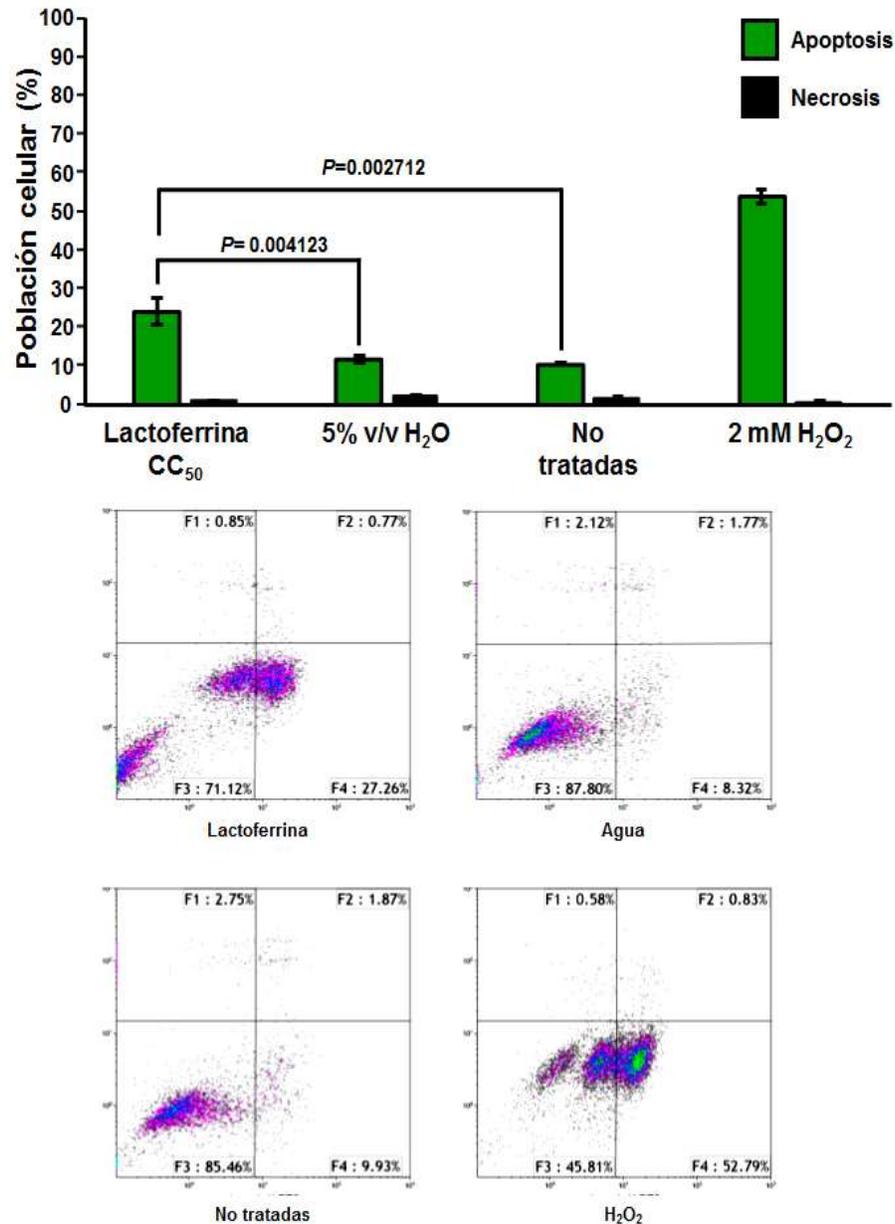


Figura 16. Externalización de fosfatidilserina en las células MDA-MB-231 tratadas con rhLf. El mecanismo de rhLf para infligir muerte celular, apoptosis o necrosis, se examinó después de que las células se tiñeron doblemente con anexina V-FITC y PI, luego, se monitorizaron mediante citometría de flujo. El porcentaje total de poblaciones de células apoptóticas (eje y) se expresa como la suma de las etapas temprana y tardía de la apoptosis (barras verdes), mientras que las células teñidas sólo con PI se consideraron como poblaciones de células necróticas (también en el eje y; barras negras;). Cada barra representa el promedio de cuatro mediciones independientes, y el error bloquea su desviación estándar correspondiente. Se incluyen diagramas de puntos representativos de citometría de flujo de dos parámetros usados para adquirir los porcentajes de subpoblaciones apoptóticas y necróticas. Se incluyeron los siguientes controles: células tratadas con 5% v/v de H₂O, como control de disolvente; células no tratadas como controles negativos; y células expuestas a 2 mM de H₂O₂, como un control positivo para la citotoxicidad; el análisis que usa la prueba t Student pareada de dos colas se incluye como valores de P. Para fines de adquisición y análisis de datos, se utilizó el software de citometría de flujo Kaluza (Beckman Coulter).

9.6.4 Arresto del ciclo celular en células MDA-MB-231 mediado por lactoferrina humana recombinante

Para investigar con más detalle el mecanismo utilizado por rhLf para inhibir la proliferación celular y/o citotoxicidad, se analizó el perfil del ciclo celular. El análisis del ciclo celular se centró en las diferencias en el contenido de ADN celular basado en un medio de aislamiento nuclear (NIM) - 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) solución (NIM-DAPI; Beckman Coulter) y la grabación de su intensidad de señal de fluorescencia a través de un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter). La cantidad de señal de fluorescencia de emisión DAPI es directamente proporcional al contenido de ADN celular. Las células MDA-MB-231 se trataron durante 72 h con dos concentraciones de lactoferrina humana; 6.76 µg/ mL (CC₁₀) y 9.48 µg/ mL (CC₂₀), respectivamente. Los resultados indicaron que el porcentaje de la subpoblación Sub-G0/G1 de las células tratadas con 6.76 µg/ mL de rhLf era similar a la del disolvente (H₂O) y las células de control no tratadas. Por el contrario, las células expuestas a 9.48 µg/ mL de rhLf mostraron un mayor porcentaje de la subpoblación Sub-G0/G1 y se consideraron significativas en comparación con las células de control no tratadas y con disolvente, con valores $P < 0.001$ y $P < 0.004$ respectivamente. Esta subpoblación sub-G0/G1 (hipodiploide) es un indicador de la fragmentación del ADN inducida por la apoptosis (Robles-Escajeda et al., 2013;). Además, estos resultados apoyan la suposición hecha durante el análisis de cambios morfológicos a través de experimentos de microscopía confocal, lo que indica que la señal fluorescente rojiza dentro de las ampollas probablemente se debió a la presencia de pequeños complejos de fragmentos de ADN-PI. Los porcentajes en la fase G0/G1 (diploide; 2N) obtenidos a partir de 9.48 µg/ mL de células tratadas con lactoferrina humana

(45.98%) se redujeron significativamente ($P < 0.01$), en comparación con los tratados con H₂O (56.97%) y células no tratadas (56.39%) (Figura 17). Se encontraron diferencias significativas en las subpoblaciones de la fase S (hiperdiploide) de 9.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de células tratadas con lactoferrina humana, en comparación con las células expuestas a 6.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lactoferrina humana ($P < 0.004$), así como a los controles de solvente y sin tratar ($P < 0.01$, respectivamente). Notablemente, este incremento en el patrón de subpoblación de fase S provocado por rhLf, se asemejó al perfil de detención inducido por el inhibidor de la síntesis de polipéptidos, G418. Los porcentajes de células con un contenido de G2/M de ADN (tetraploide; 4N) expuestos a rhLf, solvente y células de control no tratadas, mostraron valores similares (de 21.83 a 23.5%), y, por lo tanto, se obtuvieron diferencias no significativas. Con base en esta estrategia de análisis, los resultados indicaron que rhLf es capaz de provocar la fragmentación del ADN inducida por la apoptosis, y también, para detener las células en la fase S, modulando la progresión del ciclo celular. Además, ambos eventos ocurrieron en una modalidad pronunciada dependiente de la dosis. Un evento bioquímico tardío en las células que experimentan apoptosis es su fragmentación del ADN, que es provocada principalmente por una desoxirribonucleasa endógena activada por caspasa-3 (CAD), una fase de ejecución de la apoptosis (Sakahira *et al.*, 1998). Este evento bioquímico provoca la degradación internucleosomal del ADN cromosómico, generando pequeños fragmentos de ADN que se difunden fuera del núcleo, originando una subpoblación celular con contenido de ADN hipodiploide fácilmente detectable a través del citómetro de flujo durante el análisis del ciclo celular. Esta subpoblación sub-G0/G1 (hipodiploide) aparece en el lado izquierdo de los histogramas citométricos de flujo del parámetro único (DAPI; detector de FL-9) y

se interpreta como células que experimentan una fragmentación del ADN inducida por apoptosis (Dolbeare *et al.*, 1983; Robles-Escajeda *et al.*, 2013). En 2014, Nicolau y colaboradores, reportaron que bLf causa arresto del ciclo celular en varias líneas celulares de cáncer de seno, sin embargo, esta detención se encontraba en la fase G2 para las células MDA-MB-231 (Zhang *et al.*, 2014b), en ese estudio, no se reportó fraccionamiento de células en la fase G0/G1. Además, en las células cancerosas de cabeza y cuello, rhLf detuvo el ciclo celular en el punto de control G0/G1 (Xiao *et al.*, 2004). Además, rhLf ocasiona una detención del crecimiento en la transición de G1 a S en células MDA-MB-231 (Damiens *et al.*, 1999).

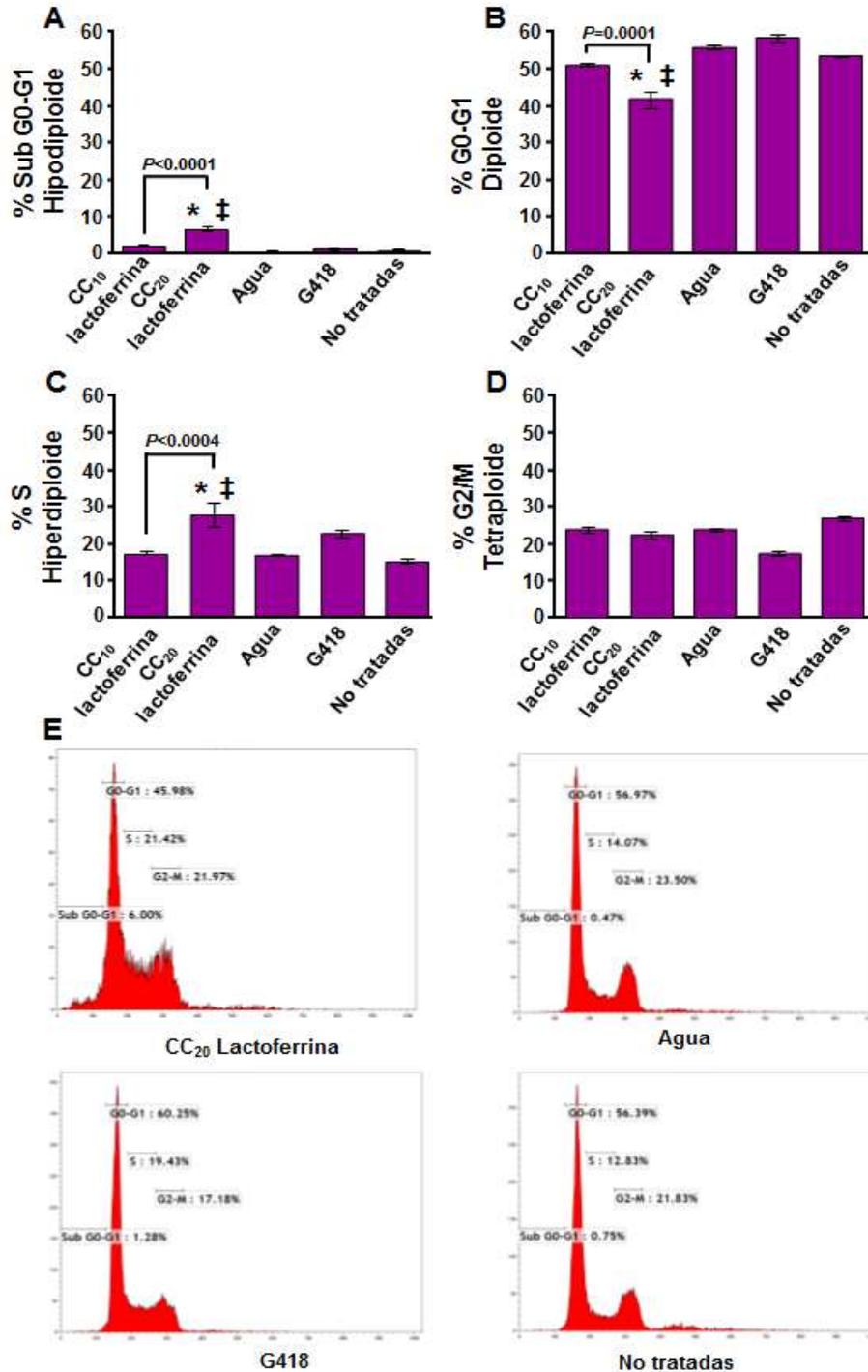


Figura 17. Perfil del ciclo celular de células MDA-MB-231 tratadas con rhLf. Los valores de fase S muestran un mecanismo dependiente de la dosis. Los porcentajes de células en cada fase se trazan a lo largo del eje de las y mientras que los diferentes tratamientos se grafican a lo largo del eje x. Cada barra representa el promedio de cuatro réplicas independientes, y las barras de error representan las desviaciones estándar correspondientes. A. Fase sub-G0/G1 (hipodiploide, contabilizado como subpoblación apoptótica). B. Fase G0/G1 (diploide). C. Fase S (hiperdiploide). D. Fase G2/M (tetraploide). E. Histogramas representativos de citometría de flujo empleada para cuantificar las distribuciones de las fases del ciclo celular.

9.6.5 Desorganización del citoesqueleto en células MDA-MB-231 mediada por lactoferrina humana recombinante

De acuerdo con los hallazgos anteriores descritos en este trabajo como la fragmentación de ADN e inducción de apoptosis en células de cáncer de seno provocadas por rhLf, se decidió investigar con más detalle el posible efecto perturbador de rhLf en dos proteínas polimerizadas principales que forman la estructura del citoesqueleto, microfilamentos de actina y microtúbulos de tubulina (Lázaro-Diéguez *et al.*, 2008), a través de inmunocitoquímica y microscopía confocal. Para este propósito, se utilizaron las células MDA-MB-231 y Hs27. La inclusión de las células fibroblásticas Hs27 como control se debió a que son más grandes y más planas que las células derivadas de cáncer de seno y sus procesos son alargados, por lo tanto, los cambios en la estructura de su citoesqueleto son más fáciles de detectar visualmente. Las células se expusieron a rhLf. Después de 2 h de incubación, en las células MDA-MB-231 tratadas con rhLf, se observó que la forma filamentosa de la actina había desaparecido, sin embargo, la señal de Alexa-568 estaba formando un patrón puntuado abundante finamente distribuido en todo el citoplasma de las células; solo están señalando tres de estas agregaciones de actina; (Figura 18A; canal Alexa-568). Además, el tamaño de la celda estaba apareciendo similar a las células de control (Figura 17D, E y H). Por otro lado, la estructura de microtúbulos de las células MDA-MB-231 no pareció verse afectada por el rhLf (Figura 18A). No obstante, después de 4 h de exposición a rhLf, la desorganización filamentosa de actina fue más acentuada, formando grupos de actina F amorfos más grandes y más brillantes (rojo), considerados como agresivos (García-Mata *et al.*, 1999; Lázaro-Diéguez *et al.*, 2008), localizados hacia la periferia de las células, en comparación con células tratadas durante 2 h de rhLf, así como a las células de

control (Figura 18A, B, D, E, G). Al mismo tiempo, la contracción del citosol fue evidente en el momento de la incubación (4 h; Figura 14B; canal Alexa-568). Hasta este punto, la red de interrupción de microfilamento de actina F provocada por rhLf en las células MDA-MB-231, se asemeja al perfil de alteración inducida por la citocalasina D (Figura 18B, canal C; canal Alexa-568), que también causó grandes agregados de F-actina en el citoplasma; sin embargo, estos agregados de actina F inducidos por citocalasina D en MDA-MB-231 se localizaron principalmente en el espacio de la periferia nuclear (Figura 18C; canal Alexa-568 e imagen combinada).

Al analizar el efecto de rhLf en las células Hs27, se observó un patrón similar al visualizado en las células MDA-MB-231, los microfilamentos de actina de las células Hs27 desaparecieron y se observaron abundantes grupos de actina F puntuados abundantes en el citoplasma (flechas blancas; Figura 19A; canal Alexa-568). En las células Hs27 tratadas con rhLf, la organización de los microtúbulos no se modificó visualmente (Figura 19A; canal Alexa-488). Como era de esperar, las células Hs27 tratadas con citocalasina D exhibieron una organización de microfilamento distorsionada, lo que provocó la formación de agregomas de actina F citoplasmáticos (flechas blancas; Figura 19B; canal Alexa-488); tanto las células MDA-MB-231 como las Hs27 tratadas con paclitaxel mostraron un acortamiento de los microtúbulos sin alterar su forma filamentosa (Figura 18F y 19E; canales Alexa-488), disminuyendo el tamaño de la célula. Además, el paclitaxel causó formación de ampollas en las células MDA-MB-231 (Figura 18F; flechas blancas). Las células de control tratadas con DMSO, tratadas con H₂O y sin tratar mostraron una organización inalterada en la estructura de microfilamentos y microtúbulos de actina F (Figura 18D, E, H y Figura 19C, D, F, respectivamente). Por lo tanto, los resultados sugieren que rhLf provocó la

desorganización de la arquitectura del citoesqueleto al alterar inicialmente la red de microfilamentos de actina F, como lo demuestra el patrón de desaparición de actina filamentosa (actina F), concomitante con la formación de agregosomas tanto en MDA-MB-231 como en células Hs27. Además, los cambios en la agregación de filamentos de actina F puntuados ejercidos por rhLf se produjeron de manera dependiente del tiempo en células MDA-MB-231.

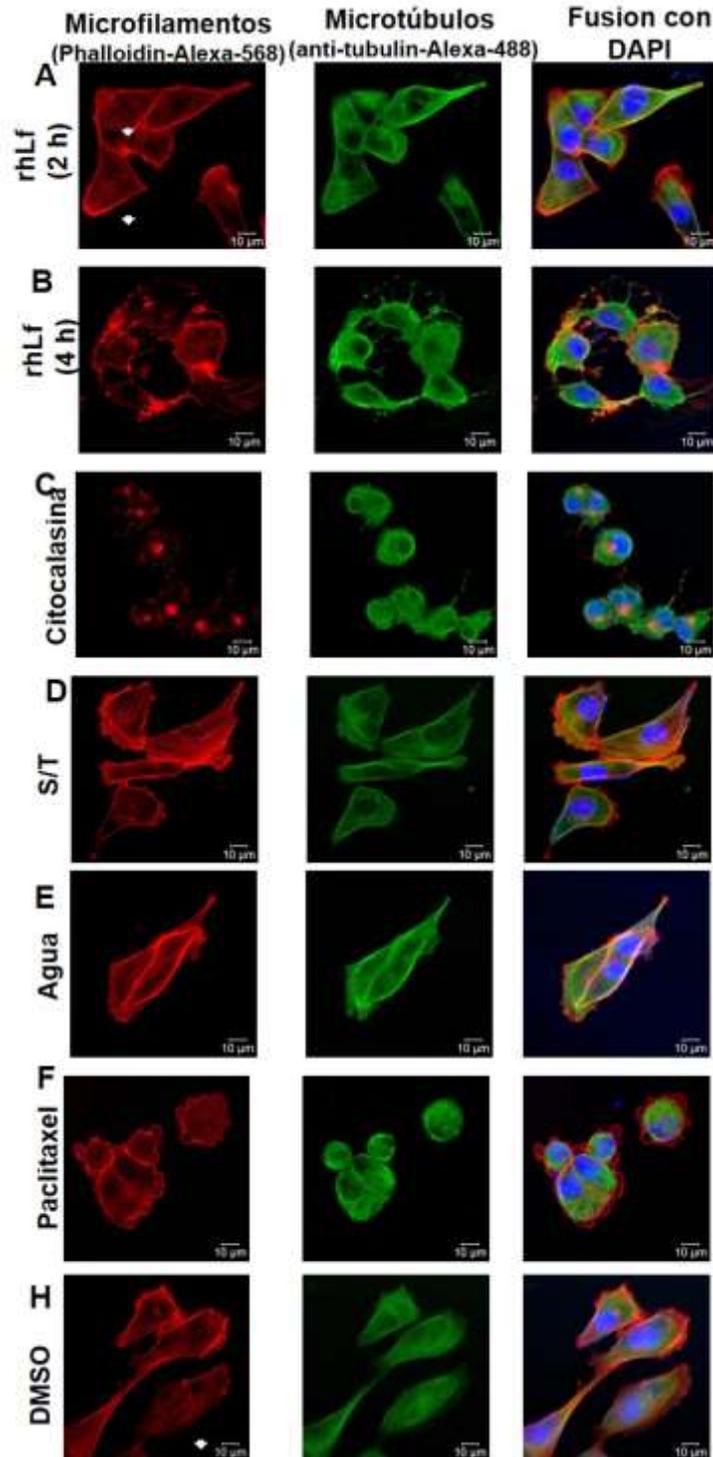


Figura 18. Estructura del citoesqueleto en células MDA-MB-231 tratadas con rhLf. El efecto observado en las células tratadas con lactoferrina es dependiente del tiempo de exposición. Las estructuras en canal rojo muestran microfilamentos, mientras que en canal verde se observan los microtúbulos. De igual manera, las imágenes tomadas mediante microscopía confocal fueron fusionadas en tres canales (incluyendo el canal DAPI) para una observación más evidente del daño provocado por rhLf.

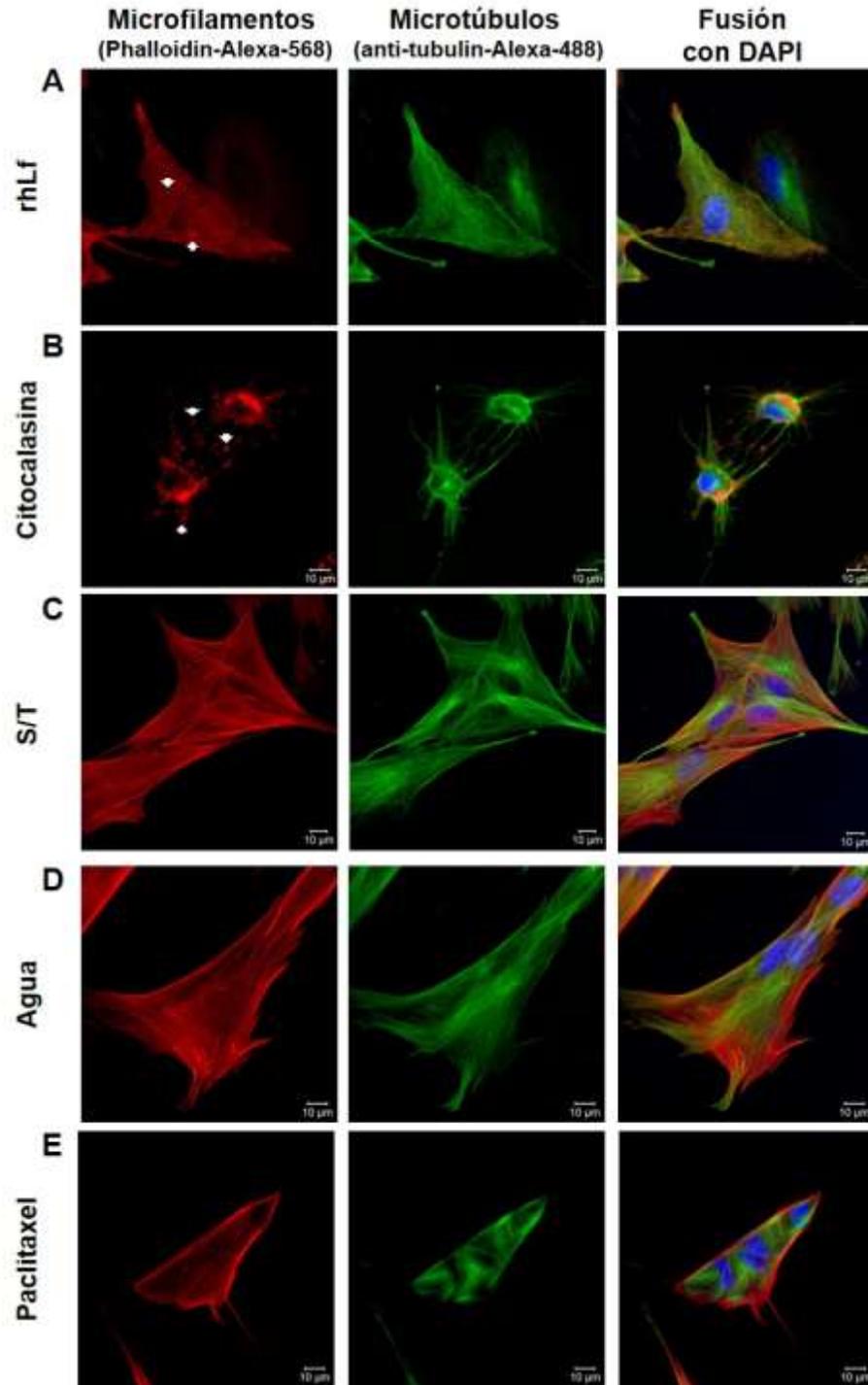


Figura 19. Estructura del citoesqueleto en células Hs27 tratadas con rhLf. Imágenes representativas de microscopía confocal de inmunofluorescencia de células Hs27,

V. CONCLUSIONES

1. La lactoferrina humana recombinante mostró tener una actividad anticancerígena similar a la actividad de lactoferrina humana nativa que se ha reportado anteriormente en la literatura.
2. El gen sintético (*human lactoferin*) que codifica para lactoferrina humana recombinante se encuentra integrado en la levadura *Pichia pastoris* X33 en la línea Pp-pIGF5-C2.
3. La línea Pp-pIGF5-C2 expresa, bajo el control del promotor AOX1, lactoferrina humana recombinante. La lactoferrina humana recombinante está conformada por perfiles de glicosilación ricos en manosa.
4. La lactoferrina humana recombinante mostró tener alta especificidad contra células de cáncer de seno y células metastásicas de pulmón derivadas de cáncer de seno; dicho efecto demostró ser influido por el perfil de glicosilación presente en la proteína; además, fue dependiente de la dosis del tratamiento.
5. La lactoferrina humana recombinante obtenida en el presente trabajo mostró una especificidad sumamente baja contra células no cancerígenas derivadas de epitelio glandular mamario.

6. La lactoferrina humana recombinante expresada en el presente trabajo ejerció su efecto anticancerígeno a través de la inducción de la vía de apoptosis en células de cáncer de seno y el arresto del ciclo celular en la fase S.

7. Los daños morfológicos provocados al citoesqueleto de células de cáncer de seno señalan que el efecto de lactoferrina humana recombinante expresada en el presente trabajo es dependiente del tiempo de exposición.

8. Los valores obtenidos de SCI demostraron que es posible evaluar el uso de la lactoferrina humana recombinante expresada en este trabajo como una proteína anticancerígena.

VI. PERSPECTIVAS

1. Evaluar el efecto inmunomodulador de la lactoferrina humana recombinante obtenida en este trabajo, así como la posible implicación que su perfil de glicosilación pueda tener en tal efecto.
2. Expresar lactoferrina humana recombinante en sistemas de expresión que cuenten con diferentes tipos de enzimas glicosiltransferasas para obtener diferentes perfiles de glicosilación y evaluar la funcionalidad de cada una de ellas.
3. Realizar un análisis de transcriptómica a las células de cáncer de seno tratadas con lactoferrina humana recombinante y determinar qué proteínas se están expresando bajo el efecto de este tratamiento.
4. Analizar la interacción lactoferrina-receptores en células de cáncer de seno tratadas con lactoferrina humana recombinante mediante *docking molecular* y con base a los resultados, evaluar su interacción *in vivo*.
5. Evaluar el efecto de lactoferrina humana recombinante en otras líneas celulares cancerígenas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Serie, M.M., El-Fakharany, E.M. 2017. Efficiency of novel nanocombinations of bovine milk proteins (lactoperoxidase and lactoferrin) for combating different human cancer cell lines. *Scientific reports*, **7**(1), 16769.
- Actor, J.K., Hwang, S.-A., Kruzel, M.L. 2009. Lactoferrin as a natural immune modulator. *Current pharmaceutical design*, **15**(17), 1956.
- Adlerova, L., Bartoskova, A., Faldyna, M. 2008. Lactoferrin: a review. *Veterinarni Medicina*, **53**(9), 457-468.
- Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., Schwab, H. 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied microbiology and biotechnology*, **98**(12), 5301-5317.
- Arias, M., McDonald, L.J., Haney, E.F., Nazmi, K., Bolscher, J.G., Vogel, H.J. 2014. Bovine and human lactoferricin peptides: chimeras and new cyclic analogs. *Biometals*, **27**(5), 935-948.
- Ashkenazi, A. 2008. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, **19**(3-4), 325-331.
- Atchley, D.P., Albarracin, C.T., Lopez, A., Valero, V., Amos, C.I., Gonzalez-Angulo, A.M., Hortobagyi, G.N., Arun, B.K. 2008. Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **26**(26), 4282-4288.

- Badve, S., Dabbs, D.J., Schnitt, S.J., Baehner, F.L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S.B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S.R. 2011. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology*, **24**(2), 157.
- Baig, S., Seevasant, I., Mohamad, J., Mukheem, A., Huri, H., Kamarul, T. 2017. Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? *Cell death & disease*, **7**(1), e2058.
- Baker, E.N., Baker, H.M., Kidd, R.D. 2002. Lactoferrin and transferrin: functional variations on a common structural framework. *Biochemistry and cell biology*, **80**(1), 27-34.
- Barboza, M., Pinzon, J., Wickramasinghe, S., Froehlich, J.W., Moeller, I., Smilowitz, J.T., Ruhaak, L.R., Huang, J., Lönnerdal, B., German, J.B. 2012. Glycosylation of human milk lactoferrin exhibits dynamic changes during early lactation enhancing its role in pathogenic bacteria-host interactions. *Molecular & Cellular Proteomics*, mcp. M111. 015248.
- Baritaki, S., Militello, L., Malaponte, G., Spandidos, D.A., Salcedo, M., Bonavida, B. 2011. The anti-CD20 mAb LFB-R603 interrupts the dysregulated NF- κ B/Snail/RKIP/PTEN resistance loop in B-NHL cells: role in sensitization to TRAIL apoptosis. *International journal of oncology*, **38**(6), 1683-1694.
- Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K., Tomita, M. 1992. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1121**(1-2), 130-136.

- Berardi, D.E., Flumian, C., Campodónico, P.B., Urtreger, A.J., Bessone, M.I.D., Motter, A.N., de Kier Joffé, E.D.B., Farias, E.F., Todaro, L.B. 2015. Myoepithelial and luminal breast cancer cells exhibit different responses to all-trans retinoic acid. *Cellular Oncology*, **38**(4), 289-305.
- Bimboim, H., Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, **7**(6), 1513-1523.
- Blanchard, V., Gadkari, R.A., George, A.V., Roy, S., Gerwig, G.J., Leeflang, B.R., Dighe, R.R., Boelens, R., Kamerling, J.P. 2008. High-level expression of biologically active glycoprotein hormones in *Pichia pastoris* strains—selection of strain GS115, and not X-33, for the production of biologically active N-glycosylated 15 N-labeled phCG. *Glycoconjugate journal*, **25**(3), 245-257.
- Brisken, C. 2013. Progesterone signalling in breast cancer: a neglected hormone coming into the limelight. *Nature Reviews Cancer*, **13**(6), 385.
- Bullen, J., Rogers, H.J., Leigh, L. 1972. Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infection in infants. *Bmj*, **1**(5792), 69-75.
- Burgess, D.J. 2013. Apoptosis: Refined and lethal. *Nature Reviews Cancer*, **13**(2), 79.
- Cailleau, R., Young, R., Olive, M., Reeves Jr, W. 1974. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute*, **53**(3), 661-674.
- Cereghino, J.L., Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews*, **24**(1), 45-66.
- Citri, A., Yarden, Y. 2006. EGF–ERBB signalling: towards the systems level. *Nature reviews Molecular cell biology*, **7**(7), 505.
- Contreras, L., Calderon, R.I., Varela-Ramirez, A., Zhang, H.-Y., Quan, Y., Das, U., Dimmock, J.R., Skouta, R., Aguilera, R.J. 2018. Induction of apoptosis via

proteasome inhibition in leukemia/lymphoma cells by two potent piperidones.

Cellular Oncology, 1-14.

Cregg, J.M. 2007. Introduction: distinctions between *Pichia pastoris* and other expression systems. *Pichia Protocols*, 1-10.

Cregg, J.M., Russell, K.A. 1998. Transformation. *Pichia protocols*, 27-39.

Chahal, S., Wei, P., Moua, P., Park, S.P.J., Kwon, J., Patel, A., Vu, A.T., Catolico, J.A., Tsai, Y.F.T., Shaheen, N. 2017. Structural characterization of the α -mating factor prepro-peptide for secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Gene*, **598**, 50-62.

Chahardooli, M., Niazi, A., Aram, F., Sohrabi, S.M. 2016. Expression of recombinant Arabian camel lactoferricin-related peptide in *Pichia pastoris* and its antimicrobial identification. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **96**(2), 569-575.

Chang, E.C., Frasar, J., Komm, B., Katzenellenbogen, B.S. 2006. Impact of estrogen receptor β on gene networks regulated by estrogen receptor α in breast cancer cells. *Endocrinology*, **147**(10), 4831-4842.

Chea, C., Miyauchi, M., Inubushi, T., Ayuningtyas, N.F., Subarnbhesaj, A., Nguyen, P.T., Shrestha, M., Haing, S., Ohta, K., Takata, T. 2018. Molecular mechanism of inhibitory effects of bovine lactoferrin on the growth of oral squamous cell carcinoma. *PloS one*, **13**(1), e0191683.

Choi, B.-K., Actor, J.K., Rios, S., d'Anjou, M., Stadheim, T.A., Warburton, S., Giaccone, E., Cukan, M., Li, H., Kull, A. 2008. Recombinant human lactoferrin expressed in glycoengineered *Pichia pastoris*: effect of terminal N-

- acetylneuraminic acid on in vitro secondary humoral immune response. *Glycoconjugate journal*, **25**(6), 581-593.
- Daly, R., Hearn, M.T. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*, **18**(2), 119-138.
- Damasceno, L.M., Huang, C.-J., Batt, C.A. 2012. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied microbiology and biotechnology*, **93**(1), 31-39.
- Damiens, E., El Yazidi, I., Mazurier, J., Duthille, I., Spik, G., Boilly-Marer, Y. 1999. Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells. *Journal of cellular biochemistry*, **74**(3), 486-498.
- de Mejia, E.G., Dia, V.P. 2010. The role of nutraceutical proteins and peptides in apoptosis, angiogenesis, and metastasis of cancer cells. *Cancer and Metastasis Reviews*, **29**(3), 511-528.
- Denkert, C., Liedtke, C., Tutt, A., von Minckwitz, G. 2017. Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies. *The Lancet*, **389**(10087), 2430-2442.
- Diep, C.H., Daniel, A.R., Mauro, L.J., Knutson, T.P., Lange, C.A. 2015. Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. *Journal of molecular endocrinology*, **54**(2), R31-R53.
- Dolbeare, F., Gratzner, H., Pallavicini, M., Gray, J. 1983. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **80**(18), 5573-5577.

- Embleton, N.D., Berrington, J.E., McGuire, W., Stewart, C.J., Cummings, S.P. 2013. Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. Elsevier. pp. 143-149.
- Evans, D.G., Howell, A. 2012. Are we ready for online tools in decision making for BRCA1/2 mutation carriers. *J Clin Oncol*, **30**(5), 471-473.
- Fadeel, B., Xue, D. 2009. The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, **44**(5), 264-277.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., De Laurenzi, V. 2012. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*, **4**(5), 330.
- Fidler, M.M., Gupta, S., Soerjomataram, I., Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Bray, F. 2017. Cancer incidence and mortality among young adults aged 20–39 years worldwide in 2012: a population-based study. *The Lancet Oncology*, **18**(12), 1579-1589.
- Figuroa-Lozano, S., Valk-Weeber, R.L., van Leeuwen, S.S., Dijkhuizen, L., de Vos, P. 2018. Dietary N-Glycans from Bovine Lactoferrin and TLR Modulation. *Molecular nutrition & food research*, **62**(2), 1700389.
- Finlay-Schultz, J., Gillen, A.E., Brechbuhl, H.M., Matthews, S.B., Jacobsen, B.M., Bentley, D.L., Kabos, P., Sartorius, C.A. 2018. Progesterone receptor regulation of breast cancer cell translation. *Nuclear Receptors: New Roles for Nuclear Receptors in Development, Health and Disease Conference 2018*. BioScientifica.

- Fornaro, L., Lucchesi, M., Caparello, C., Vasile, E., Caponi, S., Ginocchi, L., Masi, G., Falcone, A. 2011. Anti-HER agents in gastric cancer: from bench to bedside. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, **8**(7), 369.
- Fox, J.L., MacFarlane, M. 2016. Targeting cell death signalling in cancer: minimising 'Collateral damage'. *British journal of cancer*, **115**(1), 5.
- Fukuta, S., Kawamoto, K.-i., Mizukami, Y., Yoshimura, Y., Ueda, J.-i., Kanbe, M. 2012. Transgenic tobacco plants expressing antimicrobial peptide bovine lactoferricin show enhanced resistance to phytopathogens. *Plant Biotechnology*, **29**(4), 383-389.
- García-Mata, R., Bebök, Z., Sorscher, E.J., Sztul, E.S. 1999. Characterization and Dynamics of Aggresome Formation by a Cytosolic Gfp-Chimera. *The Journal of cell biology*, **146**(6), 1239-1254.
- García-Montoya, I.A., Cendón, T.S., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q. 2012. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1820**(3), 226-236.
- Ge, F., Zhu, L., Aang, A., Song, P., Li, W., Tao, Y., Du, G. 2018. Recent advances in enhanced enzyme activity, thermostability and secretion by N-glycosylation regulation in yeast. *Biotechnology letters*, 1-8.
- Gemmill, T.R., Trimble, R.B. 1999. Overview of N-and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1426**(2), 227-237.
- Giansanti, F., Panella, G., Leboffe, L., Antonini, G. 2016. Lactoferrin from milk: nutraceutical and pharmacological properties. *Pharmaceuticals*, **9**(4), 61.

- Gibbons, J.A., Kanwar, J.R., Kanwar, R.K. 2015. Iron-free and iron-saturated bovine lactoferrin inhibit survivin expression and differentially modulate apoptosis in breast cancer. *BMC cancer*, **15**(1), 425.
- Golias, C., Charalabopoulos, A., Charalabopoulos, K. 2004. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *International journal of clinical practice*, **58**(12), 1134-1141.
- González-Chávez, S.A., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q. 2009. Lactoferrin: structure, function and applications. *International journal of antimicrobial agents*, **33**(4), 301. e1-301. e8.
- Gopal, S.H., Das, S.K. 2016. Role of Lactoferrin in the Carcinogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of cancer clinical trials*, **1**(3).
- Görmez, U., Kürkcü, M., Benlidayi, M.E., Ulubayram, K., Sertdemir, Y., Dağlioğlu, K. 2015. Effects of bovine lactoferrin in surgically created bone defects on bone regeneration around implants. *Journal of oral science*, **57**(1), 7-15.
- Groves, M.L. 1960. The isolation of a red protein from Milk². *Journal of the American Chemical Society*, **82**(13), 3345-3350.
- Guedes, J.P., Pereira, C.S., Rodrigues, L.R., Côrte-Real, M. 2018. Bovine milk lactoferrin selectively kills highly metastatic prostate cancer PC-3 and osteosarcoma MG-63 cells in vitro. *Frontiers in oncology*, **8**.
- Hamilton, S.R., Zha, D. 2015. Progress in Yeast Glycosylation Engineering. *Glyco-Engineering: Methods and Protocols*, 73-90.
- Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., Sakuragi, N. 2014. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed research international*, **2014**.

Hoisington, D., Khairallah, M. and González-de-León, D. . 1999. Laboratory Protocols:
CIMMYT Applied

Genetic Engineering Laboratory. México, D.F., (Ed.) CIMMYT, pp. 141.

Hu, L., Gao, C.-h., Hong, C., Zhong, Q., Dong, H.-L., Gao, X.-M. 2016. Expression, purification, and breast cancer cell inhibiting effect of recombinant human lactoferrin C-lobe. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **80**(2), 257-263.

Huang, B., Omoto, Y., Iwase, H., Yamashita, H., Toyama, T., Coombes, R.C., Filipovic, A., Warner, M., Gustafsson, J.-Å. 2014. Differential expression of estrogen receptor α , β 1, and β 2 in lobular and ductal breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**(5), 1933-1938.

Iglesias-Figueroa, B., Valdiviezo-Godina, N., Siqueiros-Cendón, T., Sinagawa-García, S., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q. 2016. High-Level Expression of Recombinant Bovine Lactoferrin in *Pichia pastoris* with Antimicrobial Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**(6), 902.

Iqbal, N., Iqbal, N. 2014. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications. *Molecular biology international*, **2014**.

Jacobs, P., Callewaert, N. 2009. N-glycosylation engineering of biopharmaceutical expression systems. *Current molecular medicine*, **9**(7), 774-800.

Jahan, M., Wynn, P., Wang, B. 2016. Molecular characterization of the level of sialic acids N-acetylneuraminic acid, N-glycolylneuraminic acid, and ketodeoxynonulosonic acid in porcine milk during lactation. *Journal of dairy science*, **99**(10), 8431-8442.

- Jenssen, H., Hancock, R.E. 2009. Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*, **91**(1), 19-29.
- Jia, M., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J.-Å. 2015. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, **29**(4), 557-568.
- Jiang, R., Lönnerdal, B. 2016. Bovine lactoferrin and lactoferricin exert antitumor activities on human colorectal cancer cells (HT-29) by activating various signaling pathways. *Biochemistry and cell biology*, **95**(1), 99-109.
- Jiang, T., Chen, L., Jia, S., Chen, L., Ma, Y. 2008. High-level expression and production of human lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Dairy Science & Technology*, **88**(2), 173-181.
- Jones, E., Smart, A., Bloomberg, G., Burgess, L., Millar, M. 1994. Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. *Journal of Applied Bacteriology*, **77**(2), 208-214.
- Kanwar, J.R., Roy, K., Patel, Y., Zhou, S.-F., Singh, M.R., Singh, D., Nasir, M., Sehgal, R., Sehgal, A., Singh, R.S. 2015. Multifunctional iron bound lactoferrin and nanomedicinal approaches to enhance its bioactive functions. *Molecules*, **20**(6), 9703-9731.
- Karav, S., German, J.B., Rouquié, C., Le Parc, A., Barile, D. 2017. Studying lactoferrin N-glycosylation. *International journal of molecular sciences*, **18**(4), 870.
- Kazan, H.H., Urfali-Mamatoglu, C., Gunduz, U. 2017. Iron metabolism and drug resistance in cancer. *Biomaterials*, **30**(5), 629-641.
- Khan, A.H., Bayat, H., Rajabibazl, M., Sabri, S., Rahimpour, A. 2017. Humanizing glycosylation pathways in eukaryotic expression systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **33**(1), 4.

- Kieckens, E., Rybarczyk, J., Cox, E., Vanrompay, D. 2018. Antibacterial and immunomodulatory activities of bovine lactoferrin against *Escherichia coli* O157: H7 infections in cattle. *Biometals*, **31**(3), 321-330.
- Kumar, P., Aggarwal, R. 2016. An overview of triple-negative breast cancer. *Archives of gynecology and obstetrics*, **293**(2), 247-269.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Aster, J.C. 2014. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book*. elsevier health sciences.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, **227**(5259), 680-685.
- Lakhani, S.R., Van De Vijver, M.J., Jacquemier, J., Anderson, T.J., Osin, P.P., McGuffog, L., Easton, D.F. 2002. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *Journal of clinical oncology*, **20**(9), 2310-2318.
- Latorre, D., Puddu, P., Valenti, P., Gessani, S. 2010. Reciprocal interactions between lactoferrin and bacterial endotoxins and their role in the regulation of the immune response. *Toxins*, **2**(1), 54-68.
- Lázaro-Diéguez, F., Aguado, C., Mato, E., Sánchez-Ruíz, Y., Esteban, I., Alberch, J., Knecht, E., Egea, G. 2008. Dynamics of an F-actin aggresome generated by the actin-stabilizing toxin jasplakinolide. *Journal of cell science*, **121**(9), 1415-1425.
- Le Parc, A., Karav, S., Rouquié, C., Maga, E.A., Bunyatratchata, A., Barile, D. 2017. Characterization of recombinant human lactoferrin N-glycans expressed in the milk of transgenic cows. *PLOS One*, **12**(2), e0171477.

- Legrand, D. 2016. Overview of lactoferrin as a natural immune modulator. *The Journal of pediatrics*, **173**, S10-S15.
- Legrand, D., Ellass, E., Carpentier, M., Mazurier, J. 2006. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. *Biochemistry and cell biology*, **84**(3), 282-290.
- Legrand, D., Mazurier, J. 2010. A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity. *Biometals*, **23**(3), 365-376.
- Legrand, D., Pierce, A., Ellass, E., Carpentier, M., Mariller, C., Mazurier, J. 2008. Lactoferrin structure and functions. in: *Bioactive Components of Milk*, Springer, pp. 163-194.
- Lema, C., Varela-Ramirez, A., Aguilera, R.J. 2011. Differential nuclear staining assay for high-throughput screening to identify cytotoxic compounds. *Current cellular biochemistry*, **1**(1), 1.
- Leventis, P.A., Grinstein, S. 2010. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annual review of biophysics*, **39**, 407-427.
- Li, J., Zhu, W., Luo, M., Ren, H., Tang, L., Liao, H., Wang, Y. 2015. Molecular cloning, expression and purification of lactoferrin from Tibetan sheep mammary gland using a yeast expression system. *Protein expression and purification*, **109**, 35-39.
- Lim, E., Palmieri, C., Tilley, W.D. 2016. Renewed interest in the progesterone receptor in breast cancer, Nature Publishing Group.
- Lin-Cereghino, G.P., Stark, C.M., Kim, D., Chang, J., Shaheen, N., Poerwanto, H., Agari, K., Moua, P., Low, L.K., Tran, N. 2013. The effect of α -mating factor

secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*.

Gene, **519**(2), 311-317.

Locksley, R.M., Killeen, N., Lenardo, M.J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, **104**(4), 487-501.

Lopez, J., Tait, S. 2015. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *British journal of cancer*, **112**(6), 957.

Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B., Harvey, L.M. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, **22**(4), 249-270.

Mahidhara, G., Kanwar, R.K., Roy, K., Kanwar, J.R. 2015. Oral administration of iron-saturated bovine lactoferrin-loaded ceramic nanocapsules for breast cancer therapy and influence on iron and calcium metabolism. *International journal of nanomedicine*, **10**, 4081.

Mayeur, S., Spahis, S., Pouliot, Y., Levy, E. 2016. Lactoferrin, a pleiotropic protein in health and disease. *Antioxidants & redox signaling*, **24**(14), 813-836.

Meehl, M.A., Stadheim, T.A. 2014. Biopharmaceutical discovery and production in yeast. *Current opinion in biotechnology*, **30**, 120-127.

Miller, K.D., Siegel, R.L., Lin, C.C., Mariotto, A.B., Kramer, J.L., Rowland, J.H., Stein, K.D., Alteri, R., Jemal, A. 2016. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, **66**(4), 271-289.

Mitchell, R.N., Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C. 2017. *Compendio de Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional+ StudentConsult*. Elsevier Health Sciences.

- Moasser, M.M. 2007. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, **26**(45), 6469.
- Mokdad-Gargouri, R., Abdelmoula-Soussi, S., Hadji-Abbès, N., Amor, I.Y.-H., Borchani-Chabchoub, I., Gargouri, A. 2012. Yeasts as a tool for heterologous gene expression. in: *Recombinant Gene Expression*, Springer, pp. 359-370.
- Morelle, W., Faid, V., Chirat, F., Michalski, J.-C. 2009. Analysis of N-and O-linked glycans from glycoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry. in: *Glycomics*, Springer, pp. 3-21.
- Moreno-Expósito, L., Illescas-Montes, R., Melguizo-Rodríguez, L., Ruiz, C., Ramos-Torrecillas, J., de Luna-Bertos, E. 2018. Multifunctional capacity and therapeutic potential of lactoferrin. *Life sciences*.
- Munoz, R., Man, S., Shaked, Y., Lee, C.R., Wong, J., Francia, G., Kerbel, R.S. 2006. Highly efficacious nontoxic preclinical treatment for advanced metastatic breast cancer using combination oral UFT-cyclophosphamide metronomic chemotherapy. *Cancer research*, **66**(7), 3386-3391.
- Nagasaka, A., Kawane, K., Yoshida, H., Nagata, S. 2010. Apaf-1-independent programmed cell death in mouse development. *Cell death and differentiation*, **17**(6), 931.
- Nair, P., Lu, M., Petersen, S., Ashkenazi, A. 2014. Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. in: *Methods in enzymology*, Vol. 544, Elsevier, pp. 99-128.
- Nassa, G., Tarallo, R., Guzzi, P.H., Ferraro, L., Cirillo, F., Ravo, M., Nola, E., Baumann, M., Nyman, T.A., Cannataro, M. 2011. Comparative analysis of nuclear estrogen receptor alpha and beta interactomes in breast cancer cells. *Molecular BioSystems*, **7**(3), 667-676.

- Nuijens, J.H., van Berkel, P.H., Schanbacher, F.L. 1996. Structure and biological actions of lactoferrin. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **1**(3), 285-295.
- Nunes, L.M., Robles-Escajeda, E., Santiago-Vazquez, Y., Ortega, N.M., Lema, C., Muro, A., Almodovar, G., Das, U., Das, S., Dimmock, J.R. 2014. The gender of cell lines matters when screening for novel anti-cancer drugs. *The AAPS journal*, **16**(4), 872-874.
- O'riordan, N., Kane, M., Joshi, L., Hickey, R.M. 2014. Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation. *Glycobiology*, **24**(3), 220-236.
- O'Connor, M.J. 2015. Targeting the DNA damage response in cancer. *Molecular cell*, **60**(4), 547-560.
- Omoto, Y., Inoue, S., Ogawa, S., Toyama, T., Yamashita, H., Muramatsu, M., Kobayashi, S., Iwase, H. 2001. Clinical value of the wild-type estrogen receptor β expression in breast cancer. *Cancer letters*, **163**(2), 207-212.
- Otto, T., Sicinski, P. 2017. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, **17**(2), 93.
- Paramasivam, M., Saravanan, K., Uma, K., Sharma, S., Singh, T., Srinivasan, A. 2002. Expression, purification, and characterization of equine lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, **26**(1), 28-34.
- Pecorini, C., Savazzini, F., Martino, P., Fusi, E., Fogher, C., Baldi, A. 2005. Heterologous expression of biologically active porcine lactoferrin in *Pichia pastoris* yeast. *Veterinary research communications*, **29**(2), 379-382.

- Pereira, C.S., Guedes, J.P., Gonçalves, M., Loureiro, L., Castro, L., Gerós, H., Rodrigues, L.R., Côrte-Real, M. 2016. Lactoferrin selectively triggers apoptosis in highly metastatic breast cancer cells through inhibition of plasmalemmal V-H⁺-ATPase. *Oncotarget*, **7**(38), 62144.
- Pilleron, S., Sarfati, D., Janssen-Heijnen, M., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., Soerjomataram, I. 2019. Global cancer incidence in older adults, 2012 and 2035: A population-based study. *International journal of cancer*, **144**(1), 49-58.
- Pinho, S.S., Reis, C.A. 2015. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Cancer*, **15**(9), 540.
- Robles-Escajeda, E., Das, U., Ortega, N.M., Parra, K., Francia, G., Dimmock, J.R., Varela-Ramirez, A., Aguilera, R.J. 2016. A novel curcumin-like dienone induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Cellular oncology*, **39**(3), 265-277.
- Robles-Escajeda, E., Lerma, D., Nyakeriga, A.M., Ross, J.A., Kirken, R.A., Aguilera, R.J., Varela-Ramirez, A. 2013. Searching in mother nature for anti-cancer activity: anti-proliferative and pro-apoptotic effect elicited by green barley on leukemia/lymphoma cells. *PloS one*, **8**(9), e73508.
- Rosa, L., Cutone, A., Lepanto, M.S., Paesano, R., Valenti, P. 2017. Lactoferrin: A Natural Glycoprotein Involved in Iron and Inflammatory Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**(9), 1985.
- Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *nature*, **391**(6662), 96.
- Santiago-Vázquez, Y., Das, U., Varela-Ramirez, A., T Baca, S., Ayala-Marin, Y., Lema, C., Das, S., Baryyan, A., R Dimmock, J., J Aguilera, R. 2016. Tumor-

- selective cytotoxicity of a novel pentadiene analogue on human leukemia/lymphoma cells. *Clinical cancer drugs*, **3**(2), 138-146.
- Serrano-Rivero, Y., Marrero-Domínguez, K., Fando-Calzada, R. 2016. *Pichia pastoris*: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, **47**(2).
- Sharma, R., Chakraborty, D., Gupta, P. 2015. Bovine lactoferrin and its functions in animals-A review. *Agricultural Reviews*, **36**(4).
- Shi, J., Finckenberg, P., Martonen, E., Ahlroos-Lehmus, A., Pilvi, T.K., Korpela, R., Mervaala, E.M. 2012. Metabolic effects of lactoferrin during energy restriction and weight regain in diet-induced obese mice. *Journal of Functional Foods*, **4**(1), 66-78.
- Singsun, N., Kanongnuch, C., Leksawasdi, N., Pratanaphon, R. 2016. Utilization of waste glycerol as a carbon source for *Pichia pastoris* cultivation.
- Siqueiros-Cendón, T., Arévalo-Gallegos, S., Iglesias-Figueroa, B.F., García-Montoya, I.A., Salazar-Martínez, J., Rascón-Cruz, Q. 2014. Immunomodulatory effects of lactoferrin. *Acta Pharmacologica Sinica*, **35**(5), 557-566.
- Sorensen, M., Sorensen, S. 1940. The proteins in whey. *Compte rendu des Travaux du Laboratoire de Carlsberg, Ser. Chim.*, **23**(7), 55-99.
- Spik, G., Coddeville, B., Mazurier, J., Bourne, Y., Cambillaut, C., Montreuil, J. 1994. Primary and three-dimensional structure of lactotransferrin (lactoferrin) glycans. in: *Lactoferrin*, Springer, pp. 21-32.
- Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y., Yu, Q. 2015. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular cancer*, **14**(1), 48.

- Takayama, Y. 2011. *Lactoferrin and Its Role in Wound Healing*. Springer Science & Business Media.
- Tanghe, M., Danneels, B., Camattari, A., Glieder, A., Vandenberghe, I., Devreese, B., Stals, I., Desmet, T. 2015. Recombinant expression of Trichoderma reesei Cel61A in Pichia pastoris: optimizing yield and N-terminal processing. *Molecular biotechnology*, **57**(11-12), 1010-1017.
- Townley, A. 2017. Investigating the role of survivin in mitochondrial health, University of Nottingham.
- van den Boogert, M.A., Rader, D.J., Holleboom, A.G. 2017. New insights into the role of glycosylation in lipoprotein metabolism. *Current opinion in lipidology*, **28**(6), 502-506.
- Van Landuyt, L., Lonigro, C., Meuris, L., Callewaert, N. 2019. Customized protein glycosylation to improve biopharmaceutical function and targeting. *Current opinion in biotechnology*, **60**, 17-28.
- van Veen, H.A., Geerts, M.E., van Berkel, P.H., Nuijens, J.H. 2004. The role of N-linked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis. *European Journal of Biochemistry*, **271**(4), 678-684.
- Varela-Ramirez, A., Costanzo, M., Carrasco, Y.P., Pannell, K.H., Aguilera, R.J. 2011. Cytotoxic effects of two organotin compounds and their mode of inflicting cell death on four mammalian cancer cells. *Cell biology and toxicology*, **27**(3), 159-168.
- Velusamy, S.K., Markowitz, K., Fine, D.H., Velliyagounder, K. 2016. Human lactoferrin protects against Streptococcus mutans-induced caries in mice. *Oral diseases*, **22**(2), 148-154.

- Velusamy, S.K., Poojary, R., Ardesna, R., Alabdulmohsen, W., Fine, D., Velliyagounder, K. 2014. Protective effects of human lactoferrin during *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced bacteremia in lactoferrin-deficient mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **58**(1), 397-404.
- Vogl, T., Hartner, F.S., Glieder, A. 2013. New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. *Current opinion in biotechnology*, **24**(6), 1094-1101.
- von Roemeling, C., Jiang, W., Chan, C.K., Weissman, I.L., Kim, B.Y. 2017. Breaking down the barriers to precision cancer nanomedicine. *Trends in biotechnology*, **35**(2), 159-171.
- Wally, J., Buchanan, S.K. 2007. A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin. *Biometals*, **20**(3-4), 249-262.
- Wei, Z., Nishimura, T., Yoshida, S. 2000. Presence of a glycan at a potential N-glycosylation site, Asn-281, of bovine lactoferrin. *Journal of dairy science*, **83**(4), 683-689.
- Welsh, K.J., Hwang, S.-A., Boyd, S., Kruzel, M.L., Hunter, R.L., Actor, J.K. 2011. Influence of oral lactoferrin on *Mycobacterium tuberculosis* induced immunopathology. *Tuberculosis*, **91**, S105-S113.
- Wild, R., Kowal, J., Eyring, J., Ngwa, E.M., Aebi, M., Locher, K.P. 2018. Structure of the yeast oligosaccharyltransferase complex gives insight into eukaryotic N-glycosylation. *Science*, **359**(6375), 545-550.
- Wilson, N.S., Yang, A., Yang, B., Couto, S., Stern, H., Gogineni, A., Pitti, R., Marsters, S., Weimer, R.M., Singh, M. 2012. Proapoptotic activation of death receptor 5

on tumor endothelial cells disrupts the vasculature and reduces tumor growth.

Cancer cell, **22**(1), 80-90.

Wong, R.S. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **30**(1), 87.

Wu, J., Hu, Y., Du, C., Piao, J., Yang, L., Yang, X. 2016. The effect of recombinant human lactoferrin from the milk of transgenic cows on *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection in mice. *Food & function*, **7**(1), 308-314.

Xiao, Y., Monitto, C.L., Minhas, K.M., Sidransky, D. 2004. Lactoferrin down-regulates G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of head and neck cancer cells. *Clinical cancer research*, **10**(24), 8683-8686.

Yin, L., Chen, Y., Zhang, Z., Yin, Q., Zheng, N., Cheng, J. 2015. Biodegradable Micelles Capable of Mannose-Mediated Targeted Drug Delivery to Cancer Cells. *Macromolecular rapid communications*, **36**(5), 483-489.

You, Y., Li, H., Qin, X., Zhang, Y., Song, W., Ran, Y., Gao, F. 2015. Decreased CDK10 expression correlates with lymph node metastasis and predicts poor outcome in breast cancer patients-a short report. *Cellular Oncology*, **38**(6), 485-491.

Yuksel, S., Yigit, A.A., Cinar, M., Atmaca, N., Onaran, Y. 2015. Oxidant and antioxidant status of human breast milk during lactation period. *Dairy Science & Technology*, **95**(3), 295-302.

Zasadil, L.M., Andersen, K.A., Yeum, D., Rocque, G.B., Wilke, L.G., Tevaarwerk, A.J., Raines, R.T., Burkard, M.E., Weaver, B.A. 2014. Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. *Science translational medicine*, **6**(229), 229ra43-229ra43.

- Zhang, C., Zhang, F. 2015. Iron homeostasis and tumorigenesis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Protein & cell*, **6**(2), 88-100.
- Zhang, Y., Lima, C.F., Rodrigues, L.R. 2014a. Anticancer effects of lactoferrin: underlying mechanisms and future trends in cancer therapy. *Nutrition reviews*, **72**(12), 763-773.
- Zhang, Y., Lima, C.F., Rodrigues, L.R. 2014b. Bovine lactoferrin induces cell cycle arrest and inhibits mtor signaling in breast cancer cells. *Nutrition and cancer*, **66**(8), 1371-1385.
- Zhao, Y.Y., Takahashi, M., Gu, J.G., Miyoshi, E., Matsumoto, A., Kitazume, S., Taniguchi, N. 2008. Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. *Cancer science*, **99**(7), 1304-1310.
- Zimecki, M., Artym, J., Kocięba, M., Duk, M., Kruzel, M.L. 2014. The effect of carbohydrate moiety structure on the immunoregulatory activity of lactoferrin in vitro. *Cellular & molecular biology letters*, **19**(2), 284.

