

Trabajo final de grado

Licenciatura en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias
Universidad de la República (UdelaR)
URUGUAY

Evaluación de aptámeros anti-HER2 como posibles biofármacos en cáncer de mama

Mauro de Castro Panizza

Tutores:

Dra. Victoria Calzada
Área Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares
Facultad de Ciencias, UdelaR

Dr. Pablo D. Dans
Grupo de Biofísica Computacional,
Depto. de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, UdelaR
Unidad de Bioinformática, Instituto Pasteur de Montevideo

Depositada ante la Comisión de Grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias, Universidad de la República, el 3 del mes 7 de 2024.

RESUMEN

Siendo una de las problemáticas más grandes a nivel mundial, el cáncer, es una de las patologías más estudiadas y actualmente existen diversas formas de diagnóstico y tratamiento disponibles. En la etapa de diagnóstico, es de conocimiento general el uso de técnicas de imagenología, así como el uso de técnicas inmuno-histoquímicas. Una vez diagnosticada la enfermedad, se pasa al uso de fármacos como los quimioterapéuticos, a la radioterapia y a la extirpación quirúrgica como primera línea de tratamiento.

En las últimas décadas, comienzan a surgir nuevas alternativas a los métodos convencionales para la detección y tratamiento del cáncer. Estas alternativas presentan ciertas ventajas ya que suelen mostrar una mayor especificidad por un blanco molecular dado. Entre dichas alternativas están los aptámeros que son oligonucleótidos cortos de ADN o ARN simple cadena. Gracias a su potencial de plegarse en muy diversas conformaciones estructurales en tres dimensiones, los aptámeros pueden producirse de forma sintética y dirigida contra virtualmente cualquier blanco de interés, tal como moléculas aisladas, células en cultivos vivos e incluso animales. Suelen ser de menor tamaño y peso molecular que otros biofármacos, lo que los convierte en excelentes candidatos para su uso en detección y tratamiento de muchas enfermedades y patologías distintas.

Entre las diferentes alteraciones físicas, bioquímicas y fisiológicas que experimentan las células cancerígenas, varios tipos de cáncer manifiestan una sobreexpresión del receptor Tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Aprovechando esta característica y el extenso conocimiento que existe sobre HER2, el grupo de Aptámeros de la Facultad de Ciencias seleccionó cuatro aptámeros que se unen con alta afinidad a la porción extracelular de HER2 en solución. Este trabajo de tesis se centró en tomar dichos aptámeros, denominados F17, F21, F23 y F30, y llevar a cabo su caracterización. Para esto nos basamos en ensayos comparativos de viabilidad celular, de citotoxicidad, de afinidad y llevamos adelante un análisis de la estructura 3D, flexibilidad y características de unión aptámero-blanco molecular. Los resultados muestran características interesantes para el aptámero F21, que tendrán que ser confirmadas con más estudios.

ÍNDICE

A. Antecedentes generales	7
1. Introducción al cáncer	7
1.1 Definición y epidemiología	7
1.2 Causas	10
1.3 Diagnóstico	12
1.3.1 Imagen por tomografía computarizada	13
1.3.2 Imagen por resonancia magnética	13
1.3.3 Imagen por tomografía de emisión de positrones	14
1.3.4 Tomografía de emisión de fotón único	14
1.3.5 Imagen por ultrasonido	15
1.3.6 Identificación de biomarcadores	17
1.4 Tratamiento	20
1.4.1 Cirugía	21
1.4.2 Quimioterapia	22
1.4.3 Radioterapia	23
1.4.4 Terapias con biofármacos	24
2. Cáncer de mama	27
2.1 Epidemiología y clasificación de subtipos	27
2.2 Diagnóstico en cáncer de mama	29
2.3 Tratamiento de cáncer de mama	30
3. Receptor de crecimiento epidérmico de tipo 2	32
3.1 Familia EGFR	32
3.2 Receptor HER2	34
3.3 Terapias anti-HER2	34
4. Aptámeros	37
4.1 Aptámeros reportados	43
4.2 Antecedentes experimentales	43
B. Antecedentes metodológicos	45
1. Ensayos de viabilidad celular	45
2. Resonancia de plasmon superficial	47
3. Bioinformática estructural y dinámica molecular de ADN	49
3.1 Predicción de estructuras secundarias de oligonucleótidos	49
3.2 Predicción de estructuras terciarias de oligonucleótidos	50
3.3 Dinámica molecular de ADN	51
3.4 Herramientas de <i>Docking</i> Molecular	54
C. Hipótesis y objetivos de trabajo	55
1. Hipótesis	55
2. Objetivo general	55
3. Objetivos específicos	55
D. Materiales y métodos	56
1. Ensayos de viabilidad celular	56
1.1 Ensayos comparativos	58

1.2 Ensayos de citotoxicidad	61
2. Resonancia de plasmon superficial	62
3. Análisis bioinformático y modelado molecular	63
3.1 Predicción de estructuras secundarias de oligonucleótidos	64
3.2 Predicción de estructuras terciarias para oligonucleótidos	64
3.3 Dinámica molecular de ADN	65
3.4 Herramientas de <i>Docking</i> molecular	66
E. Resultados	67
1. Ensayos de viabilidad comparativos	67
1.1 Resultados para la Línea celular BT474 (++++)	67
1.2 Resultados para la Línea celular MDA-MB-231 (+)	68
2. Ensayos de citotoxicidad	69
2.1 Resultados para la Línea celular BT474 (++++)	69
2.2 Resultados para la Línea celular MDA-MB-231 (+)	70
3. Resonancia de plasmon superficial	72
4. Predicción estructural y modelado molecular	73
4.1 Predicción de la estructura secundaria 2D	73
4.2 Predicciones estructurales 3D del aptámero F21	75
4.3 Dinámica molecular del aptámero F21	76
4.4 Evaluación de las estructuras de HER2 en el PDB	79
4.5 <i>Docking</i> molecular F21C-HER2	82
F. Discusión y conclusiones	87
G. Bibliografía	89
H. Lista de tablas y figuras	100
I. Glosario de acrónimos	102
J. Agradecimientos	107

A. ANTECEDENTES GENERALES

1. Introducción al cáncer

1.1 Definición y epidemiología

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se origina en la activación de oncogenes y la desactivación de genes supresores de tumores, produciendo crecimiento celular descontrolado y la invasión de tejidos a distancia conocida como metástasis. La metástasis requiere una disminución en la regulación de los receptores de adhesión celular necesarios para la unión célula-célula específica en un tejido, así como la regulación al azar de los receptores que mejoran la motilidad celular (S. Sarkal 2013).

En el año 2000, Douglas Hanahan y Robert Weinberg recopilaron los conceptos claves que caracterizan el cáncer. Estos son: la señalización proliferativa sostenida de las células tumorales, la resistencia a la muerte, la desregulación a nivel celular de los procesos energéticos, la activación de los mecanismos de invasión y metástasis, la inmortalidad replicativa, la inducción de la angiogénesis, la posibilidad de evadir la respuesta inmune por parte de las células tumorales y la evasión de supresores de crecimiento. Todos estos aspectos tienen como base la inestabilidad del genoma, las mutaciones en el mismo y el hecho de que los tumores promueven procesos inflamatorios (ver Figura 1).

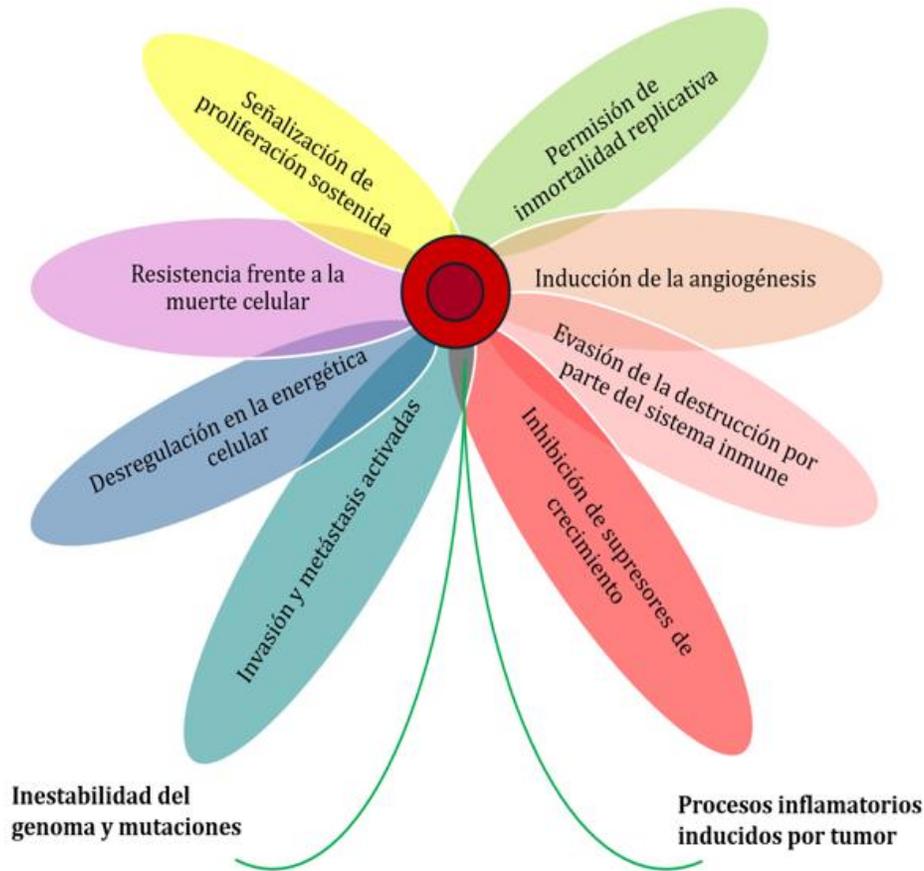


Figura 1: Diversos factores que caracterizan el cáncer. Representaci3n de la “flor” de marcadores con los factores que caracterizan que una c3lula sea tumoral (Traducido y adaptado de S. Senega 2021).

Sasi S. Senega y Richard P. Grose presentan cuatro aspectos nuevos fundamentales basados en el lenguaje que utilizan las c3lulas cancerosas para interactuar con el microambiente y as3 facilitar su proliferaci3n y supervivencia. La des-diferenciaci3n y transdiferenciaci3n, la desregulaci3n epigen3tica, la alteraci3n del microbioma y la alteraci3n de se3ales neuronales (S. Senega 2021).

El c3ncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. En el a3o 2020, casi 10 millones de personas fallecieron por esta causa (J. Ferlay 2020). Los tipos de c3ncer m3s comunes en dicho a3o, en t3rminos de nuevos casos de c3ncer, fueron, como se observa en la figura 2:

- mama (2,26 millones de casos)
- pulmón (2,21 millones de casos)
- colon y recto (1,93 millones de casos)
- próstata (1,41 millones de casos)
- piel (no melanoma) (1,20 millones de casos)
- estómago (1,09 millones de casos)

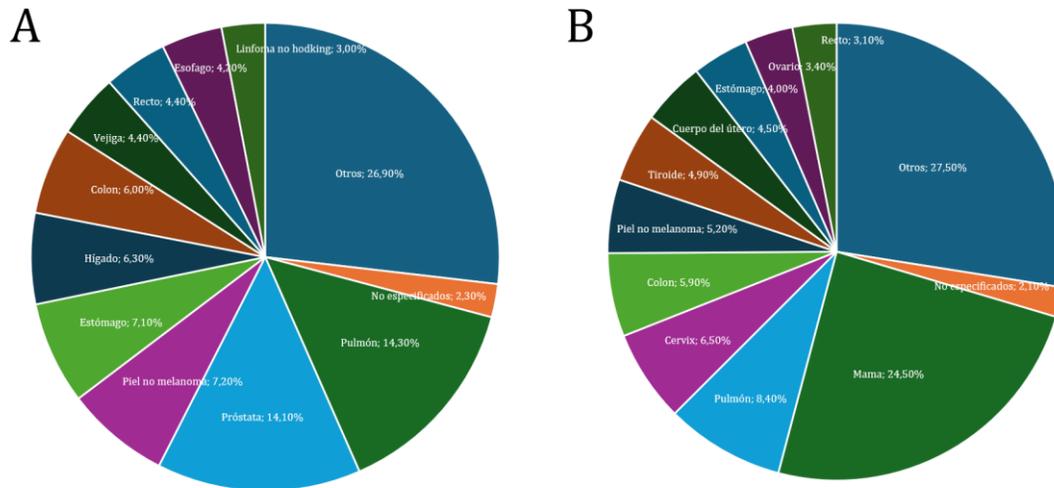


Figura 2: Casos de cáncer más comunes en 2020. (A) Gráfico de porcentaje de incidencia de distintos tipos de cáncer en hombres. (B) Igual que (A) para mujeres. (Traducido y adaptado de Ferlay 2020).

Mientras que las causas más comunes de muerte por cáncer en 2020 fueron:

- pulmón (1,80 millones de muertes)
- colon y recto (916 000 muertes)
- hígado (830 000 muertes)
- estómago (769 000 muertes)
- mama (685 000 muertes)

1.2 Causas

En forma general se asocian varios factores de riesgo como posibles causantes de esta enfermedad. Entre estos, encontramos el consumo de tabaco, el consumo de alcohol, la falta de actividad física y dietas poco saludables. Aun así, el cáncer es muy heterogéneo y no es posible adjudicar los motivos recién enumerados como únicos causantes de cáncer. Se destaca también como posibles causantes los carcinógenos ocupacionales, como por ejemplo las aminas aromáticas y otros compuestos capaces de generar afectación en nuestro organismo. Se debe tener en cuenta también la exposición a agentes biológicos. Un claro ejemplo de esto fue el descubrimiento entre la relación del virus del papiloma humano, conocido por sus siglas en inglés como VPH, y la predisposición al cáncer de cuello de útero (P. Vinelis 2014).

Es así que podemos decir que la transformación de una célula normal en una célula tumoral surge como resultado de la interacción entre los factores genéticos de una persona y tres categorías de agentes externos, que incluyen:

- cancerígenos físicos, como la radiación ultravioleta la radiación ionizante.
- carcinógenos químicos, como el asbesto, los componentes del humo del tabaco, el alcohol, la aflatoxina (uno de los muchos posibles contaminante de los alimentos) y el arsénico (un contaminante del agua potable).
- carcinógenos biológicos, como infecciones por ciertos virus, bacterias o parásitos.

Además de los factores externos mencionados, también existen causas endógenas en las células que generan el crecimiento descontrolado y la diseminación. Entre ellos están las alteraciones epigenéticas, alteraciones cromosómicas, mutación y activación de oncogenes, e inactivación mutacional de supresores tumorales (ver figura 3). El envejecimiento celular es también un factor importante para destacar. A mayor edad, los procesos celulares van perdiendo su capacidad de regulación, así como el control y capacidad para eliminar posibles células tumorales que puedan surgir (S. Senega 2021).

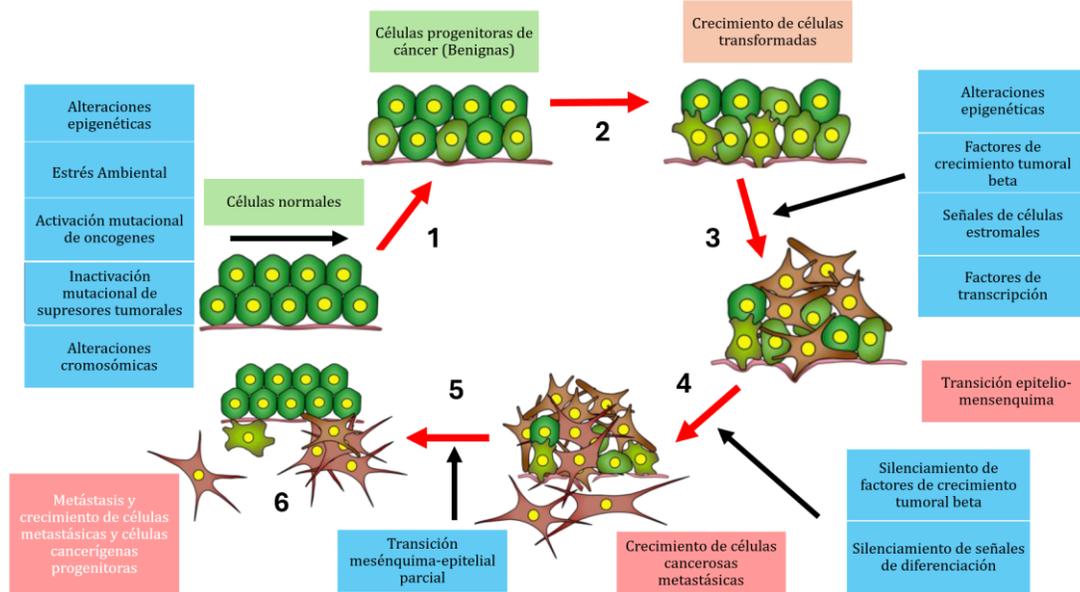


Figura 3: Esquematización de los efectos que generan las causas endógenas. Proceso general de la formación de un tumor local y las etapas que ocurren para que la metástasis se lleve a cabo (Traducido y adaptado de S. Senega 2021).

En la actualidad se están desarrollando estrategias novedosas tanto para la detección temprana de tumores primarios, como para la detección de la metástasis. Ejemplos de esto son la nanomedicina, la terapia génica, terapia fototérmica y terapia fotodinámica, así como constantes mejoras en técnicas convencionales de tratamiento como la radioterapia y en técnicas imagenológicas como son la tomografía por emisión de positrones y la resonancia magnética, como se observa en la figura 4.

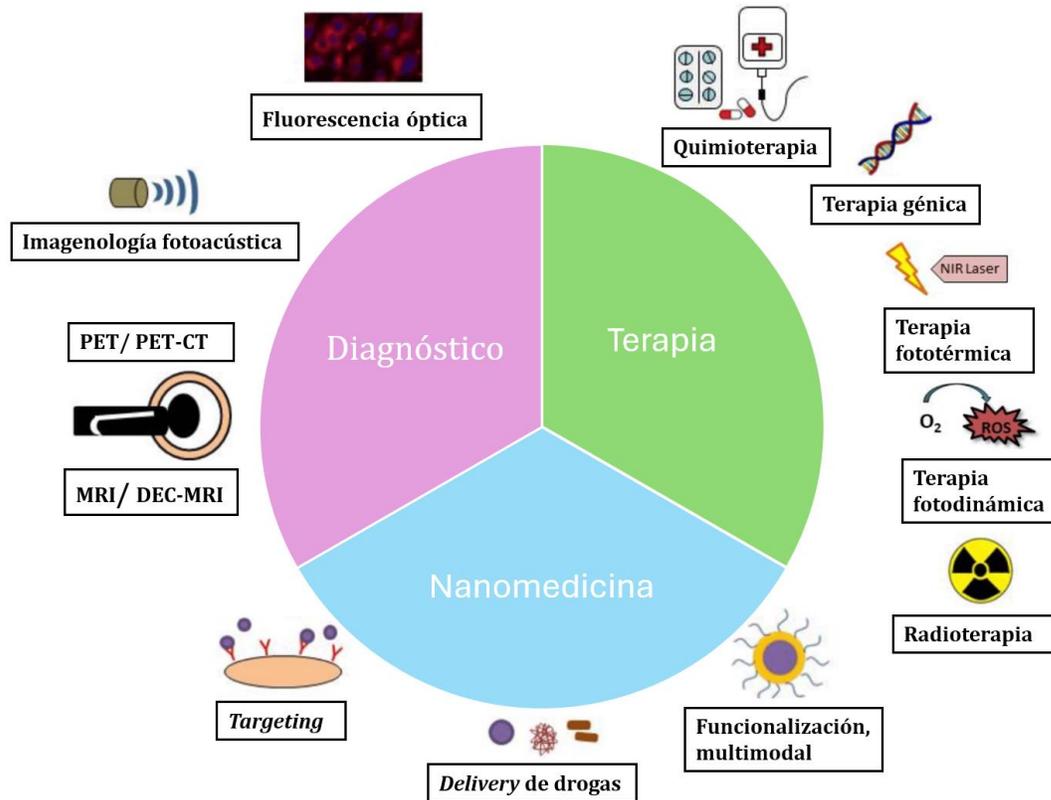


Figura 4: Esquema de diagnósticos, terapias y nanomedicina actuales. Diferentes técnicas de diagnóstico y terapia en cáncer junto con la nanomedicina como recursos innovadores actual (Traducido y adaptado de A. Bhushan 2021).

1.3 Diagnóstico

Actualmente existe una gran variedad de técnicas para el diagnóstico del cáncer en diferentes estadios de desarrollo de la enfermedad. Las técnicas han avanzado y han sido perfeccionadas en el correr de las décadas, no solo para el diagnóstico primario de la enfermedad sino también para el correcto seguimiento de dicha patología. Muchas de ellas son técnicas de imagenología no invasivas y por lo tanto de amplia utilización en pacientes con cáncer o sospechas de este.

Se utiliza ampliamente la imagen por resonancia magnética conocida por sus siglas en inglés MRI, la tomografía computarizada, conocida por sus siglas en inglés como CT, la tomografía por emisión de positrones, conocida por sus siglas en inglés como PET, e imágenes generadas con ultrasonido, entre otros. Existen también técnicas más invasivas como las técnicas endoscópicas que además de brindar imágenes de cavidades internas, también permiten la extracción de muestras de tejido para su posterior análisis sin la necesidad de pasar posteriormente por una cirugía.

1.3.1 Imagen por tomografía computarizada

En la CT, se obtiene un conjunto de imágenes mediante el uso de rayos X. Las imágenes del conjunto son luego superpuestas una encima de la otra para crear una imagen tridimensional de la zona del cuerpo que quiere ser estudiada. En esta técnica, un tubo generador produce un haz estrecho de rayos X que atraviesa al paciente y es captado por una fila de detectores al otro lado. El tubo y los detectores están colocados en lados opuestos de un anillo que gira alrededor del paciente. Después de cada rotación, el escáner debe detenerse y girar en la dirección opuesta. Cada rotación adquiere una imagen axial, normalmente con un espesor de corte de 1 cm, y tarda aproximadamente 1 segundo por rotación. La mesa mueve al paciente una distancia determinada a través del escáner entre cada corte. Existen variantes de esta técnica que generan imágenes a partir de haces de rayos únicos alrededor del paciente (escáner espiral) y múltiples haces de rayos alrededor del paciente (escáner *multislice*) (C. Garvey 2002).

1.3.2 Imagen por resonancia magnética

La MRI, utiliza las propiedades magnéticas naturales del cuerpo para producir imágenes detalladas de cualquier parte. En la obtención de imágenes se suele sacar ventaja de las propiedades magnéticas que tienen los núcleos de hidrógeno presentes en toda la materia, pero particularmente abundantes en agua y grasa. Esto permite obtener buenas imágenes de tejidos blandos que otras técnicas muestran con menor precisión.

El protón de hidrógeno se comporta como una pequeña barra magnética. En circunstancias normales, estas “barras magnéticas” de protones de hidrógeno giran en el cuerpo con sus ejes alineados aleatoriamente. Cuando el cuerpo se coloca en un campo magnético fuerte, como un escáner de resonancia magnética, todos los ejes de los protones se alinean. Esta alineación uniforme crea un vector magnético orientado a lo largo del eje del escáner de resonancia magnética. Cuando se agrega energía adicional (en forma de onda de radio) al campo magnético, el vector magnético se desvía. La frecuencia de las ondas de radio (RF) que hace resonar los núcleos de hidrógeno depende del elemento buscado (hidrógeno en este caso) y de la fuerza del campo magnético. La fuerza del campo magnético se puede alterar electrónicamente de la cabeza a los pies utilizando una serie de bobinas eléctricas de gradiente y, al alterar el campo magnético local en estos pequeños incrementos, diferentes partes del cuerpo resonarán a medida que se apliquen diferentes frecuencias. Cuando se apaga la fuente de radiofrecuencia, el vector magnético vuelve a su estado de reposo, lo que provoca que se emita una señal (también una onda de radio). Es esta señal la que se utiliza para crear las imágenes que logran definir bien tejidos blandos, principalmente. Se utilizan bobinas receptoras alrededor de la parte del cuerpo que actúan como antenas para mejorar la detección de la señal emitida (A. Berger 2002).

La MRI, tiene varias ventajas sobre las imágenes por CT, incluida la velocidad de obtención de imágenes, la no utilización de radiación ionizante, la capacidad de identificar las características del tejido y el potencial para obtener información sobre diferentes núcleos como carbono, nitrógeno y fósforo (E. Van Beek 2009).

1.3.3 Imagen por tomografía por emisión de positrones

La técnica imagenológica PET es una técnica de imagenología nuclear, en donde se administra al paciente un radiofármaco emisor de positrones. La ¹⁸F-fluorodesoxiglucosa, conocida por sus siglas en inglés como FDG, es uno de los radiofármacos más utilizados para diagnóstico por imagenología molecular para detectar tumores pequeños, monitorear la respuesta al tratamiento y predecir el pronóstico de los pacientes en una variedad de tipos de cáncer. Esta técnica se basa en evaluar el metabolismo de la glucosa en los tejidos mediante la medición del radiotrazador acumulado, un análogo de la glucosa (K. Kawada 2016).

1.3.4 tomografía de emisión de fotón único

Existen otros radiofármacos emisores de positrones para el diagnóstico del cáncer, así como otras técnicas de imagenología nuclear. Un ejemplo de esto es la tomografía de emisión de fotón único conocido por sus siglas en inglés como SPECT. Esta técnica produce una imagen tridimensional de la distribución de un marcador radiactivo inyectado en el torrente sanguíneo. Los isótopos más comúnmente utilizados son el tecnecio-99m, el yodo-123 y, en menor medida, el talio-201. Estos radiofármacos son absorbidos por tejidos específicos, actuando como emisores gamma convencionales. A diferencia del PET, donde se detecta la emisión de dos fotones producidos por la emisión de un positrón y su aniquilación por la colisión con un electrón, en el SPECT se identifica un solo haz de fotón emitido por el isótopo radiactivo (S. Yandrapalli 2022).

Ambas, PET y SPECT son consideradas técnicas de imagenología molecular ya que permiten visualizar, medir y/o cuantificar procesos a nivel biológico o celular a través de una imagen de alta resolución relacionada con un patrón molecular diferenciable.

La imagenología molecular se define como la caracterización y medición *in vivo* de procesos biológicos a nivel celular y molecular. A diferencia del diagnóstico por imágenes convencionales, se busca investigar e identificar anomalías moleculares que son causante o características de una enfermedad en lugar de visualizar los efectos a gran escala que producen estas alteraciones moleculares (R. Weissleder 2001).

1.3.5 Imagen por ultrasonido

La imagen por ultrasonido, o ecografía, se implementó inicialmente en el campo médico a principios de los años 60. Se basa en el principio de que las ondas de presión mecánicas con una frecuencia superior a la del oído humano (> 20 kHz) pueden penetrar en el cuerpo para obtener imágenes de los órganos internos, así como medidas estructurales y funcionales. La ecografía, es una modalidad de uso común en la rutina clínica porque tiene ventajas como su portabilidad, facilidad de adquisición, procesamiento de imágenes en tiempo real, y un bajo costo (M. Siragusa 2020).

Todas las técnicas mencionadas presentan diferencias y similitudes, así como ventajas y desventajas para la obtención de información biológica a diferentes niveles de organización, las cuales se resumen en la Tabla 1 e ilustran en la Figura 5.

Tabla 1: Características de las técnicas de imagenología más usuales. Se resumen las ventajas y desventajas de la tomografía computarizada (CT), resonancia magnética (MRI), tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT) y ultrasonido. (Traducido y adaptado de A. EL-Ghani 2015).

	CT	MRI	PET	SPECT	Ultrasonido
Característica principal	Escanea órganos utilizando rayos X y produce una serie de imágenes computacionales transversales	Produce "rebanadas" que representan el cuerpo humano mediante la aplicación de una señal magnética	Es una técnica de imagen nuclear donde se utilizan trazadores para diagnosticar enfermedades	Técnica no invasiva donde se estructuran imágenes transversales de un radiotrazador dentro del cuerpo humano	Técnica basada en ondas sonoras que posee una alta frecuencia temporal y es capaz que producir información diagnóstica cuantitativa y cualitativa.
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Amplio campo de visión - Detección de diferencias sutiles entre tejidos corporales - La adquisición tomográfica elimina la superposición de imágenes de la estructura superpuesta - Resolución espacial alta - Alta profundidad de penetración 	<ul style="list-style-type: none"> - Resolución más alta - Capaz de mostrar detalles anatómicos - No utiliza ningún tipo de ionización - No se observan efectos a corto plazo 	<ul style="list-style-type: none"> - Efectivo para diferenciar entre tumores benignos y malignos en una sola imagen - Puede dar imágenes de fenómenos bioquímicos y fisiológicos - Alta sensibilidad 	<ul style="list-style-type: none"> - Imagen libre de background - Confirma enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson - Alta sensibilidad (menor que la del PET) - Alta profundidad de penetración 	<ul style="list-style-type: none"> - Alta resolución espacial - Bajo costo - Perfil seguro - No invasiva - Ampliamente disponible - Fácil de usar - No utiliza radiación
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilidad limitada - Utiliza radiación - Alta dosis de exposición por examen - No específico de algún tejido - Pobre contraste de tejidos blandos 	<ul style="list-style-type: none"> - Fuerte perturbación del campo magnético - No puede ser utilizado en pacientes con dispositivos metálicos - Alto costo - Bajo rendimiento 	<ul style="list-style-type: none"> - Limitada resolución espacial - Uso de radiación - Alto costo - Es la técnica más costosa - Los artefactos de movimiento causan serios problemas - Mejor resolución en comparación con CT y MRI - Difícil interpretación - La cantidad de componentes radioactivos disponibles es limitada 	<ul style="list-style-type: none"> - Se producen efectos borrosos - La compensación de atenuación no es posible debido a la dispersión múltiple de electrones - No puede predecir deficiencias neurofisiológicas - Utiliza radiación 	<ul style="list-style-type: none"> - Es dependiente del operador - Imagen limitada a compartimentos vasculares - Dificultad en las imágenes de huesos y pulmones - Resolución limitada - La atenuación puede reducir la resolución de las imágenes - Se refleja muy fuertemente el pasar del tejido al gas o viceversa
Contraste	Alto	alto	-	-	-
Aplicación	Anatómica y funcional	Anatómica, funcional y molecular	Funcional, metabólica y molecular	Funcional	Anatómica y funcional
Costo	Intermedio	Intermedio	Alto	Alto	bajo
Fuente de radiación y tipo	Rayos X (Ionizante)	Eléctrico y campo magnético (No ionizante)	Positron (Ionizante)	Fotón (ionizante)	Ondas sonoras (No ionizante)

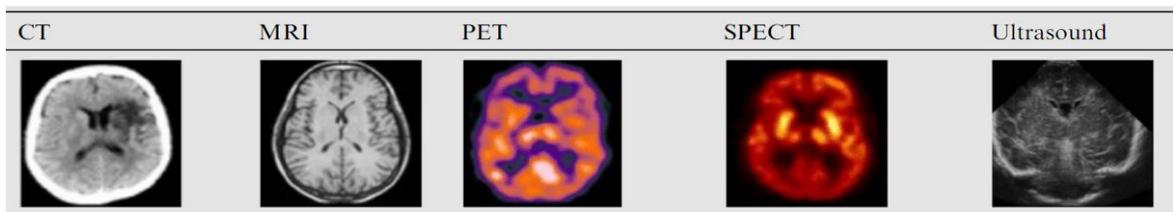


Figura 5: Imágenes obtenidas por diferentes metodologías del cerebro de un paciente. Imágenes tomadas mediante las técnicas CT, MRI, PET, SPECT y ultrasonido de izquierda a derecha (A. EL-Ghani 2015).

1.3.6 Identificación de biomarcadores

Según el Instituto Nacional del Cáncer, conocido por sus siglas en inglés NCI, los biomarcadores se definen como: “una molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros fluidos o tejidos corporales y que proporciona información sobre un proceso normal o anormal, o de una condición o enfermedad”, como el cáncer. Los biomarcadores suelen distinguir a un paciente de un individuo sano. Numerosas variables, incluidas mutaciones somáticas o de la línea germinal, cambios transcripcionales y modificaciones postraduccionales, podrían causar los cambios. Los biomarcadores existen como proteínas (como una enzima o un receptor), ácidos nucleicos (ARN mensajeros (conocidos por sus siglas en inglés como mRNA) u otros ARN no codificantes (conocidos por sus siglas en inglés como ncRNA)), anticuerpos y hormonas, entre otros (N. Henry 2012).

Los biomarcadores de origen proteicos usados para la detección del cáncer, surgen generalmente de las células cancerosas u otras células como resultado del cáncer y han demostrado ser blancos moleculares atractivos para el diagnóstico temprano, el seguimiento de la respuesta al tratamiento, la detección de recurrencia o el seguimiento del pronóstico del cáncer (C. Borrebaeck 2017).

En la actualidad hay 19 biomarcadores proteicos oficialmente aprobados por la administración de alimentos y medicamentos, conocida por sus siglas en inglés como FDA (ver Tabla 2). De todos ellos, el antígeno prostático específico (conocido por sus siglas en inglés como PSA), el antígeno carcinoembrionario (conocido por sus siglas en inglés como CEA), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (conocido por sus siglas en inglés como HER2) y el antígeno de carbohidratos (conocidos por sus siglas en inglés como CA) se consideran muy importantes (T. Thenrajan 2023).

Tabla 2: Biomarcadores proteicos. Listado de los 19 biomarcadores proteicos aprobados por la FDA (Traducido y adaptado de Thenrajan 2023).

Numero	Nombre del marcador	Tipo de cáncer
1	AFP	Testicular
2	Beta- hGC	Testicular
3	CA 19-9	Pancreático
4	CA 125	De ovario
5	CA 15.3	Mamario
6	CA 27.9	Mamario
7	CEA	Colorrectal
8	FDP	De Vejiga
9	HE4	Ovario
10	PSA	Próstata
11	TG	Tiroideo
12	EGFR	Colorrectal
13	KIT	Gastrointestinal
14	ER	Mamario
15	PR	Mamario
16	HER2	Mamario
17	NMP/22	De vejiga
18	BTA	De vejiga
19	Mw CEA	De vejiga

La identificación de biomarcadores, ya sean proteicos, ácidos nucleicos o glucídicos entre otros, conlleva la aplicación de diferentes técnicas específicas. Para la detección de marcadores proteicos es de amplio uso las técnicas de inmunohistoquímica, conocida por sus siglas en inglés como IHC.

En el caso de los ácidos nucleicos las técnicas de hibridación in-situ fluorescente, conocida por sus siglas en inglés como FISH (ver figura 6), para buscar secuencias específicas en cromosomas, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, conocida por sus siglas en inglés como PCR, para amplificar regiones particulares y la secuenciación masiva para encontrar anomalías en el genoma son técnicas muy utilizadas (N. He 2022).

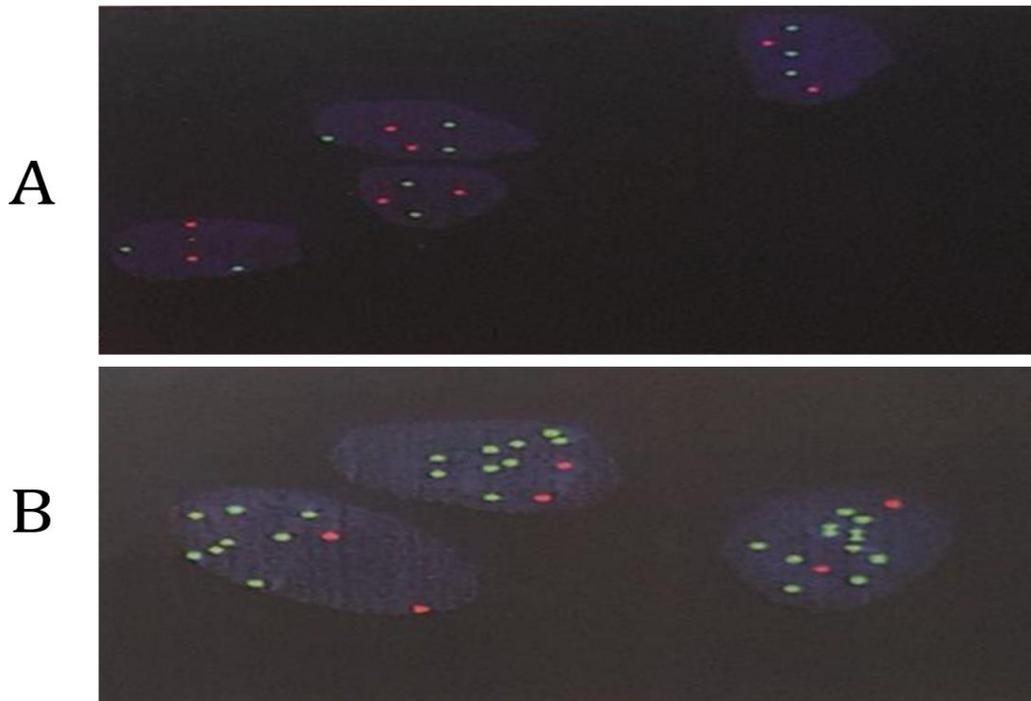


Figura 6: Imágenes de hibridación in-situ fluorescente (FISH). Se observan una muestra amplificada para el gen *HER2* utilizando sondas anti-*HER2* y el centrómero del cromosoma 17 (en rojo). En A se observa la imagen del núcleo con únicamente dos señales verdes, en la B se observa amplificado con mayor número de señales en las células tumorales (M. Aznab 2022).

La IHC (ver figura 7), es una técnica potente que aprovecha la unión específica entre un anticuerpo y un antígeno para detectar y localizar antígenos específicos en células y tejidos, que se detectan y examinan más comúnmente con el microscopio óptico. Una herramienta estándar en muchos campos de investigación, la IHC se ha convertido en una técnica auxiliar esencial en el diagnóstico clínico de patologías anatómicas. La IHC se utiliza con frecuencia para ayudar en la clasificación de neoplasias, la determinación del sitio de origen de un tumor metastásico y la detección de pequeños focos de células tumorales que pasan desapercibidos en la tinción de rutina con hematoxilina y eosina (H&E). Además, se utiliza cada vez más para proporcionar información predictiva y para el pronóstico, como en pruebas de amplificación de *HER2* en cáncer de mama (S. Magaki 2020).

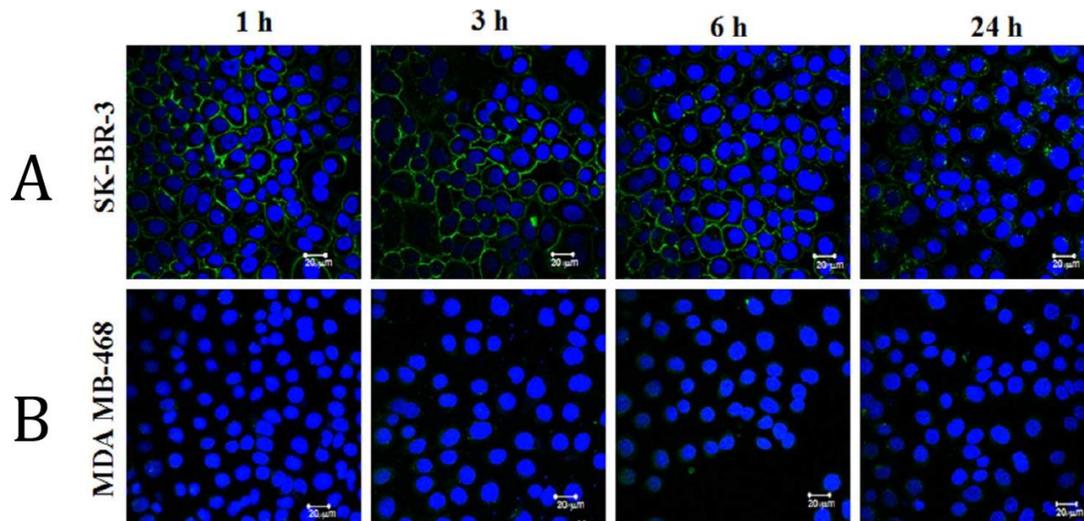


Figura 7: Microscopía confocal de células HER2 positivas y HER2 negativas expuestas a ZHER2-DyLight-488. En el panel superior (A) se observan la línea células SK-BR-3 HER2+ y en el panel inferior (B) la línea celular MDA-MB-468 HER2- ambas expuestas a Z_{HER2}-DyLight-488 (Un Affibody que es una proteína producida de forma artificial, unida a un fluoróforo llamado DyLight-488). Es posible observar el proceso de unión y disociación de la molécula al receptor HER2 en un lapso de 24 horas en las células HER2+ mientras que en las negativas no se observa señal de fluorescencia (R. Zielinski 2012).

Hoy en día, los métodos más habituales para detectar HER2 son el ensayo de inmunohistoquímica (IHC) y la hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Sin embargo, estos dos métodos tienen algunas deficiencias en la detección del contenido de HER2 y consumen mucho tiempo y son costosos, porque requieren muestras de tejido de alta calidad y métodos de medición complejos. Para detectar concentraciones bajas de HER2 y otros marcadores de cáncer, se necesita con urgencia un nuevo método con respuesta rápida, alta sensibilidad y operación conveniente (N. He 2022).

1.4 Tratamiento

Existen muchas formas de tratar el cáncer una vez diagnosticado. A principios del siglo XIX era comúnmente utilizada la cirugía radical, es decir, la extirpación completa de una parte del cuerpo, como método principal de tratamiento. Un claro ejemplo de esto era la mastectomía radical que se utilizó para tratar el cáncer de mama durante aproximadamente 90 años, entre 1891 y 1981. El uso de esta práctica se redujo luego de que la cirugía local en combinación con terapia adyuvante sistémica probara resultados similares.

Cuando hablamos de terapias adyuvantes nos referimos a la radioterapia y la aplicación de fármacos, las cuales son necesarias para el tratamiento no solo del tumor en cuestión,

sino para tratar y prevenir la diseminación y metástasis del cáncer. A finales de los 70, fármacos como la bleomicina, la vinblastina y el cisplatino eran considerados fármacos novedosos en quimioterapia; sin embargo, producían efectos secundarios graves que resultaban difíciles e incluso imposibles de controlar (V. Schirmacher 2019).

1.4.1 Cirugía

La cirugía es la modalidad más antigua de terapia contra el cáncer y todavía constituye la base del tratamiento de los tumores sólidos. Actualmente e incluso dentro de la terapia multimodal contra el cáncer, la mayoría de los pacientes con este tipo de tumor necesitan atravesar por un proceso de intervención quirúrgica. Muchas veces la cirugía se realiza no solamente para el tratamiento en sí, sino para una reconfirmación de estudios previamente realizados y para determinar los siguientes pasos del tratamiento, por ejemplo, realizando pruebas de caracterización del tumor extraído por anatomía patológica. La cirugía es más eficaz en el tratamiento del tumor primario localizado y los ganglios linfáticos regionales asociados. Inicialmente el enfoque se mantenía en la remoción macroscópica del tumor, pero con los años se descubrió que, debido a remanentes de células tumorales en las periferias de los tumores, la tasa de reincidencia era muy alta (R. Pollock 2003).

Mencionamos hasta ahora la extirpación manual de los tumores, pero en los últimos años se han desarrollado otras modalidades de extracción. El desarrollo de métodos robóticos y laparoscópicos ha sido un enorme avance tanto en la modalidad de la extracción de los tumores como en la precisión. Actualmente se utilizan tres categorías principales de sistemas quirúrgicos robóticos: sistemas activos, semiactivos y maestro-esclavo. Los sistemas activos funcionan esencialmente de forma autónoma y llevan a cabo tareas preprogramadas como por ejemplo las plataformas PROBOT y ROBODOC. En sistemas semiactivos, el componente ya programado de estos equipos robóticos se puede complementar con un componente manual del cirujano como por ejemplo en las plataformas da Vinci® y ZEUS y estos sirvieron como prototipos para sistemas formales maestro-esclavo, que están libres de funciones preprogramadas o autónomas (S. Bramhe 2022).

1.4.2 Quimioterapia

La quimioterapia utiliza compuestos tóxicos y medicamentos para destruir las células cancerosas y funciona principalmente evitando que las células cancerosas crezcan y se dividan. Las células cancerosas se dividen y crecen a un ritmo mucho más acelerado que las células normales y fisiológicamente tienen un estrés endógeno mucho más alto. Por lo tanto, los fármacos pueden destruirlas de forma más rápida y eficaz en comparación con otras células circundantes. La selección de medicamentos quimiopreventivos o una combinación de medicamentos se basa principalmente en el tipo y estadio del cáncer. Algunas de las terapias inhibitorias actuales para tratar cánceres sólidos son:

- Inhibidores de la poliadenosina difosfato-ribosa polimerasa
- Inhibidores de la angiogénesis
- Inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC)
- Inhibidores del objetivo mecanicista de la rapamicina (mTOR)
- Inhibidores de la poli (adenosina difosfato-ribosa) polimerasa (PARP)
- Inhibidores del homólogo doble minuto 2 de p53/ratón (MDM2)
- Bloqueadores de la vía *hedgehog*
- Inhibidores de la tirosina quinasa
- Inhibidores del proteosoma

Al igual que en el tipo de intervención quirúrgica o en la intensidad y duración de la radioterapia, el conjunto de fármacos que se utilicen dependerá de del tipo de tumor, su localización y caracterización, así como si se trata de un tratamiento contra un tumor primario o un estadio metastásico (U. Anand 2023).

Estos abordajes de terapias, a pesar de haber demostrado su efectividad y de seguir siendo perfeccionados hoy en día, siguen presentando grandes problemas. El principal es la generación de grandes efectos secundarios, muchas veces con niveles de riesgos de muerte muy altos para un paciente que, luego de ser sometido paulatinamente a estos tratamientos, se encuentra con su sistema inmunológico debilitado. Por otro lado, estamos hablando de métodos terapéuticos que, en su gran mayoría, no presentan especificidad contra las células tumorales que se busca destruir y atacan también células que son sanas (M. Amjad 2023).

Al igual que en imagenología, se están desarrollando terapias nuevas, principalmente basadas en biofármacos para lograr un tratamiento más específico y dirigido contra las células tumorales con la finalidad de no dañar, o dañar lo menos posible, el resto del organismo.

1.4.3 Radioterapia

En la radioterapia se utilizan rayos X o partículas subatómicas, usados principalmente para el tratamiento del cáncer. Esta técnica se puede aplicar de forma externa como interna. La radiación de haz externo, conocida como teleterapia, es la más común e involucra una fuente radiactiva fuera del paciente, con la energía del haz enfocada y modulada hacia el área a tratar. Por otro lado, la braquiterapia se refiere a la práctica de colocar fuentes radiactivas naturales que se desintegran con el tiempo y producen altas dosis de radiación en un área focal. Los ejemplos incluyen procedimientos intracavitarios (como la colocación en tándem y ovoide para el cáncer de cuello uterino), la colocación de semillas radiactivas intersticiales (comúnmente utilizadas para el cáncer de próstata) o la colocación superpuesta a un tumor cutáneo. La forma más común de radiación ionizante es el fotón, pero también se suele utilizar electrones para aumentar la dosis de radiación que recibe la piel cuando es necesario.

Se pueden utilizar partículas menos frecuentes, como protones, iones de carbono o neutrones, pero usando equipos y procedimientos más costosos y que solo se encuentran en centros especializados. El principio de esta técnica se basa en las diferencias en las interacciones del ADN en una célula cancerosa frente a las de una célula normal.

La catástrofe mitótica es la principal forma de muerte celular inducida por radiaciones ionizantes. Por lo tanto, la radiosensibilidad de una línea celular depende de su tasa de división celular. En general, las células tumorales poco diferenciadas son más radiosensibles ya que una mayor proporción de su población celular se está dividiendo al mismo tiempo. Esto también se aplica a las células de tejidos normales que se dividen rápidamente, como las de la mucosa gastrointestinal, y explica por qué reacciones como la mucositis y la diarrea pueden ser comunes. Es decir, el efecto de la radiación ionizante dependerá de varios factores biológicos como la redistribución de las células en un ciclo celular coordinado, la reparación del ADN, la repoblación celular y la oxigenación de áreas hipóxicas del tumor (E. Maani 2022).

1.4.4 Terapias con biofármacos

Los biofármacos son productos farmacéuticos de origen biológico o fabricados a partir de material biológico. La cantidad de medicamentos biológicos disponibles es amplia entre las cuales se incluyen sustancias aisladas de material biológico, moléculas de ARN recombinante, ADN, proteínas, así como anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos o conjugados anticuerpo-fármaco (J. Wohlrab 2019). En los últimos años, la terapia con anticuerpos monoclonales (conocidos por sus siglas en inglés como mAb) y terapia celular, tal como se muestra en la Tabla 3 y Figura 8 han revolucionado el tratamiento oncológico y están siendo explorados varios enfoques novedosos. Son enfoques dirigidos estricta y específicamente contra la célula tumoral. Existe también la terapia que involucra virus oncológicos, productos celulares, citoquinas modificadas, vacunas y terapia celular adoptiva (A. Tsimberidou 2020). Más recientemente fue aprobada la terapia celular que consiste en células T transfectadas con un receptor quimérico específico de antígeno (CAR) (Células CAR-T) (V. Schirmacher 2019).

Tabla 3: Clasificaciones de terapias farmacológicas. Terapias actuales en base a su estructura y naturaleza química (Columnas 1 y 2), mecanismo de acción (columna 3) y ejemplos de fármacos disponibles actualmente (columna 4) y clasificación en niveles según sus efectos secundarios del 1 al 4 siendo 1 efectos secundarios ausentes o mínimos hasta 4 donde los efectos secundarios son muy graves (columnas 5). (Traducido y adaptado de V. Schirmacher 2019)

Tipo de terapia	Quimioterapia (Q) o terapia biológica (B)	Mecanismo de acción	Ejemplos	Efectos secundarios
Fármacos citostáticos	Q	Interferencia con proliferación celular		1 - 4
Inhibidores de moléculas pequeñas	Q	Terapia dirigida: interfiere con la transducción de señales oncogénicas	Sunitinib, Imatinib, Sorafenib, Lapatinib	1 - 4
mAb antitumorales	B	Inmunoterapia dirigida	Cetuximab, Trastuzumab, Panitumumab	1 - 3
mAb antiangiogenesis	B	Inhibición de angiogénesis	Bevacizumab, Ramucirumab	1 - 3
mAb inhibidores de puntos de control	B	Regulación inmune	Ipilimumab, Atezolizumab, Druvalumab	1 - 4
Células CAR-T	B	Linfocitos T citotóxicos dirigidos		1 - 3
Vacunas anti-tumorales	B	Vacuna específica activa		0 - 2
Virus oncolíticos	B	Oncolisis, inducción de muerte celular inmunogénica	Virus de ARN incluido el virus de la enfermedad de Newcastle de cepas naturales atenuadas	0 - 2

Otra gran área que se encuentra en desarrollo exponencial es el área de la terapia génica. Los avances tecnológicos han permitido la síntesis química de una gran variedad de ácidos nucleicos. El hecho de poder mezclar la versatilidad funcional de los ácidos nucleicos con la capacidad de sintetizarlos según sea necesario, ofrece oportunidades ilimitadas para desarrollar ácidos nucleicos funcionales.

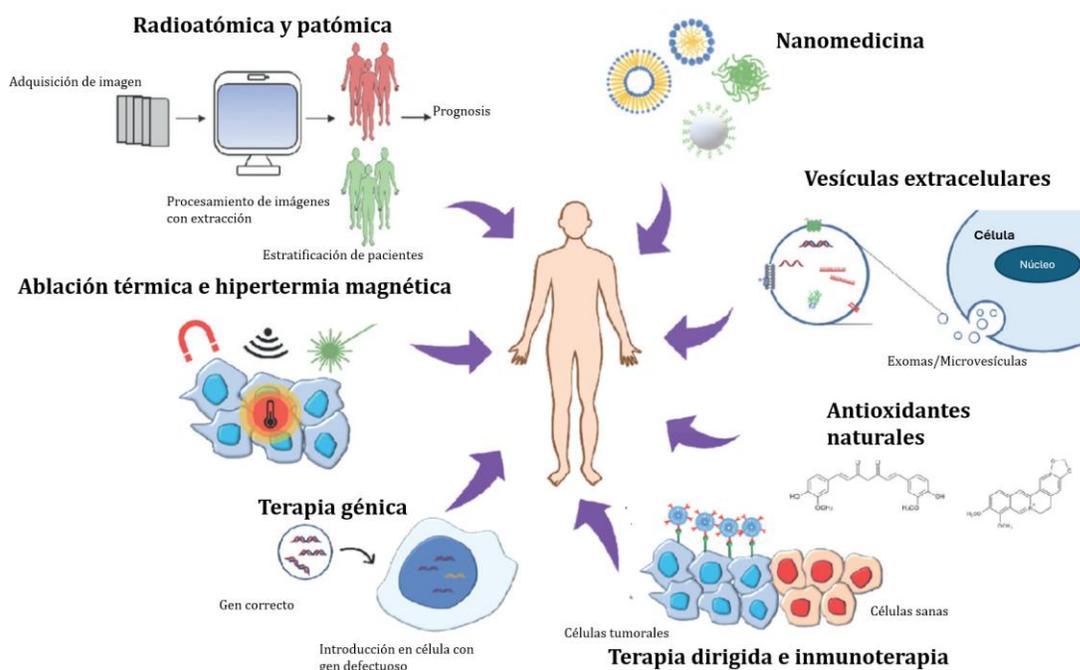


Figura 8: enfoque de terapias contra el cáncer. Representación de las estrategias más innovadoras para el tratamiento de cáncer, combinando diferentes disciplinas para obtener la terapia más eficiente y personalizada para el paciente (Traducido y adaptado de C. Pucci 2019)

La terapia contra el cáncer es un campo emergente en el que las terapias con ácidos nucleicos tienen un enorme potencial. Por ejemplo, a través del silenciamiento de genes mediado por ARN de interferencia (conocidos por sus siglas en inglés como iRNA), se han explorado intervenciones terapéuticas que utilizan pequeños ARN de interferencia (conocidos por sus siglas en inglés como siRNA) o pequeños ARN en horquilla (conocidos por sus siglas en inglés como shRNA) que pueden inhibir la producción de una proteína patológica para la inmunoterapia contra el cáncer. También se han estudiado otros tipos de terapias con ácidos nucleicos, como oligonucleótidos antisentido, aptámeros, ADN/ARN inmuno-estimulantes, plásmidos, ARN mensajeros (conocidos por sus siglas en inglés como mRNA) y, más recientemente, sistemas de edición de genes CRISPR/Cas9 para la inmunoterapia contra el cáncer (T. Shen 2020).

A continuación, se muestra una ejemplificación de los posibles usos de las terapias con ácidos nucleicos basados en una célula presentadora de antígeno, un linfocito T y una célula tumoral como blanco de tratamiento (ver figura 9).

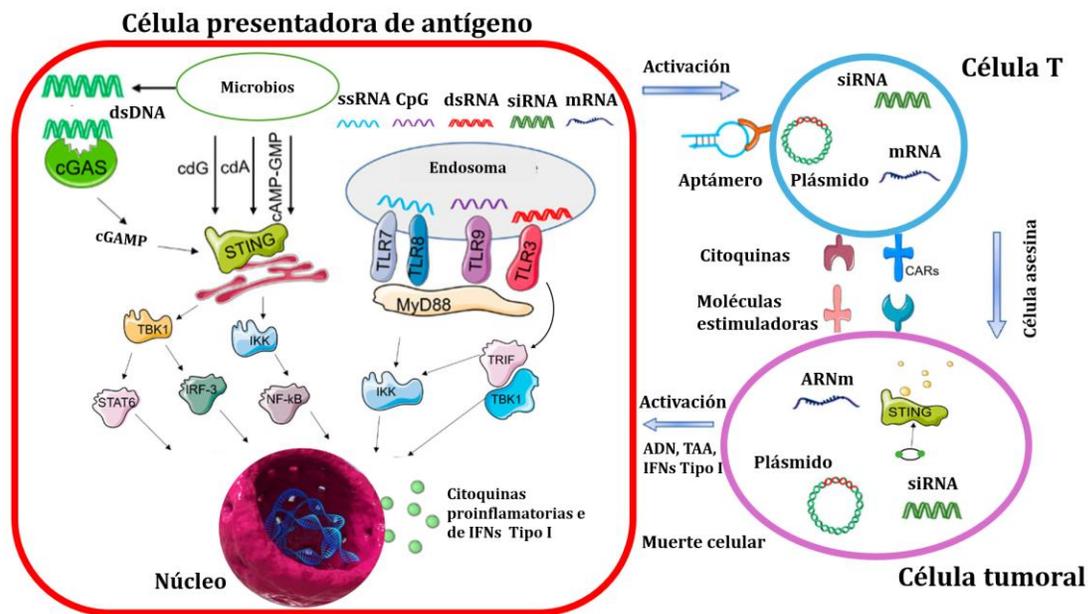


Figura 9: Ejemplificación de terapias con ácidos nucleicos. Representación esquemática de las terapias más comunes con ácidos nucleicos. En rojo se muestra una célula presentadora de antígeno (APC), en azul una célula T y en violeta una célula tumoral, junto con las biomoléculas que son blanco de estudio para estimulación del sistema inmune y el tratamiento del cáncer (Traducido y adaptado de T. Shen 2020)

En este caso se muestra de forma esquemática las terapias comunes con ácidos nucleicos para inmunoterapia contra cáncer. Los ácidos nucleicos inmunoestimulantes de los patrones moleculares asociados a patógenos, conocidos por sus siglas en inglés PAMP, se detectan mediante receptores de reconocimiento de patrones, conocidos por sus siglas en inglés como PRR. Los receptores Toll (TLR) en la membrana del endosoma y la GMP-AMP sintasa ciclase conocida por su siglas en inglés como (cGAS) en el citosol son algunos de estos ejemplos que culminan en la producción interferón de tipo I y citoquinas proinflamatorias que conducen a la respuesta inmunes anticancerígenas. Los ácidos nucleicos reguladores como el piRNA/shRNA y los ácidos nucleicos activadores de genes pueden regular genes relacionados con el sistema inmune para la activación de respuestas contra el cáncer.

Otros oligonucleótidos como los aptámeros pueden funcionar como agonistas o antagonistas contra objetivos moleculares relacionados con el sistema inmunológico para generar respuestas anticancerígenas. Estos ácidos nucleicos inmunoterapéuticos se pueden diseñar para que sean funcionales frentes una gran variedad de blancos, tanto celulares, como moleculares. Ejemplificado en la figura 9 se ven las células presentadoras de antígenos en rojo, conocidas por sus siglas en inglés como APC, las células T o las células *natural killer* (NK) en azul y las células tumorales en violeta. Como se observa en la figura 9 algunos de estos ácidos nucleicos utilizados en inmunoterapia son el ADN

doble cadena (conocido por sus siglas en inglés como dsDNA), ARN doble cadena (conocido por sus siglas en inglés como dsRNA), ADN de simple cadena (conocido por sus siglas en inglés como ssDNA), ARN de simple cadena (conocidos por sus siglas en inglés como ssRNA), islas CpG (conocidas por sus siglas en inglés como CpG), ARN silenciador (por sus siglas en inglés ipRNA), ARN mensajero (conocido por sus siglas en inglés como mRNA).

La idea principal se basa en la capacidad de estos ácidos nucleicos de activar/desactivar cascadas de señalización intracelular y proteínas como factores de transcripción como por ejemplo los mostrados en la figura 9, STING, cGAS, quinasa 1 de unión a TANK (TBK1), transductor de señal y activador de la transcripción 6 (Stat6), factor regulador de interferón 3 (IRF3), IκB *quinasa* (IKK), factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas (NF-κB), receptores de tipo TOLL (TLR), interferón beta inductor de adaptador que contiene dominio TIR (TRIF), complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), receptores de antígenos quiméricos (CAR), dinucleótidos cíclicos (CDN), antígenos asociados a tumores (TAA), etc.

Muchas estas terapias con ácidos nucleicos para el cáncer están todavía en desarrollo y son muy variadas. Cabe destacar que la que la ejemplificación de la figura es un caso ilustrativo de cómo pueden interaccionar los ácidos nucleicos, ya que las vías de señalización intracelular o los blancos moleculares pueden ser más complejos y llevarse a cabo en otros tipos celulares involucrados en la terapia y no solamente en las APC (S. Shen 2020).

2 CÁNCER DE MAMA

2.1 Epidemiología y clasificación de subtipos

Este cáncer es la principal neoplasia maligna no dermatológica y la segunda causa más común de muerte por cáncer entre las mujeres en nuestro país y en el mundo (Breast Cancer in Uruguay). Aunque las tasas generales de mortalidad por cáncer de mama han seguido disminuyendo desde 1989, la tasa de mortalidad entre las mujeres negras no hispanas sigue siendo desproporcionadamente alta. Se estimaron las tasas de mortalidad estandarizadas por edad por 100.000 mujeres-año (J. Torres-Román 2023). Hasta el 80% de los cánceres de mama invasivos son carcinomas ductales infiltrantes conocidos por sus siglas en inglés CDI (E. Watkins 2019), que son neoplasias premaligna de los conductos mamarios que se limita a la luz de los conductos, está revestida por una capa de células mioepiteliales semicontinuas y no traspasa la membrana basal (D. Kalwaniya 2023). El carcinoma lobulillar invasivo es la segunda forma histológica más común de cáncer de mama y representa del 5% al 15% de todos los cánceres de mama invasivos y está compuesto por células no cohesivas dispersas individualmente u

organizadas en un patrón lineal de una sola fila en un estroma fibroso (F. Limaiem 2023). De los carcinomas *in situ* no invasivos, más del 80% son ductales y alrededor del 10% son lobulares (E. Watkins 2019).

Solamente en el año 2012 se registraron 1.676.000 casos nuevos a nivel mundial, 521.900 decesos a causa de esta enfermedad y 6.232.100 de mujeres diagnosticadas en los cinco años precedentes (prevalencia) como se muestra en la figura 10. Los distintos tipos de cáncer de mama pueden ser clasificados según la expresión de los receptores que se encuentran en su membrana y dependiendo del patrón de expresión de mismos, los tratamientos pueden ser muy diferentes (C. DeSantis 2015).

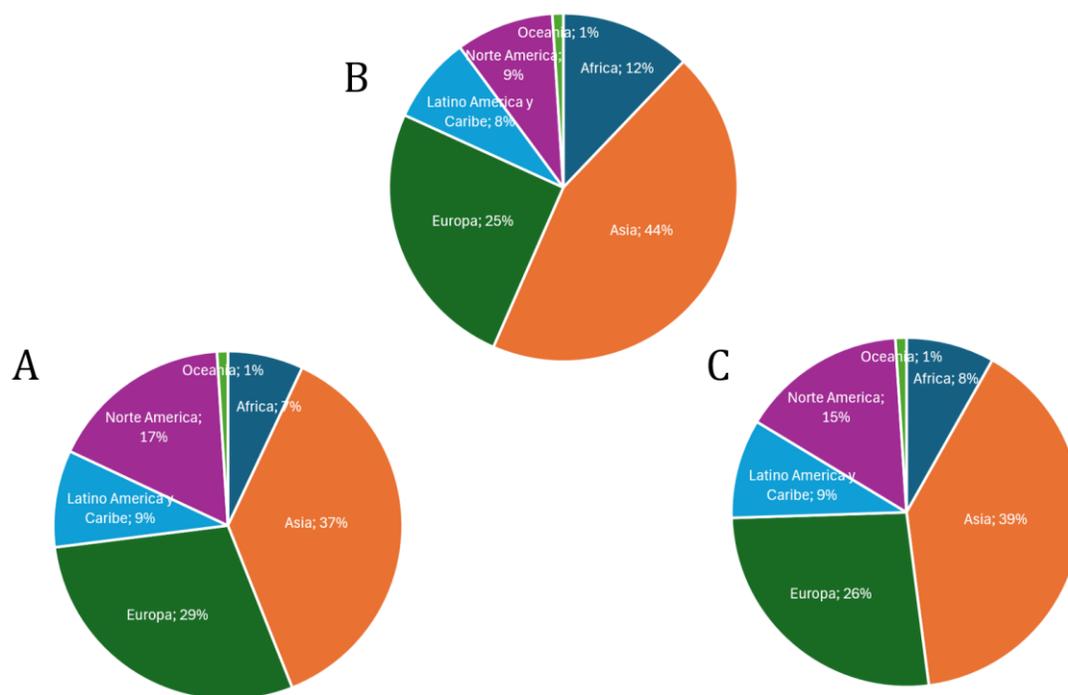


Figura 10: gráficos de casos nuevos, deceso y prevalencia (A, B y C respectivamente) a nivel mundial durante el 2012. Datos epidemiológicos a nivel continental mostrando los porcentajes para Europa, Asia, Latino América junto con el caribe, Norte América, Oceanía y África (Los porcentajes pueden no sumar 100% debido al redondeo) (Traducido y adaptado de C. DeSantis 2015).

Los cuatro subtipos de cáncer de mama (ver tabla 4) se asocian con histologías y pronósticos específicos. El cáncer de mama también se clasifica por su origen anatómico, ya sea lobulillar o ductal, y su receptividad hormonal y expresión del receptor 2 del factor

de crecimiento epidérmico humano (HER2). La receptividad hormonal se refiere a la presencia o ausencia de expresión del receptor de estrógeno y progesterona en la neoplasia maligna. El cáncer de mama con receptor hormonal positivo, en particular cuando no es metastásico, es susceptible de terapia de bloqueo hormonal. Los tumores malignos positivos para HER2 generalmente responden a los anticuerpos monoclonales dirigidos contra HER2. El cáncer de mama triple negativo se refiere a tumores malignos que no expresan receptividad hormonal o HER2 (E. Watkins 2019).

Tabla 4: Subtipos de cáncer de mama. Subtipos y sus características inmunohistoquímicas, prognosis y notas a tener en cuenta (Traducido y adaptado de E. Watkins 2019).

Subtipos de cáncer de mama			
Subtipos	Inmunohistoquímica	Prognosis	Notas
Luminal A	<ul style="list-style-type: none"> Receptor de estrógeno positivo Receptor de progesterona positivo Receptor HER2 negativo 	Bueno	<ul style="list-style-type: none"> Subtipo más común Usualmente tumores de bajo grado Responde a terapias hormonales como SERMs e inhibidores de la aromatasa Baja tasa de reincidencia
Luminal B	<ul style="list-style-type: none"> Receptor de estrógeno positivo Receptor de progesterona positivo Receptor HER2 negativo o positivo 	Intermedio	<ul style="list-style-type: none"> Tendencia a tumores de alto grado Tendencia a mayor reincidencia que el subtipo luminal A
HER2 positivo	<ul style="list-style-type: none"> Receptor de estrógeno negativo Receptor de progesterona negativo Receptor HER2 positivo 	Malo	<ul style="list-style-type: none"> Algunos casos pueden ser susceptibles a terapia con anticuerpos monoclonales anti-HER2 pero otros no Posibilidad de generar resistencia frente a los anticuerpos monoclonales particularmente Trastuzumab
Triple negativo (Basal)	<ul style="list-style-type: none"> Receptor de estrógeno negativo Receptor de progesterona negativo Receptor HER2 negativo 	Malo	<ul style="list-style-type: none"> Subtipo más común entre mujeres negras Suele observarse en personas más jóvenes que el resto de los subtipos No es susceptible a terapias hormonales o con anticuerpos monoclonales Tiende a ser agresivo con altas tasas de recurrencia

2.2 Diagnóstico en cáncer de mama

Los estudios de imagenología de mama se utilizan para la detección, el diagnóstico y el tratamiento clínico (S. Juanpere 2011). Las técnicas convencionales y más utilizadas para el diagnóstico del cáncer de mama son el ultrasonido, la biopsia guiada por imágenes y el diagnóstico de ganglios linfáticos. La mamografía, la MRI, la gammagrafía, el SPECT y el PET son otras modalidades de imágenes comúnmente utilizadas, siendo varias de estas mucho más recientes y todavía en desarrollo y en constante perfeccionamiento (ver figura 11) (J. Babilion 2001, S. Iranmakani 2020, X. Zhang 2018).

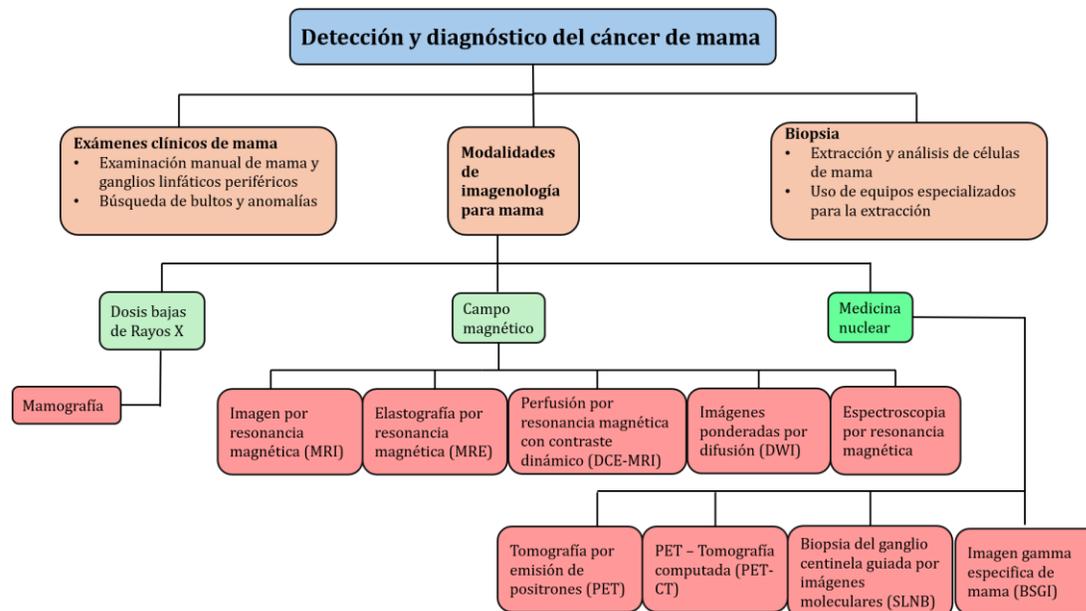


Figura 11: diferentes enfoques para la detección de cáncer de mama. Diferenciación entre exámenes de mama clínicos, generación de imágenes por rayos X, inducción de campos magnéticos y por medicina nuclear y estudios por biopsias (Traducido y adaptado de A. Bhushan 2021).

2.3 Tratamiento en cáncer de mama

Una vez que es identificado el cáncer de mama mediante las modalidades de diagnóstico mencionadas, se debe proporcionar un tratamiento inmediato y riguroso para extirpar el tumor y prevenir una mayor propagación del cáncer. Uno de los principales desafíos para el tratamiento del cáncer de mama es su naturaleza heterogénea, que afecta la respuesta al tratamiento (K Polyak 2001). Al evaluar la presencia de biomarcadores como receptores hormonales (HR), niveles excesivos de proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) y/o copias adicionales del gen HER2, los tratamientos que son más efectivos contra un tipo u otro se puede determinar y administrar un plan de tratamiento particular de cáncer de mama (ver tabla 5). Según la regulación positiva de los genes, existen cinco subtipos principales intrínsecos o moleculares de cáncer de mama como se muestra en la tabla 4 más una variante llamada cáncer de mama normal que es idéntico al cáncer luminal A, ya que es HER2-, HR+ (receptor de estrógeno y/o progesterona positivo) con niveles reducidos de la proteína Ki-67. Sin embargo, el pronóstico del cáncer de mama normal es ligeramente peor que el del cáncer luminal A (M. Hammond 2010, A. Wolff 2014).

Existen muchos fármacos aprobados por la FDA que se utilizan en el tratamiento del cáncer de mama, y sus efectos y probabilidad de éxito depende en gran medida de la combinación con otros tratamientos como la radioterapia y la extirpación quirúrgica (ver Tabla 5 a continuación publicada por A. Bhushan en 2021).

Tabla 5: lista de medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de cáncer de mama. Clasificación según el tipo de fármaco, el tipo subtipo de cáncer a tratar y el estado de aprobación en el que se encuentran (Traducido y adaptado de A. Bhushan 2021)

Droga	Tipo de droga	Subtipo indicado	Estado
Tamoxifeno	Anti-estrógeno	Estrógeno positivo (ER+)	Aprobado
Aminoglutetimida Fadrozol Vorzol	Inhibidores de aromatasa de primera y segunda generación	ER+	Aprobados
Anastrozol Letrozol Exemestano	Inhibidores de aromatasa de tercera generación	ER+	Aprobados
Groserelina Leuprorelina		Cáncer de mama susceptible a la hormona liberadora de hormona luteinizante	Aprobados
Fluvestrant	Degradadores selectivos de los receptores de estrógeno (SERD)	HR+	Aprobado
Ribociclib Palbociclib Abemaciclib	Inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina 4 y 6 (CDK4/6)	HER2 negativos avanzados o cáncer de mama metastásico	Aprobados
Buparlisib	Pan-PI3 Ki	HER2 negativo, gen PIK3CA mutado, cáncer de mama avanzado o metastásico	Aprobado
Pictilisib Pilaralisib Voxtalisib	Inhibidores de la fosfoinositol 3-quinasas (PI3K)	Cáncer de mama avanzado receptor hormonal positivo (HR+) / HER2 negativo	Pruebas clínicas fase I Estudios de escalación de dosis fase I/II
Trastuzumab Pertuzumab	Anticuerpo monoclonal (mAb)	Cáncer con sobreexpresión de HER2	Aprobados
Neratinib	Inhibidor de tirosin quinasa (TKI)	Cáncer de mama avanzado o metastásico HER2+	Aprobado
Patritumab	Anti-HER3 mAb	Cáncer de mama avanzado HER2+	Modelos preclínicos
Bevacizumab	Anti-GF mAb	Cáncer de mama triple negativo (TNBC) con mutaciones en líneas germinales / cáncer de mama HER2-	Aprobado
T-DM1	Conjugado Droga-mAb	Tratamiento adyuvante cuando el paciente ha realizado tratamiento con Trastuzumab y Taxano y presenta metástasis HER2+	Aprobado
Enhertu	Conjugado Droga-mAb	HER2+ metastásico reincidente sin posibilidad de remoción quirúrgica	Aprobado
Pembrolizumab	IgG4-k mAb	TNBC metastásico o TNBC reincidente sin posibilidad de remoción quirúrgica	Aprobado
Atezolizumab con nab-paclitaxel	mAb	PD-L1 + TNBC	Aprobado

3. Receptor de crecimiento epidérmico de tipo 2

3.1 Familia EGFR

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) fue uno de los primeros receptores tirosina quinasa (RTK) para los que se estudió la unión del ligando y para los que se estableció la importancia de la dimerización inducida por el ligando. Son cuatro los receptores de tipo RTK que comprenden la familia de receptores de crecimiento epidérmico humano o EGFR (ver figura 12) (M. Lemmon 2014).

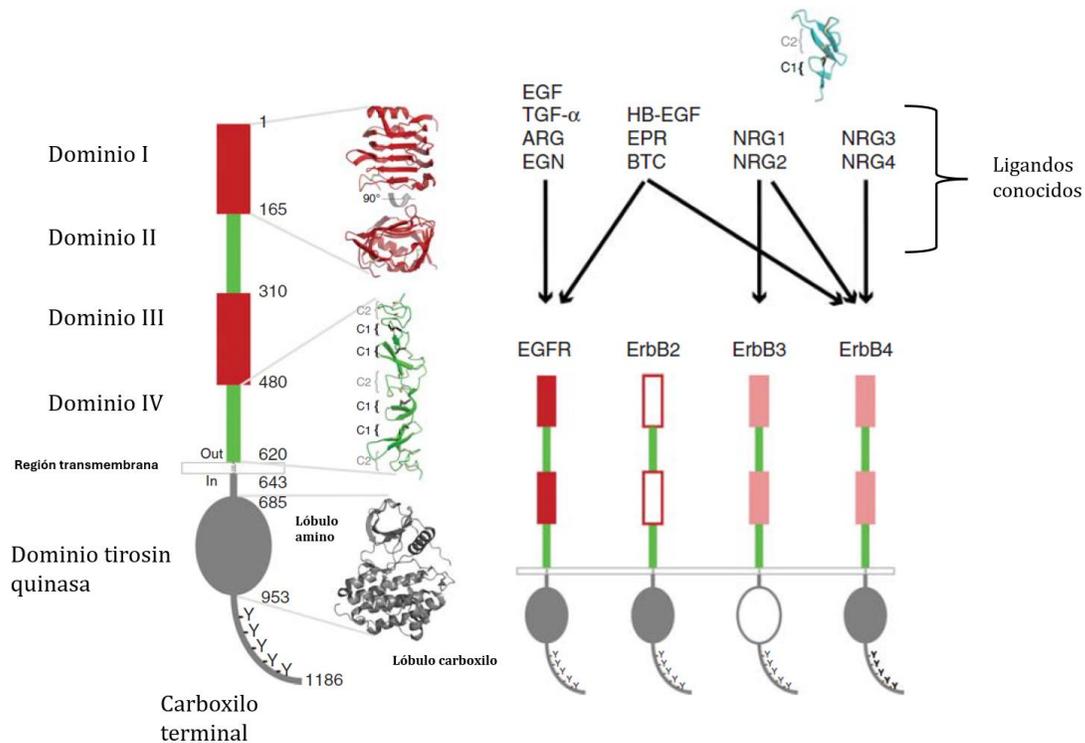


Figura 12: esquematización de la familia EGFR. A la izquierda se muestra la estructura completa de la proteína transmembrana con sus cuatro dominios extracelulares, la región transmembrana y los dominios tirosin quinasa y el carboxilo terminal, ambos intracelulares. A la derecha se muestran los miembros de la familia EGRF y sobre ellos los ligandos conocidos para cada uno (Traducido y adaptado de M. Lemmon 2014)

Los cuatro miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico son: HER1 (o EGFR), HER2 (erbB2), HER3 (erbB3), y HER4 (erbB4). Todos ellos se expresan de forma constitutiva y son glicoproteínas de subunidad única transmembrana que tienen un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana y un dominio catalítico de tirosina quinasa intracelular. En la activación del ligando, los receptores se dimerizan formando homodímeros o heterodímeros como se observa en la figura 13. A esto le sigue la transfosforilación que activa varias vías de señalización intracelular (ver figura 13), como la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno/Ras, la vía de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) /Akt, la vía de la quinasa Janus/transductor de señales y activador de la transcripción, y la vía de la fosfolipasa C. vía, que finalmente afecta la proliferación celular, la supervivencia, la motilidad y la adhesión (Moasser 2007).

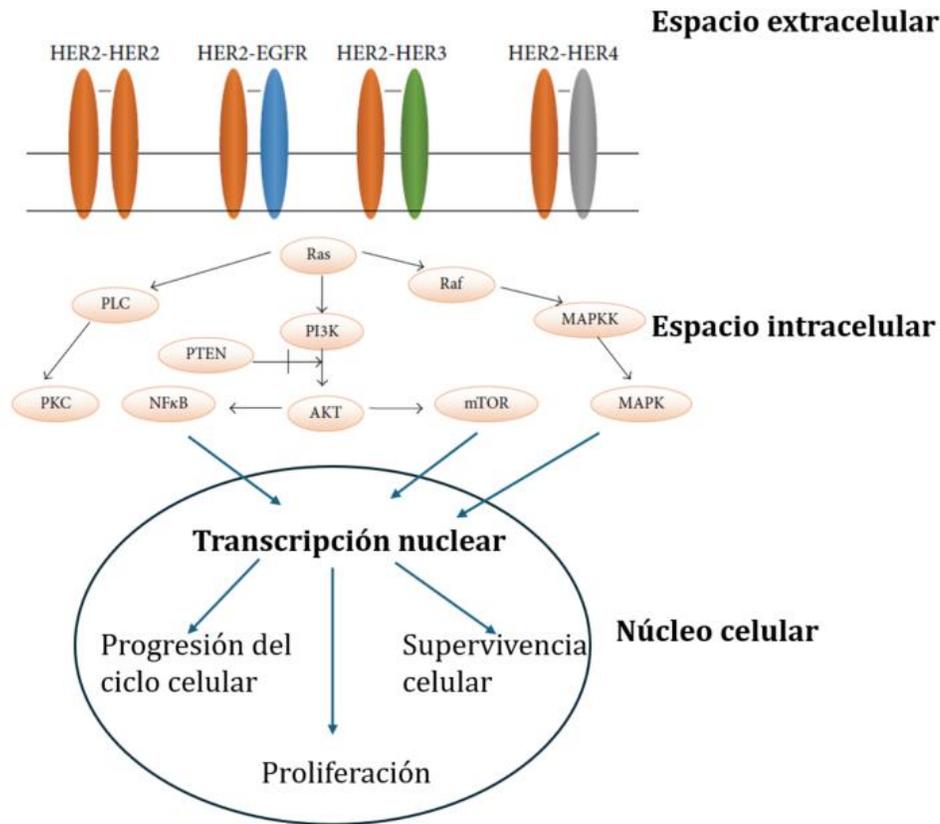


Figura 13: Dimerización del receptor HER2 consigo mismo y con otros miembros de la familia EGFR. Ilustración de la cascada de señales intracelulares que siguen a la dimerización del receptor HER2 que conlleva a la activación de otras proteínas como factores de transcripción y que eventualmente resultan en la progresión del ciclo celular, la supervivencia celular y la proliferación (Traducido y adaptado de N. Iqbal 2014)

Si bien estos receptores están presentes en forma normal en la célula, su desregulación ha sido reportada en cáncer de pulmón (T Mok 2011), en cáncer de mama (C Arteaga 2011), y glioblastoma (T Libermann 1985; J Lee 2006; I Vivanco et al. 2012), entre otros. Los inhibidores de estos receptores se encuentran entre los ejemplos más exitosos de terapias dirigidas contra el cáncer hasta la fecha (C Arteaga 2003; M Moasser 2007; H Zhang 2007).

3.2 Receptor HER2

El receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (Figura 14) es uno de los cuatro receptores de la familia EGFR. El oncogén HER2 está ubicado en el cromosoma 17q12 (Popescu 1989). Primero se identificó como un gen nuevo de neuroblastomas de rata en células NIH-3T3 (Shih 1981). Luego, King y colaboradores (King 1985) informaron que el DNA del carcinoma de mama humano mostraba amplificación de este gen. La secuencia del oncogén neu era homóloga al oncogén erb-B y su fosfoproteína de 185 kDa estaba antigénicamente relacionada con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (Akiyama 1986).

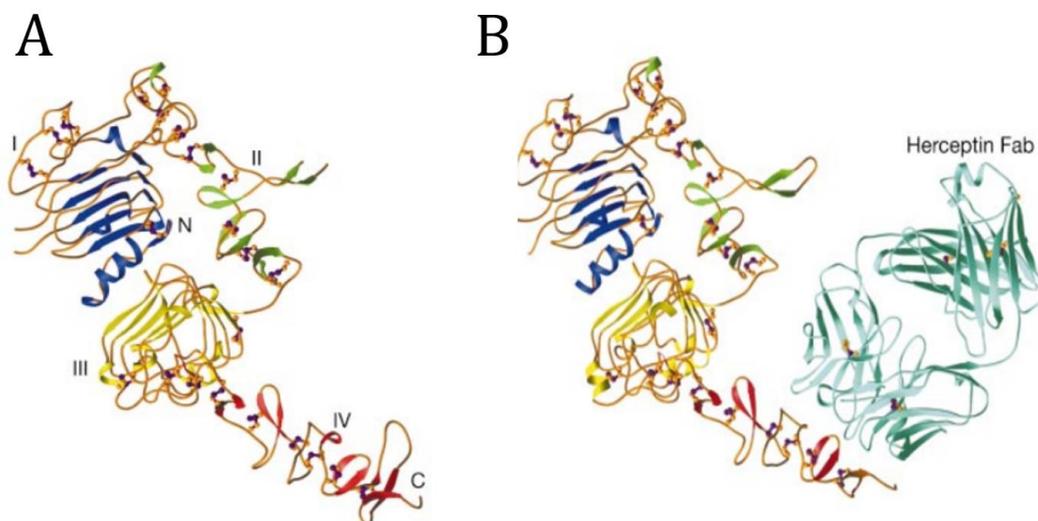


Figura 14: Receptor HER2. Cristalografía de rayos X de la estructura de la región extracelular del receptor HER2 (dominios 1-4) (A). Cristalografía de rayos X de la estructura de la región extracelular del receptor HER2 (subdominios 1-4) y su unión a la región Fab del mAb trastuzumab por el subdominio 4 (B) (Cho 2003).

Actualmente, no se conoce ningún ligando para el receptor HER2. Sin embargo, puede formar homodímeros como heterodímeros con otros miembros de la familia HER. La conformación de la porción extracelular de HER2 sin ligando unido es similar a la conformación activada de RTK con ligando unido (Cho 2003) (Krishnamurti 2014).

HER2 se encuentra sobreexpresado en una variedad importante de diferentes tipos de cáncer. Entre ellos destacan el cáncer de mama que ha sido explicado con mayor profundidad en apartados anteriores de este trabajo. Pero también es un receptor sobreexpresado en otros tumores primarios con gran capacidad metastásica, entre ellos el cáncer colorrectal y cáncer gástrico. Existen, por ejemplo, amplios estudios en carcinomas colorrectal primario y sus metástasis (L. Achalla 2022) y en adenocarcinomas gastroesofágicos (A. Bartley 2016).

3.3 Terapias anti-HER2

Las terapias anti-HER2 han avanzado considerablemente (ver figura 15). El tratamiento depende en gran medida del estadio del cáncer en el momento del diagnóstico. Las terapias dirigidas para neoplasias malignas positivas para HER2 pueden ser, por ejemplo, anticuerpos monoclonales como el Trastuzumab, Pertuzumab y Margetuximab y conjugados anticuerpo-fármaco como Ado-Trastuzumab emtansina (T-DM1) y Fam-Trastuzumab Deruxtecan (T-DXd) e inhibidores de quinasa como Lapatinib, Neratinib y Tucatinib (S. Giordano 2022).

Ado-Trastuzumab Emtansina (T-DM1) fue el primer conjugado fármaco-anticuerpo conocido por sus siglas en inglés como ADC anti-HER2 desarrollado y está compuesto de Trastuzumab unido covalentemente a DM1, un derivado de maitansina. Los resultados recabados llevaron a la aprobación por parte de la FDA de T-DM1 para HER2+. T-DXd es un ADC de HER2 que comprende un anticuerpo HER2 humanizado con la misma secuencia que Trastuzumab conjugado con Deruxtecán (DXd). Este conjugado libera el fármaco directamente dentro de las células y gracias a su corta vida media, reduce su tiempo en el organismo, con el objetivo de reducir la toxicidad. La alta permeabilidad de la membrana frente a DXd permite efectos secundarios locales, que conducen a la muerte de las células tumorales en el microambiente tumoral (S. Swain 2023).

Preclínica

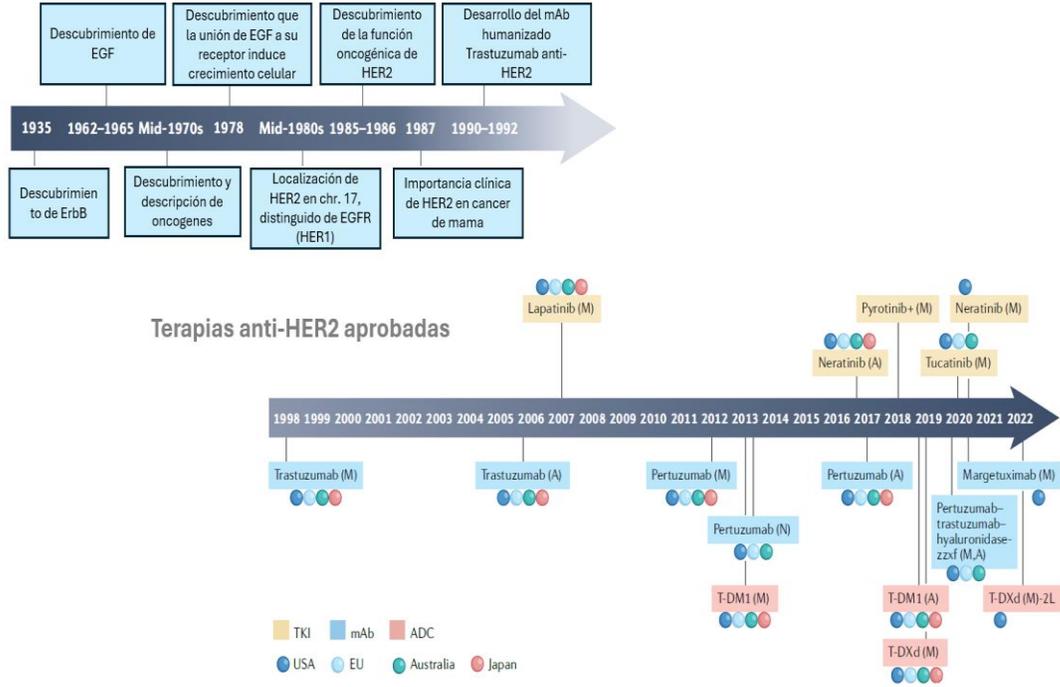


Figura 15: Línea temporal del descubrimiento de la familia EGFR y HER2. En la parte superior de la ilustración se detallan los acontecimientos más importantes relacionados con el descubrimiento y la caracterización de EGFR y HER2. En la parte inferior de la ilustración se detallan los acontecimientos y avances más relevantes en el tratamiento del cáncer de mama que sobreexpresa HER2 (Traducido y adaptado de S. Swain 2023).

4. Aptámeros

Los aptámeros son oligonucleótidos monocatenarios cortos que se unen a moléculas de forma blanco-específica. Es decir que los aptámeros tienen una alta afinidad y una excelente especificidad hacia sus blancos moleculares. Son oligonucleótidos de ADN o ARN que se producen de forma sintética y cuya estructura tridimensional es dependiente de secuencia y, por ende, pequeños cambios en la secuencia nucleotídica pueden generar una gran diversidad de estructuras tridimensionales (M. Kaushik 2016).



Figura 16: Estructura básica de un aptámero y su secuencia complementaria. El dominio variable representado en azul es el responsable de la diversidad de moléculas posibles mientras que los dominios constantes en rojo y verde (*Primer Forward* y *Primer Reverse*) son se utilizan para la amplificación de las secuencias (M. Vorobyeva 2018).

Los aptámeros se obtienen de un proceso *in vitro* de selección, denominado evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX), el cual fue desarrollado por primera vez en 1990 por Tuerk y Gold (C. Tuerk 1990), y por Ellington y Szostak (A. Ellington 1990). El método SELEX convencional consiste principalmente en los siguientes tres pasos: selección, partición y amplificación como se representa en la figura 17 a continuación. Se parte de una biblioteca de oligonucleótidos sintética, que generalmente contiene 10¹⁴-10¹⁵ diferentes secuencias únicas. Cada secuencia única contiene bases aleatorias (20–50 nt) flanqueadas por dos secuencias conocidas de unión a cebadores, que se utilizan para la amplificación por PCR (ver figura 16).

En el paso de selección, la biblioteca se incuba con moléculas diana en condiciones de tiempo, temperatura, pH, fuerza iónica estrictamente controladas. Posteriormente se realiza la partición, en donde las secuencias no unidas se separan de las unidas utilizando diferentes estrategias. Las secuencias unidas al blanco se amplifican mediante PCR o PCR de transcripción inversa (cuando se parte de ARN). Los productos PCR, al ser un nuevo subgrupo, se utilizan para la siguiente ronda de selección. Después de varias rondas de selección, se secuencian las secuencias enriquecidas y se evalúan adicionalmente sus capacidades de unión.

Por lo general, las tasas de éxito aplicando esta metodología son bajas (J. Zhou 2017). De este modo, la obtención de aptámeros de alta calidad contra blancos relevantes sigue siendo un cuello de botella. Con el fin de mejorar el éxito de la selección, se han establecido variantes del SELEX convencional. Estas variantes, como pueden ser el SELEX negativo (A. Ellington 1992), *counter* SELEX (R. Jenison 1994), SELEX por electroforesis capilar (S. Mendonsa 2004, S. Mendonsa 2004), SELEX microfluídico (G. Hybarger 2006), *Cell*-SELEX (D. Dabueks 2003) e *In-Vivo* SELEX (J. Mi 2010), pueden presentar ventajas en comparación con el método tradicional, pero también desventajas. Mientras que el nivel de complejidad del sistema aumenta, también aumenta la cantidad de variables a tener en cuenta durante los ensayos y esto puede significar un desafío para el investigador (Z. Zhuo 2017).

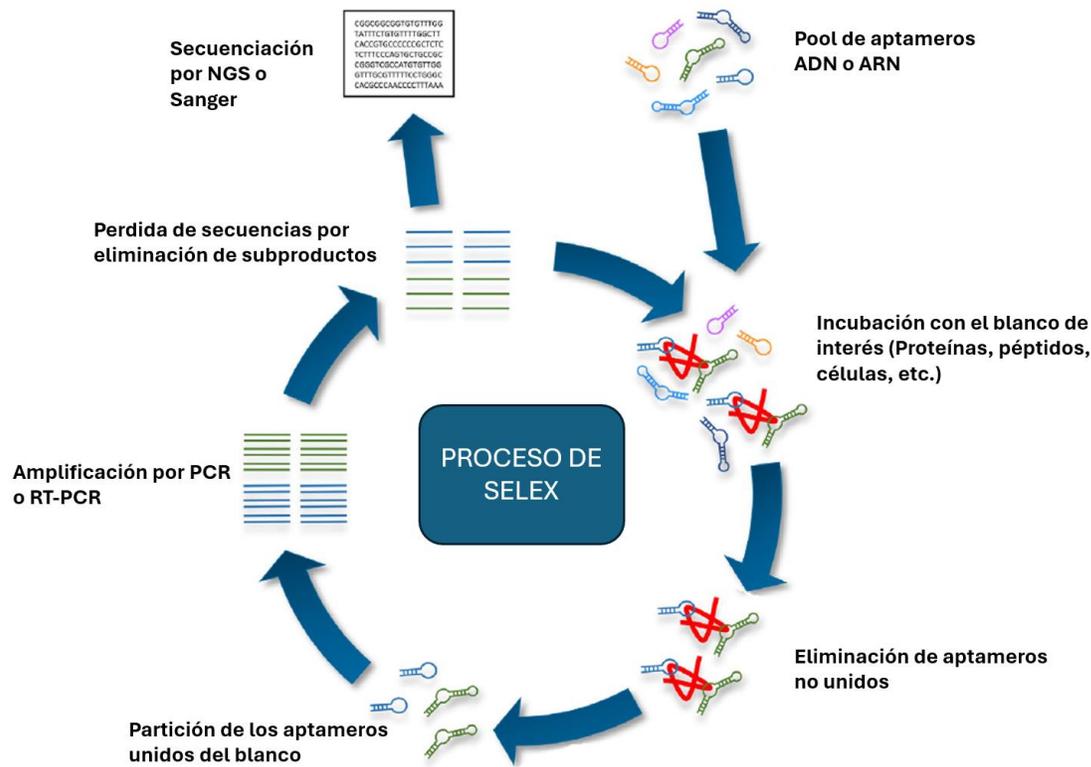


Figura 17: Representación esquemática del proceso de SELEX. Los aptámeros son representados por una variedad de colores (arriba a la derecha), mientras que los ligandos se representan como "estrellas" rojas. Se observa una disminución a medida que avanza el proceso de SELEX en la variedad de los aptámeros (Traducido y adaptado de M. Vorobyeva 2018).

Hasta la fecha, se han generado miles de aptámeros dirigidos contra aminoácidos, proteínas, iones metálicos pequeños, moléculas orgánicas, bacterias, virus, células enteras y animales. Los aptámeros se han aplicado ampliamente en campos analíticos, bioanalíticos, de imagen, diagnósticos y terapéuticos (Z. Zhuo 2017).

Los aptámeros se unen al blanco mediante interacciones débiles y asimismo se pliegan en formas 3D complejas (ver figura 18) lo cual les otorga una diversidad estructural caracterizada por bucles, horquillas, etc. Esto les permite unirse virtualmente a cualquier blanco molecular. Aunque algunos aptámeros existen de forma natural como elementos de unión a ligandos de los riboswitches presentes en bacterias y otros organismos, la mayoría se genera *in vitro* y se puede adaptar a cualquier objetivo específico deseado (M. Dunn 2017).

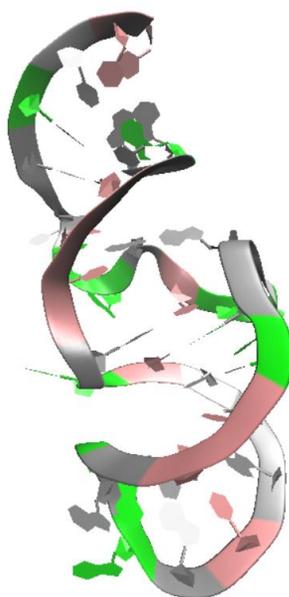


Figura 18: Estructura terciaria de un aptámero. Ejemplo de una estructura tridimensional obtenida por resonancia magnética nuclear (J. Flinders 2004). En verde y gris se muestran purinas y en blanco y rosa las pirimidinas.

Estos oligonucleótidos presentan características que los distinguen de otro tipo de biomoléculas como los anticuerpos, los péptidos y los *nanobodies* (ver Tabla 5 para una comparativa detallada). Su naturaleza química y características fisicoquímicas los hacen muy versátiles para diversas aplicaciones. Presentan un tamaño pequeño que va desde 5 a 30 kDa (ver figura 19) y son muy estables en disolución y altamente resistentes a cambios de pH y temperatura.

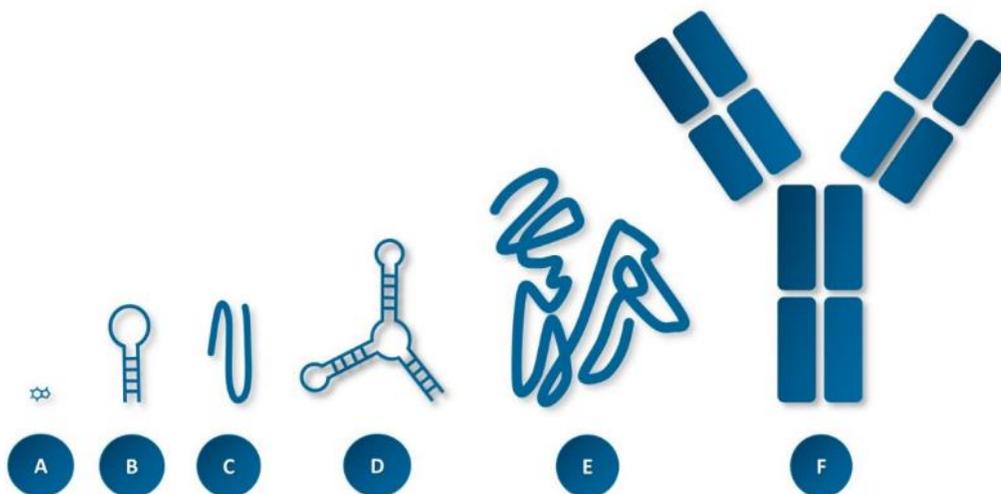


Figura 19: comparación del tamaño entre diferentes moléculas. Representación de un compuesto orgánico (A), un hairpin de ADN o RNA (B), un péptido (C), un aptámero (D), una proteína globular de tamaño promedio (E) y un anticuerpo (F) (M. Vorobyeva 2018).

A su vez, presentan una gran resistencia a ciclos de desnaturalización y renaturalización permitiendo conservar o readquirir la conformación estructural responsable de la unión con su blanco. También presentan diversos grupos funcionales que pueden ser post-modificados con facilidad por ejemplo para incrementar su estabilidad. Se modifican de forma racional sin perder afinidad por su blanco y estas modificaciones además pueden otorgarles nuevas funcionalidades, así como protegerlos de la degradación por nucleasas.

Los costos de producción son mucho menores que otras biomoléculas que deben producirse utilizando animales, sistemas complejos como hibridomas u otros sistemas *in vitro* que requieren otros factores biológicos. Además, el proceso de selección vía el método SELEX y sus variaciones permite generar un proceso rápido de selección y producción de entre 2 a 8 semanas. Tienen generalmente fácil incorporación sitio-específico de grupos funcionales para la conjugación, por ejemplo, de radionucleidos o compuestos fluorescentes. *A posteriori* de las modificaciones, los aptámeros suelen presentar gran resistencia a entornos más estrictos, como pH más extremos, fuerzas iónicas mayores, temperaturas muy altas, entre otros. Desde el punto de vista de sus características biológicas, presentan una gran capacidad de penetración en los tejidos y una rápida eliminación por vía renal y tienen una muy baja probabilidad de generar inmunogenicidad (M. Koerselman 2023).

En diciembre de 2004, la FDA, aprobó el primer tratamiento basado en un aptámero denominado Pegaptanib (Macugen), el cual se usa para el tratamiento de la degeneración

macular relacionada con la edad y está dirigido hacia el factor de crecimiento endotelial vascular (T. Adachi 2019). Recientemente en 2023 fue aprobado por la FDA el segundo aptámero de Iveric Bio/Astellas's avacincaptad pegol (Izervay), un biofármaco para el tratamiento de la atrofia geográfica (AG) secundaria que inhibe la proteína C5 del sistema del complemento interrumpiendo la formación del complejo de ataque a la membrana, retrasando la degeneración de las células de la retina (L. Sahkeel 2024).

Tabla 6: Tabla comparativa de biofarmacos ampliamente estudiados. Comparación de las ventajas y desventajas de los aptámeros en relación con los anticuerpos, péptidos y nanobodies (Traducido y adaptado de M. Koerselman 2023).

	Aptámeros	Anticuerpos	Péptidos	Nanobodies
Tamaño	5 – 30 kDa	150 kDa	Menor a 5 kDa	15 kDa
Estabilidad	<ul style="list-style-type: none"> - Muy estables - Resistencia a altas temperaturas, superiores a 95 °C - Resistencia a ciclos de desnaturalización y renaturalización - Degradables por nucleasas - Resistentes a proteasas 	<ul style="list-style-type: none"> - Inestables - Susceptibilidad frente a rangos de temperatura - Desnaturalización irreversible - Degradables por proteasas - Resistentes a nucleasas 	<ul style="list-style-type: none"> - Baja estabilidad en condiciones de desnaturalización o altas temperaturas - Degradables por proteasas - Su estabilidad puede ser mejorada drásticamente por modificaciones químicas 	<ul style="list-style-type: none"> - Muy estables - Resistencia a altas temperaturas entre 80-90 °C, alta presión y bajo pH - Resistencia frente a proteasas - Posibilidad de replegamiento luego de exposición a entornos más rigurosos
Almacenamiento	<ul style="list-style-type: none"> - Almacenamiento a largo plazo - Capacidad de liofilización y transporte a temperaturas regulares 	<ul style="list-style-type: none"> - Tiempo de vida limitado - Requiere transporte y almacenamiento en frío 	<ul style="list-style-type: none"> - Tiempo de vida limitado - Capacidad de liofilización y transporte a temperaturas regulares 	<ul style="list-style-type: none"> - Almacenamiento a largo plazo - Capacidad de liofilización y transporte a temperaturas regulares
Producción y Selección	<ul style="list-style-type: none"> - Bajos costos de producción - Selección y producción rápida entre 2-8 semanas - Seleccionados por método SELEX 	<ul style="list-style-type: none"> - Altos costos de selección y producción, mayores a 6 meses - Producción en líneas células de mamíferos - Escala de producción en g/L 	<ul style="list-style-type: none"> - Selección y producción rápida entre 2-8 semanas - La fase de síntesis puede ser sólida o líquida - Escala de producción de mg a kg - Selección por Phage-Display 	<ul style="list-style-type: none"> - Selección y producción hasta 2 o 3 meses - Producción en E. coli, levaduras o fungí - Escala de producción en g/L - Selección por Phage-Display
Modificaciones	<ul style="list-style-type: none"> - Convenientes y controlables - Pueden realizarse sin perder afinidad por el blanco - Pueden optimizar la vida media y la estabilidad 	<ul style="list-style-type: none"> - Restringidas e incontrolables - Gran probabilidad de pérdida de actividad 	<ul style="list-style-type: none"> - Convenientes y controlables - Pueden realizarse sin perder afinidad por el blanco - Pueden optimizar la vida media y la estabilidad 	<ul style="list-style-type: none"> - Convenientes y controlables - Pueden realizarse sin perder afinidad por el blanco - Pueden optimizar la vida media y la estabilidad
Posibilidad de conjugación	<ul style="list-style-type: none"> - Incorporación sitio-específica fácil de grupos funcionales por conjugación - Resistencia a entornos más rigurosos luego de las etapas de modificación 	<ul style="list-style-type: none"> - Incorporación sitio-específica difícil de grupos funcionales por conjugación - Susceptibilidad a entornos más rigurosos luego de las etapas de modificación 	<ul style="list-style-type: none"> - Incorporación sitio-específica fácil de grupos funcionales por conjugación - Resistencia a entornos más rigurosos luego de las etapas de modificación 	<ul style="list-style-type: none"> - Incorporación sitio-específica fácil de grupos funcionales por conjugación - Resistencia a entornos más rigurosos luego de las etapas de modificación
Penetración en tejidos	- Alta penetración en tejidos	- Baja penetración en tejidos	- Alta penetración en tejidos	- Alta penetración en tejidos
Eliminación del organismo	- Rápida eliminación vía renal	- Lenta eliminación vía catabolismo	Rápida eliminación vía renal y degradación enzimática	- Rápida eliminación vía renal
Inmunogenicidad	- Baja inmunogenicidad	- Humanización de mAb sigue resultando en respuestas inmunogénicas	- Baja inmunogenicidad	- Baja inmunogenicidad debido a la alta homología con los dominios IgG humanos

4.1 Aptámeros reportados

Existen aptámeros reportados contra una gran variedad de blancos. Entre estos están aptámeros dirigidos contra receptores celulares específicos que están expresados en diversas patologías. Zhe Liu y Jin-Hong Duan reportan en el año 2012 un aptámero anti-HER2 denominado *HB5* de 86 nt utilizado para transportar un fármaco citotóxico, Doxorubicina, para el tratamiento de cáncer que sobreexpresan este receptor. Este aptámero de DNA no presentó citotoxicidad por sí solo, presentó mínima reactividad cruzada con la albumina y la tripsina y su constante de disociación (Kd) de HER2, medida por fluorometría, fue de 316 nM (Z. Liu 2012, Q. Zeng 2022). Otro aptámero ssDNA reportado por J. Niazi *et al* en 2015 y nombrado H2, mostró resultados para el uso en detección de HER2 unido a una sonda fluorescente. La disociación del aptámero H2 del complejo molecular utilizado para su transporte (denominado MB-CNT-H2) fue inducida por la unión del aptámero a la proteína HER2, con una constante de disociación (Kd) calculada por ensayos de resonancia de plasmon superficial (SPR) de 270 nM (J. Niazi en 2015). M. Gijs *et al* reportan en 2016 dos aptámeros de DNA, HeA2_1 y HeA2_3, que se unen a HER2 con afinidades de 28 nM y 6.2 nM respectivamente, medidas usando SPR. Además, demostraron que el aptámero HeA2_3 se internaliza en las células cancerosas y tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y la viabilidad celular (M. Gijs 2016). Los resultados presentados G. Mahlknecht *et al* en 2013, muestran un proceso de selección donde los aptámeros DNA seleccionados B212, 2-2 y 2-1 pudieron unirse específicamente a HER2 (G. Mahlknecht 2013).

Los resultados presentados en estos y otros estudios no son ideales para llevar a cabo estudios *in vivo*. Asimismo, se espera que las Kd estén verificadas y sean comparables por más de una metodología según recomienda la sociedad internacional de aptámeros por sus siglas en inglés INSOAP (M. McKeague 2022).

4.2 Antecedentes experimentales

Como se mencionó anteriormente, existen aptámeros contra HER2 que han sido reportados por otros grupos de investigación como se mencionó anteriormente. Estos presentan características prometedoras, pero, aun así, es posible encontrar aptámeros que presenten mejores características fisicoquímicas como, por ejemplo, una menor K_d (mayor afinidad por su blanco), poseer capacidad citotóxica, presentar mayor estabilidad en diferentes medios, entre otros.

Previo al comienzo de este proyecto de grado, se realizó SELEX con la colaboración del Laboratorio de aptámeros del Instituto Ramon y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS) en Madrid, España. Este proceso fue realizado con la porción extracelular del receptor HER2 (ERBB2 recombinante de humano, HEK293) como blanco molecular.

El proceso de selección se realizó utilizando una biblioteca de DNA de 40 nucleótidos de región random (RND40) y constó de 6 rondas de selección: cuatro rondas positivas (en las cuales se conservan los aptámeros unidos al blanco molecular) y dos rondas negativas (en las cuales se eliminan los aptámeros unidos a blancos inespecíficos o no deseados). Una vez finalizados estos ensayos, la última ronda fue clonada, purificada y se realizó una secuenciación Sanger. Se encontraron cuatro aptámeros candidatos que fueron nombrados F17 (76 nt), F21 (77 nt), F23 (75 nt) y F30 (76 nt).

Posteriormente se realizaron estudios iniciales en la Universidad de Missouri, Estados Unidos, para evaluar la afinidad de estos aptámeros por la porción extracelular del receptor HER2 mediante termoforesis a microescala, ensayo conocido por sus siglas MST. Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron constantes de disociación (K_d) reproducibles, destacando en particular la del aptámero F21, que presentaba una K_d de 42 nM (ver figura 20).

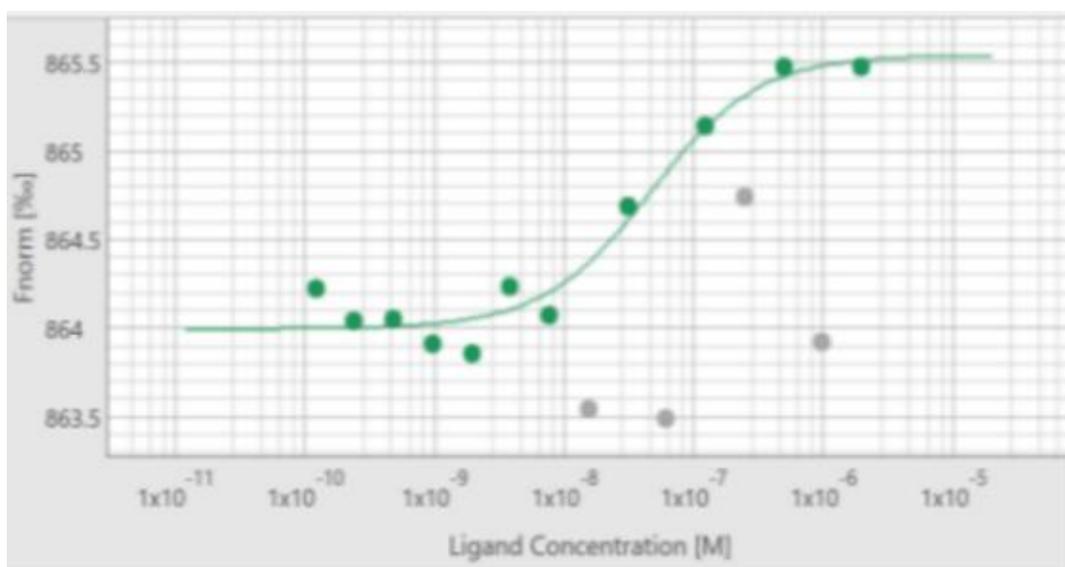


Figura 20: Resultado del MST para el aptámero F21. Gráfico de concentración de ligando en molar vs Fnorm %.

Previo al comienzo de la tesina de grado el equipo de investigación de bioinformática del CENUR litoral norte realizo un alineamiento de prueba para encontrar motivos de secuencia conservados (Figura 21). Los datos procesados utilizando MEME (T. Bailey 2015) mostraron secuencias conservadas en rojo, celeste, verde y azul. De éstas solo dos motivos consensos fueron encontrados en los cuatro aptámeros y en otros dos aptámeros reportados por otros equipos de investigación, considerando un largo de secuencia de 86 nt para el aptámero HB5 y 55 nt para el aptámero H2.

Las secuencias de los aptámeros no son mostradas en este trabajo por aspectos de confidencialidad.

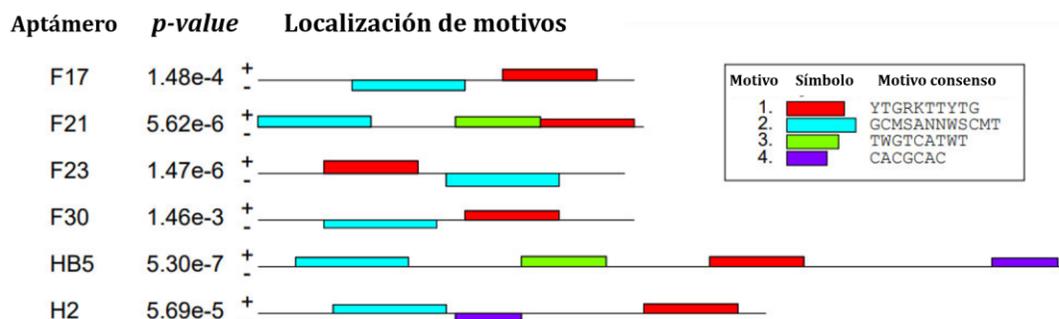


Figura 21: Alineación de 6 secuencias diferentes de aptámeros. Las primeras 4 secuencias corresponden a los aptámeros obtenidos por nuestro equipo de investigación, la quinta corresponde al aptámero HB5 y la sexta al aptámero H2, ambos reportados por otros equipos de investigación (ver aptámero reportados más arriba). En la sección de la figura donde se especifican los motivos consenso (derecha de la figura), Y representa pirimidina, R representa purina, K representa T o G, M representa A o C, S representa C o G, N representa A/T/C/G, y W representa A o T.

B. ANTECEDENTES METODOLÓGICOS

1. Ensayos de viabilidad celular

En la actualidad existen diferentes técnicas para evaluar el número de células vivas (o bien de células muertas) en un cultivo celular. Estos ensayos se utilizan para determinar el efecto de diversos componentes que pueden ir desde pequeñas moléculas naturales o sintéticas hasta grandes polímeros y macromoléculas biológicas. Es de esperar entonces que estas técnicas sirvan no solo para evaluar posibles agentes tóxicos sino también agentes que puedan inducir la proliferación y supervivencia celular o que puedan ejercer un efecto protector sobre las mismas.

La integridad de la membrana es la característica más utilizada para detectar si las células eucariotas cultivadas *in vitro* están vivas o muertas. Las células que han perdido la integridad de la membrana y permiten el movimiento de moléculas que de otro modo no serían permeables se clasifican como no viables o muertas. La detección de células muertas se logra midiendo el movimiento de moléculas dentro o fuera de las células a través de membranas que se han vuelto permeables y no pueden repararse.

Para esto existen tinciones que penetran selectivamente las células muertas. El ejemplo más conocido es el Tripan Blue o azul de tripan y el principio general es que este puede atravesar únicamente aquellas células dándoles una coloración azul que luego puede ser visualizada bajo el microscopio y contadas en un hemocitómetro (cámara de Neubauer). Otro ejemplo conocido es las tinciones fluorescentes de unión al DNA y que pueden ser utilizados para observación bajo microscopio o mediante técnicas de citometría de flujo. En este caso existe una gran variedad de formas de tinción y la elección dependerá de las condiciones del ensayo.

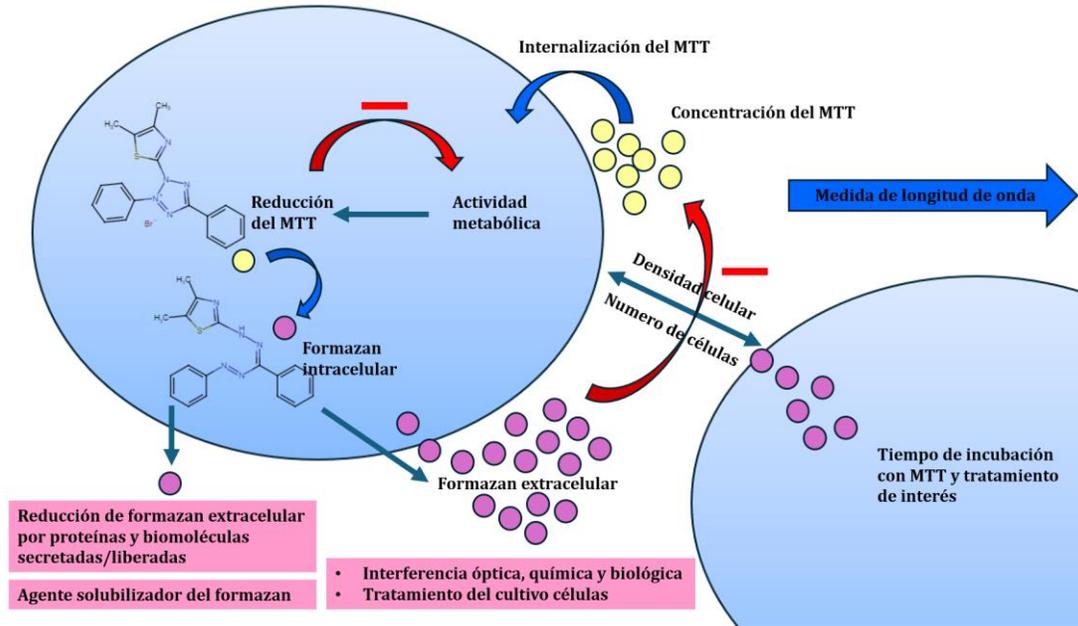


Figura 22: Representación de los procesos que ocurren en un cultivo celular expuesto al reactivo MTT. Factores que interfieren en los resultados del ensayo y por ende en la densidad óptica (Traducido y adaptado de M. Ghasemi 2021).

De manera análoga existen compuestos que en lugar de penetrar o unirse a componentes celulares se unen a componentes que la célula expulsa al medio extracelular como las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), adenilato quinasa (ADK), entre otras (T. Riss 2019).

Además de los ensayos mencionados, también existen otros tipos de ensayos que no se basan en la visualización de las células ya sea mediante microscopio o técnicas como citometría de flujo, sino que usan métodos colorimétricos para la detección de células viables. Estos ensayos, realizados en placas de cultivo, se basan en la medición de la absorbancia a una longitud de onda determinada que mide un producto generado por las células viables.

Los compuestos más utilizados para este tipo de ensayos son: MTT, MTS, XTT y WST-1. Estos compuestos se dividen en dos categorías básicas: 1) MTT, que tiene carga positiva y penetra fácilmente en las células eucariotas viables, y 2) aquellos como MTS, XTT y WST-1 (ver figura 22) que tienen carga negativa y no penetran fácilmente en las células. La última clase (MTS, XTT, WST-1) se usa típicamente con un aceptor de electrones intermedio que puede transferir electrones desde el citoplasma o la membrana plasmática para facilitar la reducción del tetrazolio al producto coloreado de formazán (T. Riss 2013).

2. Resonancia de plasmon superficial

La técnica de SPR es una de las más utilizadas para determinar la afinidad y los parámetros cinéticos durante la unión de dos moléculas sin necesidad de un marcado (lo que en inglés se denomina *label-free*). Esta técnica óptica mide los cambios del índice de refracción en las proximidades de capas metálicas delgadas (películas de oro, plata o aluminio) en respuesta a interacciones biomoleculares.

Primero, los agentes de captura, como anticuerpos, enzimas, péptidos y DNA, se inmovilizan en la superficie del SPR. Luego la solución de muestra puede fluir a través de dicha superficie.

Los cambios en el ángulo de SPR (ver figura 23), que es el ángulo de reflectividad mínima, se pueden determinar variando el ángulo de incidencia y registrando la intensidad de la luz reflejada durante las reacciones de unión biológica entre varias biomoléculas.

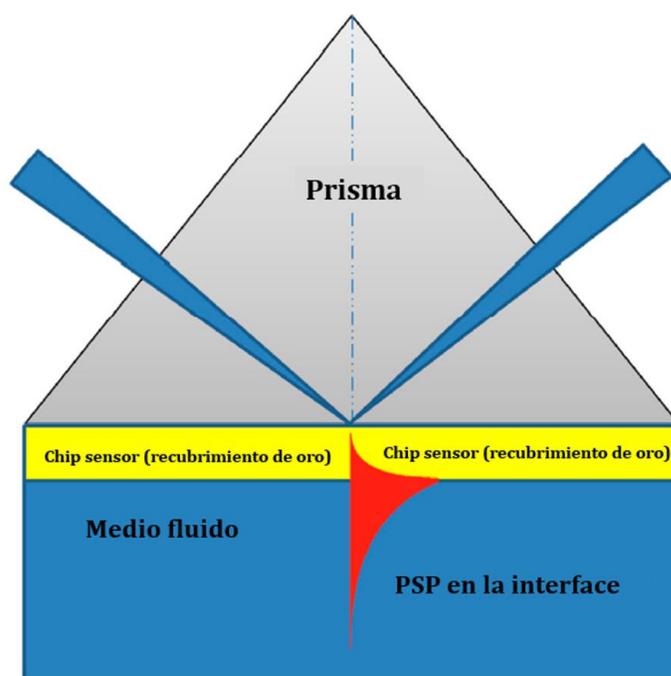


Figura 23: Concepto de biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR). Incidencia de la luz policromática sobre el prisma y el chip sensor (Generalmente recubierto de oro). Esquematización del cambio del ángulo en la incidencia de la luz policromática gracias a la unión de un analito. El cambio en el índice de refracción se rastrea por el acoplamiento de la luz incidente en un plasmón de superficie de propagación (PSP) en la interfase (Traducido y Adaptado de H. Nguyen 2015).

La resonancia de plasmón superficial se produce cuando un fotón de luz incidente incide en una superficie metálica (normalmente una superficie de oro). En un cierto ángulo de incidencia, una parte de la energía luminosa se acopla a través del revestimiento metálico con los electrones de la capa superficial del metal, que luego se mueven debido a la excitación. Los movimientos de los electrones ahora se denominan plasmones y se

propagan paralelos a la superficie del metal. La oscilación del plasmón, a su vez, genera un campo eléctrico cuyo rango es de alrededor de 300 nm desde el límite entre la superficie del metal y la solución de muestra. En la configuración de un biosensor SPR comercial, la luz incidente se emplea utilizando un prisma de vidrio de alto índice reflectante. El ángulo SPR definido, en el que se produce la resonancia, depende del índice de refracción del material cerca de la superficie del metal. Cuando hay un pequeño cambio en el índice de reflexión del medio sensor (por ejemplo, a través de la unión de una biomolécula), no se puede formar plasmón. De este modo, la detección se logra midiendo los cambios en la luz reflejada obtenidos en un detector. Normalmente, un biosensor SPR tiene un límite de detección del orden de 10 pg/mL.

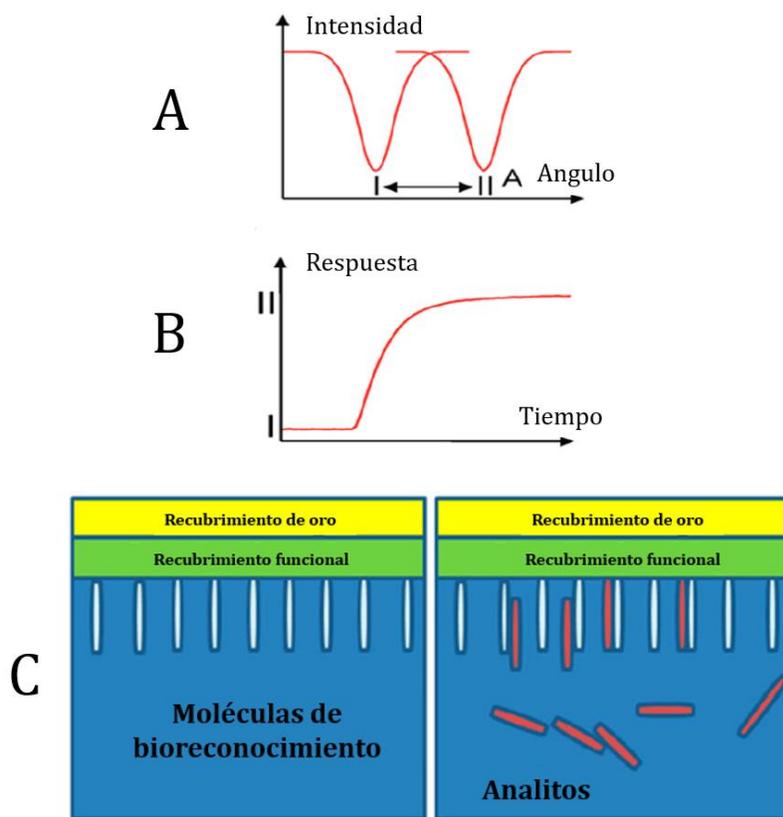


Figura 24: Diseño del chip de reconocimiento. Espectro de luz reflejada antes (A) y después del cambio del índice de refracción (B), seguido de cambios en el índice de refracción causados por las interacciones moleculares en el medio de reacción. Elementos de biorreconocimiento de analitos que se unen a la superficie del sensor SPR (C) (Traducido y Adaptado de H. Nguyen 2015).

En los biosensores SPR, las moléculas sonda (es decir las de captura) se inmovilizan en la superficie del sensor (ver figura 24). Cuando la solución de las moléculas blanco entra en contacto con la superficie, se produce una unión sonda-blanco lo que induce un aumento en el índice de refracción en la superficie del sensor SPR. En los experimentos

de SPR, se utilizan unidades de resonancia o respuesta (RU) para describir el cambio de señal, donde 1 RU equivale a un cambio de ángulo crítico de 10^{-4} grados. Con esta técnica, la constante de asociación (k_{on}) durante la fase de unión, la tasa de disociación (k_{off}) cuando las moléculas objetivo se eliminan del flujo continuo mediante lavado con tampón, y otros parámetros relacionados a la cinética de la interacción pueden determinarse mediante SPR (H. Nguyen 2015).

3. Bioinformática estructural y dinámica molecular de ADN

Lograr alcanzar una comprensión a nivel molecular de la interacción entre los aptámeros y el receptor, requiere del conocimiento de la estructura molecular 3D con detalle atómico. Ese conocimiento puede alcanzarse usando técnicas de Resonancia Magnética Nuclear de protones (^1H -RMN), cristalización y difracción de Rayos-X, o usando métodos de la bioinformática y química computacional. Estos últimos resultan muy convenientes para predecir la estructura molecular por su bajo costo frente a las otras dos técnicas que son muy caras y que requieren de expertos en ácidos nucleicos (la mayoría de los grupos del mundo trabajando en RMN o Rayos-X centran sus esfuerzos en la elucidación de la estructura de proteínas (P. Dans 2016).

Sin embargo, predecir la estructura tridimensional de un ácido nucleico a partir de la secuencia es un desafío que requiere de la integración de varios modelos y herramientas teóricas y computacionales. Típicamente, la obtención de una estructura 3D y el conocimiento sobre su flexibilidad requiere de varias etapas concatenadas que implican: i) predecir la estructura secundaria; ii) predecir una primera aproximación a la estructura 3D; iii) llevar cabo simulaciones de dinámica molecular.

3.1 Predicción de la estructura secundaria de oligonucleótidos

El estudio de las estructuras 2D comenzó a finales de la década de los ochenta cuando M. Zuker desarrolla un algoritmo recursivo para atacar el problema del plegamiento de moléculas de ARN a partir de la secuencia (M. Zuker 1989). Dicho algoritmo se basa en parámetros termodinámicos sobre los apareamientos canónicos, la formación de horquillas y *loops* internos. A finales de la década de los noventa se desarrolla un programa llamado mfold que permite predecir la estructura 2D de moléculas de ADN utilizando los datos termodinámicos aportados por J. SantaLucia (J SantaLucia 1998). Otra alternativa para ADN/ARN, que incluye una etapa de minimización de la energía, se conoce como RNAstructure y cuenta con parámetros específicos para predecir pseudonudos (Z. Xu et al. 2016). La suite de programas ViennaRNA cuenta con un programa denominado RNAfold que también permite la predicción secundaria de moléculas de ADN (R. Lorenz 2011).

Estos servidores brindan, además de una representación gráfica de la estructura mostrando el plegamiento 2D, un archivo en formato texto dónde la estructura 2D está descrita usando el llamado formato VIENNA o notación de *dot-brackets* (A. Gruber 2008). Como puede verse en la Figura 25, las bases se representan con un paréntesis o un punto según se encuentren en regiones que están apareadas con una doble hebra canónica (*stem*) o se encuentran desapareadas (*loops*, horquillas, etc.), respectivamente.

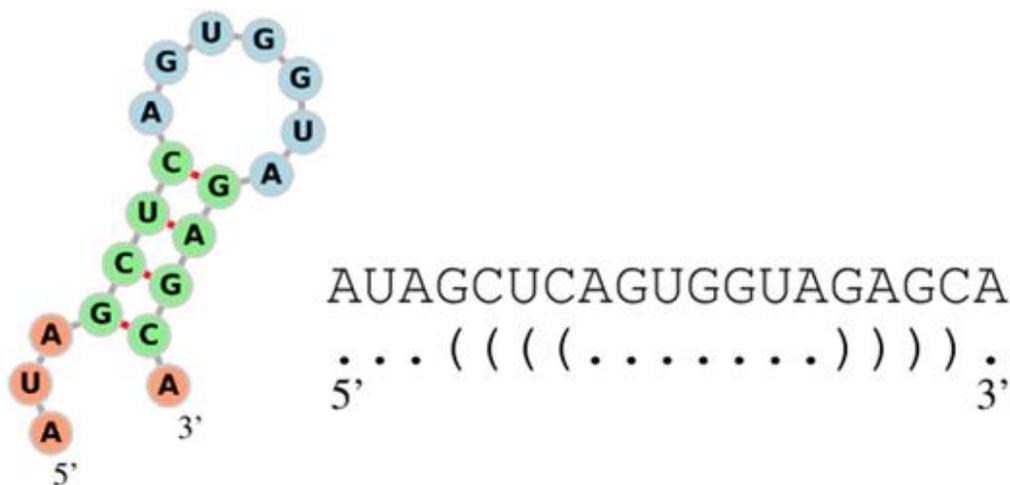


Figura 25: plegamiento de una molécula de ssARN. Izquierda: Ejemplificación de la estructura secundaria adoptada por una secuencia de ARN de simple cadena. Derecha: se muestra la secuencia nucleotídica y la notación en formato VIENNA que permite observar en forma de texto cuales bases se encuentran apareadas y cuales sin aparear.

Esta notación en formato VIENNA es importante para la predicción de una estructura inicial en 3D, ya que los programas disponibles para tales fines usualmente toman como datos de entrada la secuencia y la información sobre la estructura secundaria.

3.2 Predicción de estructuras terciarias de oligonucleótidos

Inicialmente los predictores de estructuras tridimensionales estaban centrados en la predicción de moléculas de RNA (P. Dans et al. 2018, P. Dans 2022). En la actualidad sigue habiendo significativamente más desarrollos para la predicción de la estructura 3D de ARN que ADN. Sin embargo, existen algunas alternativas para ADN que toman como

punto de partida la secuencia y la topología de la estructura secundaria. En la mayoría de los casos, se divide la estructura secundaria en fragmentos y luego el algoritmo busca en un diccionario de elementos 3D aquellos fragmentos que mejor coincidan con la estructura de interés. El modelo 3D es construido por un montaje de elementos 3D seleccionados y luego se refina la estructura 3D final mediante la minimización de la energía interna. Estas predicciones iniciales 3D no suelen ser muy exactas, pero son un buen punto de partida para simulaciones de dinámica molecular donde se pueda agregar las condiciones de laboratorio (temperatura, presión) y hasta reproducir el buffer utilizado.

Varios de estos servidores brindan más de una estructura tridimensional posible al igual que los predictores 2D. 3dDNA (Y. Zhang et al. 2022) y RNAcomposer (R. Das et al. 2022) son dos ejemplos que funcionan con ADN. El resultado final es una o varias estructuras con sus coordenadas x, y, z en un archivo en formato PDB (M. Biesiada 2016).

3.3 Dinámica molecular de ADN

La dinámica molecular es una técnica que se basa en propagar a lo largo del tiempo las ecuaciones de Newton de la cinemática para un conjunto de esferas (representan los átomos) unidas por resortes (representan los enlaces covalentes). Las esferas tienen carga y parámetros de van der Waals que permiten modelar las interacciones no-enlazantes, incluyendo puentes salinos, enlaces de hidrógeno, efecto de apilamiento, etc. Las esferas también tienen cierta valencia asignada y estados de hibridación (sp , sp^2 , sp^3) que dan cuenta de la química de los átomos más comunes que se encuentran en los sistemas biológicos (C, N, O, H, Fe, Mg, etc.) (M. Badar 2022).

Para poder propagar las ecuaciones de la cinemática y poder predecir cómo se desplazarán los átomos de la molécula en un tiempo $t+\Delta t$, es necesario calcular las fuerzas ejercidas sobre cada átomo del sistema. Si se conocen las fuerzas y se usa un paso de tiempo lo suficientemente pequeño para asegurar microreversibilidad (típicamente 1 a 4 fs), es posible construir una trayectoria clásica que representa cómo se mueven los átomos de una molécula (y la molécula como un todo) sobre una cierta superficie de energía potencial (D. Frenkel 2002) (ver figura 26).

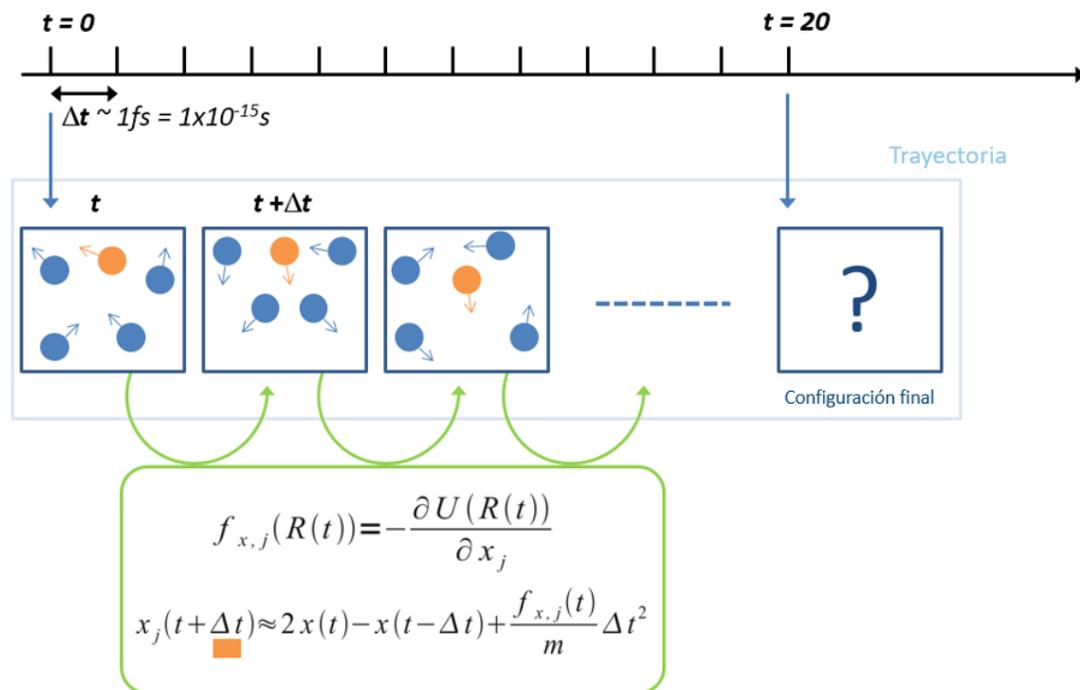


Figura 26: Propagación de las ecuaciones de Newton a lo largo del tiempo. Esquema de las etapas necesarias para obtener las posiciones y velocidades de un sistema molecular (formado por esferas rígidas unidas por resortes), usando un paso de tiempo (Δt) lo suficientemente pequeño como para asegurar micro-reversibilidad (condiciones de equilibrio). La energía interna del sistema que se necesita para calcular las fuerzas se obtiene del campo de fuerza (D. Frenkel 2002).

Como la fuerza se puede calcular como la derivada parcial de la energía interna en función de las posiciones de los átomos, si se cuenta con una función que permite determinar la energía interna molecular el problema estaría resuelto. Dicha función se denomina Hamiltoniano y es parte fundamental de lo que llamamos un campo de fuerza. Un campo de fuerza se compone por una serie de ecuaciones que permiten relacionar las posiciones de los átomos con la energía, un conjunto de parámetros (como las cargas parciales atómicas) y los llamados tipos de átomos. El tipo de átomo permite distinguir y aplicar parámetros diferentes a un O que pertenece a un grupo alcohol o a un carbonilo. Por ejemplo, existe un tipo de átomo para C formando simples, dobles y triples enlaces con otro C, o con N, o simplemente con H, etc. En los campos de fuerza clásicos para el estudio de biomoléculas se suele usar como Hamiltoniano una suma de términos armónicos (ver figura 27) (D. Case 2023).

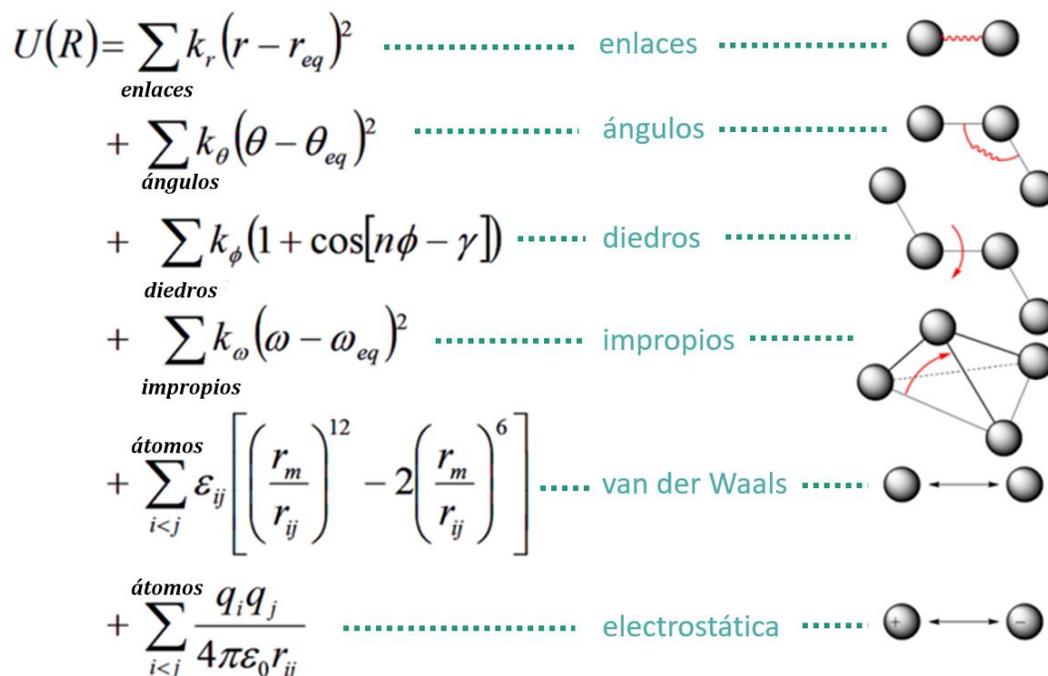


Figura 27: Hamiltoniano de energía clásico. El cálculo de la energía interna molecular en función de las posiciones de los átomos se obtiene sumando términos para las interacciones enlazantes (enlaces, ángulos, diedros) y no enlazantes (van der Waals y electrostática). Para los enlaces y ángulos se usan términos armónicos, para las fuerzas de van der Waals el potencial de Lennard-Jones y para la electrostática la ecuación de Coulomb. El término denominado diedros se usa para corregir inexactitudes de los campos de fuerza por las aproximaciones que se toman, y los impropios permiten controlar la planaridad y quiralidad de varios grupos químicos (D. Case 2023).

Para iniciar una simulación de dinámica molecular se necesita una estructura inicial que puede ser tomada del PDB o puede provenir de una predicción como las mencionadas en la sección anterior.

La dinámica resulta fundamental para refinar las interacciones moleculares internas y con el solvente, reproduciendo las condiciones de temperatura, presión y buffer usadas en el SELEX. Además de optimizar las interacciones, estas simulaciones permiten muestrear el espacio conformacional, tener una idea de los sub-estados conformacionales que el aptámero puede adoptar y analizar en detalle su flexibilidad. Hoy en día, lo que se considera estándar para moléculas del tamaño de los aptámeros es propagar las ecuaciones hasta alcanzar la escala de los microsegundos, usando el campo de fuerza estado del arte PARMBSC1 para representar al ADN (I. Ivani et al. 2015). PARMBSC1 ha demostrado ser capaz de producir estructuras de ADN indistinguibles de las que se obtienen experimentalmente por rayos-X o RMN (P. Dans et al. 2017). También se debe especificar un campo de fuerza para los iones, el agua, elegir un termostato y un baróstato, entre otros aspectos que se especifican en los Materiales y Métodos.

3.4 Herramientas de *Docking* Molecular

Las herramientas de docking sirven para predecir los posibles modos de unión de dos moléculas. Puede tratarse de dos macromoléculas o también es usual que uno de los componentes sea un pequeño ligando, como un fármaco. Los programas dedicados a macromoléculas que realizan este tipo de predicciones por lo general pueden predecir interacciones proteína-proteína y proteína-ácido nucleico a partir de dos estructuras tridimensionales en formato PDB (P. Agu 2023). Estos algoritmos pueden generalmente ajustarse para hacer búsquedas rápidas asumiendo que ambas moléculas son rígidas (*docking* rígido) y una vez encontradas las regiones de ambas moléculas que mejor se complementan en base a forma, volumen, superficie y carga, refinar la búsqueda agregando cierto grado de flexibilidad en los ligandos. Las distintas poses que el ligando puede adoptar dado el receptor son evaluadas usando una función de puntaje. Generalmente, para mantenerse del lado de la química, que es terreno conocido, la función de puntaje tiene en cuenta la atracción/repulsión que proviene de las cargas (usando la ecuación de Coulomb) o de las interacciones de van der Waals (usando la ecuación de Lennard-Jones). La superficie accesible al solvente suele ser otro parámetro usado para generar un puntaje de las mejores poses. Algunos programas presentan esos puntajes reportándolos como energías, cuánto más negativo el valor más favorable es esa pose. HADDOCK (F. Ambrosetti 2023) y HDOCK (P. Agu 2023), son dos de esos programas disponibles gratuitamente para hacer *docking* proteína-ácido nucleico de forma rápida a través de un servidor web. Cuando se usan los servidores web (que funcionan en gran medida como una caja negra, dónde sólo se pueden definir unas pocas variables), una manera posible de introducir cierto grado de flexibilidad en las hipótesis de unión que se van a generar es elegir de la dinámica molecular algunas conformaciones 3D representativas de la flexibilidad de la molécula y hacer *docking* partiendo de cada una de ellas.

C. HIPOTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO

1. Hipótesis

Los aptámeros seleccionados mediante SELEX contra el receptor HER2, que mostraron resultados preliminares prometedores, tienen por sí solos efectos citotóxicos en células tumorales que sobreexpresen el receptor. Más allá de los efectos citotóxicos posibles, los aptámeros se unen con alta afinidad a la porción extracelular de HER2. La caracterización estructural y dinámica permite determinar la forma de los aptámeros en 3D y cómo interactúan a nivel molecular con el receptor.

2. Objetivo general

Usando un enfoque interdisciplinario, aplicar un conjunto de métodos experimentales y teóricos que permitan evaluar los aptámeros F17, F21, F23 y F30 como posibles agentes de terapia o diagnóstico para tumores en cáncer de mama que sobreexpresen HER2.

3. Objetivos específicos

1. Realizar ensayos de viabilidad en células que sobreexpresan el receptor HER2 (línea celular BT474) y comparar los resultados con células con niveles basales (línea celular MDA-MB-231) para evaluar la capacidad citotóxica de los 4 aptámeros mencionados.
2. Evaluar la afinidad de los cuatro aptámeros por la porción extracelular del receptor HER2 mediante la técnica de resonancia de plasmon superficial.
3. Caracterizar desde el punto de vista molecular la estructura y la flexibilidad de los 4 aptámeros seleccionados y predecir su modo de unión a la porción extracelular del receptor HER2.

D. MATERIALES Y METODOS

1. Ensayos de viabilidad celular

Para los ensayos de viabilidad celular se utilizaron los siguientes reactivos y materiales:

Línea celular BT474 (ATCC); línea celular MDA-MB-231 (ATCC); medio RPMI 1640 (Capricorn); Suero fetal bobino (SFB) (Capricorn); Tripsina (Capricorn); PBS (Capricorn); frascos T25 y T75 (Nest); placas de 96 pocillos (CellStar y Nest); pipetas de 5 y 10 mL (Nest); CellTiter 96® (Promega); Aptámeros F17, F21, F23, F30 modificados en extremo 3' con un grupo aminohexilo (obtenidos de IDT); Aptámeros F17, F21, F23, F30 modificados en el extremo 5' con un grupo aminohexilo (obtenidos de IDT); anticuerpo trastuzumab, Herceptin (Roche®); H₂O mQ autoclavada.

Los equipos utilizados para los ensayos fueron:

Incubadora de CO₂ (Biobase bjpx-C80); Microscopio de contraste de fases (Labomed TCM 400); Centrifuga (Thermo Scientific Sorvall ST 8R); cámara de flujo laminar vertical (Holten LaminAir 1.5); lector de placas TECAN Infinite® F50; lector de placas Thermo electron corporation Varioskan™.

Previo al inicio de los ensayos se resuspendieron los liofilizados de cada uno de los aptámeros mencionados en H₂O mQ autoclavada, llevándolos todos al volumen necesario para una concentración final de 10 µM. El volumen requerido estuvo determinado por la masa de aptámero disponible en el liofilizado.

Los ensayos de viabilidad celular fueron realizados en placas de 96 pocillos tratadas para cultivo celular. Se realizaron dos tipos de ensayos:

- 1- Ensayos comparativos para evaluar la capacidad citotóxica entre los diferentes aptámeros modificados en diferentes extremos.
- 2- Ensayos IC₅₀ para evaluar la capacidad citotóxica del aptámero que presento mayor citotóxica.

Se realizaron estos ensayos en dos líneas celulares en paralelo, la línea celular BT474, como se ve en la figura 28, caracterizada por la sobreexpresión de receptor HER2 (++++) y que es una línea celular aislada de un carcinoma ductal invasivo sólido.

Esta línea fue crecida en frascos T25 en medio RPMI 1640 SFB 10% hasta llegar a confluencia (90% de la superficie del frasco cubierta por células aproximadamente) para luego realizar los plaqueo necesarios.

La segunda línea celular utilizada fue la línea MDA-MB-231 como se ve en la figura 28, que es una línea celular aislada de un adenocarcinoma de mama que expresa una cantidad basal de receptor HER2 (+).

Esta línea fue crecida en frascos T25 en medio RPMI 1640 SFB 10% hasta llegar a confluencia (90% de la superficie del frasco cubierta por células aproximadamente) para luego realizar los plaqueo necesarios.

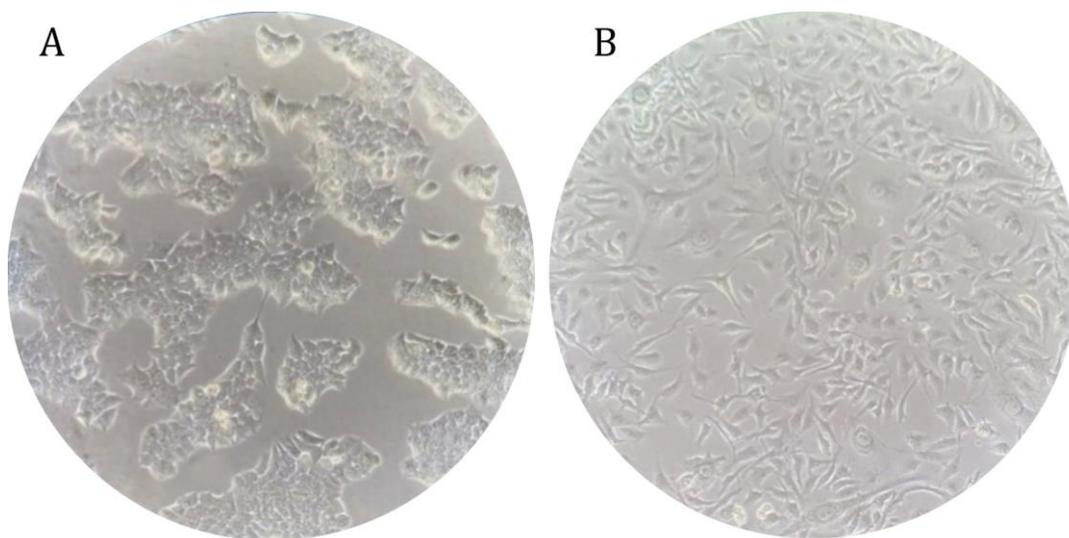


Figura 28: Cultivos celulares de las líneas utilizadas vistos bajo microscopio de contraste de fases.
Cultivo celular de la línea BT474 (A) y de la línea celular MDA-MB-231 (B)

Se pusieron a punto varias condiciones para los ensayos (ver tablas 7 y 8), variando el número de células plaqueadas, entre ellas, el tiempo de crecimiento de las células, la concentración de los fármacos, tiempo de incubación con los fármacos y el tiempo de medición post agregado el reactivo MTS (ver figura 29).

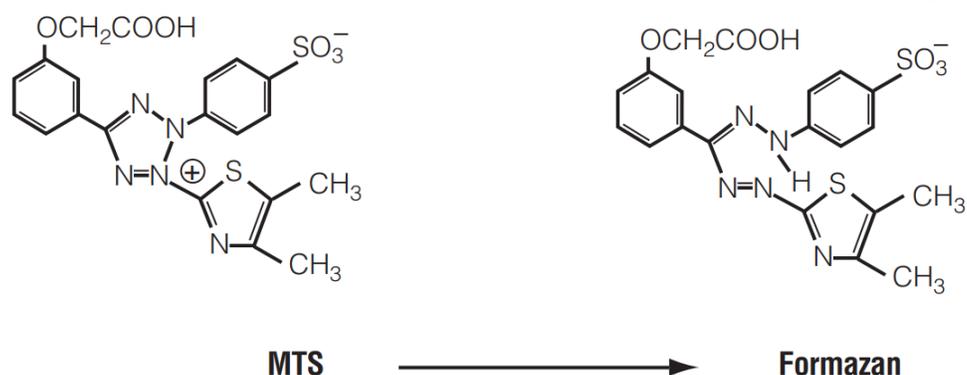


Figura 29: Reacción química llevada a cabo por enzimas deshidrogenasas en el reactivo MTS (Molécula a la izquierda de la reacción). Generación de Formazan (Molécula de la derecha de la reacción) por enzimas deshidrogenasas que se localizan en las mitocondrias celulares.

1.1 Ensayos comparativos

Se realizaron ensayos de MTS comparativos utilizando los aptámeros modificados con un grupo aminohexilo en el extremo 3' y los modificados en el extremo 5' con el mismo aminohexilo.

A pesar de que la secuencia de los aptámeros modificados en 3' y 5' son las mismas, el hecho de estar modificados en extremos diferentes puede significar que la molécula presente cambios estructurales y cambios en la estructura final. Por eso la misma secuencia modificada en un extremo u otro son considerados fármacos diferentes.

Como control positivo se utilizó el anticuerpo monoclonal Trastuzumab (Herceptin®) a la misma concentración que los aptámeros. Este mAb fue usado como control positivo ya que es utilizado en el tratamiento de cáncer de mama que sobreexpresa HER2 por su capacidad citotóxica.

Como control negativo se utilizó H₂O mQ autoclavada y aptámeros anti-HER2 fueron previamente caracterizados por otros grupos de investigación y que se sabía que no presentaban citotoxicidad sobre estas líneas celulares.

Las células se incubaron en estufa de CO₂ 5% a 37 C durante 72 h. La incubación con los fármacos se realizó durante una hora. Luego se procede a agregar el reactivo MTS e incubar en estufa de CO₂ 5% a 37 C durante 1 hr. Se realizó la primera medición en TECAN a 492 nm luego de 1 hora de agregado el reactivo MTS, a las 4 h y las 24 h.

Previo a la incubación de los aptámeros con las células se reestructuraron los aptámeros a 95 °C durante 10 minutos para separar los oligonucleótidos en solución y así quedar en su forma abierta para luego ponerlos en hielo y generar un shock térmico durante 10

min. Este cambio brusco de temperatura genera que el aptámero se cierre y se pliegue sobre sí mismo.

Este proceso debe ser llevarse a cabo cada vez que se realiza un ensayo *in vitro* con aptámeros, por lo que también fue realizado en los ensayos posteriores.

Tabla 7: Variables modificadas en distintos ensayos comparativos. Se ven en la primera columna las variables que fueron modificadas y en la segunda y tercera columna los valores utilizados para las líneas celulares BT474 y MDA-MB-231 respectivamente.

	BT474	MDA-MB-231
Número de células plaqueadas por pocillo	6000 – 12000	3000 - 6000
Tiempo de crecimiento de las células	72 h	
[] final por pocillo de fármacos	1 μ M	
Tiempo de incubación con los aptámeros	1 h	
Tiempo de incubación con reactivo MTS	1 h	
Tiempo de lectura post agregado reactivo MTS a 492 nm	1h – 4 h – 24 h	

El diseño de la placa de los ensayos comparativos constó de sextuplicados para cada tratamiento. Los bordes de la placa de 96 pocillos fueron llenados con 100 μ L de blanco, compuesto por 90 μ L de medio RPMI 1640 sin SFB + 10 μ L de H₂O. El blanco fue utilizado luego para el procesamiento de los datos y, no menos importante, para evitar la evaporación del medio en los pocillos donde se encontraban las células sembradas (ver figura 30).

B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	TZM (C+)	5F17	5F21	5F23	5F30	3F17	3F21	3F23	3F30	H ₂ O (C-)	B
B	TZM (C+)	5F17	5F21	5F23	5F30	3F17	3F21	3F23	3F30	H ₂ O (C-)	B
B	TZM (C+)	5F17	5F21	5F23	5F30	3F17	3F21	3F23	3F30	H ₂ O (C-)	B
B	TZM (C+)	5F17	5F21	5F23	5F30	3F17	3F21	3F23	3F30	H ₂ O (C-)	B
B	TZM (C+)	5F17	5F21	5F23	5F30	3F17	3F21	3F23	3F30	H ₂ O (C-)	B
B	TZM (C+)	5F17	5F21	5F23	5F30	3F17	3F21	3F23	3F30	H ₂ O (C-)	B
B	TZM (C+)	5F17	5F21	5F23	5F30	3F17	3F21	3F23	3F30	H ₂ O (C-)	B
B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

Figura 30: Diseño de la placa de 96 pocillos para los ensayos comparativos. En los bordes de los pocillos se observa el blanco. De izquierda a derecha se observa primero el control positivo Trastuzumab (TMZ (C+)), seguido por los aptámeros modificados en el extremo 5' en gradiente de azules de más claro a más oscuro, seguido por los aptámeros modificados en el extremo 3' (con el mismo patrón de coloración que los anteriores) y por último en verde el control negativo con agua (H₂O (C-)).

Posterior a la lectura de la absorbancia a 492 nm en el lector de placas, se procedió a realizar el procesamiento de los datos.

Primero de cálculo el promedio de los valores de absorbancia de los pocillos de los blancos y el promedio de la absorbancia de los pocillos del control negativo (células sin tratar en verde de la figura 30).

Una vez obtenidos estos resultados, se procedió a calcular el porcentaje de células viables por pocillo de la siguiente forma:

$$\% \text{ DE CELULAS VIABLES POR POCILLO} = \frac{\text{Abs pocillo problema} - \text{Abs pocillo blanco}}{\text{Abs Control negativo} - \text{Abs pocillo blanco}}$$

Finalmente se calculó el promedio de los porcentajes de células viables para cada tratamiento (sextuplicados) y el correspondiente desvío estándar para cada uno.

1.2 Ensayos de citotoxicidad

Para los ensayos de citotoxicidad, cuyo fin fue evaluar el IC₅₀ (concentración a la cual el 50% de las células se encuentran muertas) se evaluaron diferentes concentraciones realizando triplicados o cuatriplicados de cada concentración para poder obtener promedios significativos. Se realizaron diferentes esquemas en la utilización de los fármacos.

Fueron realizadas diluciones seriadas en la placa de 96 pocillos. También fueron realizados ensayos utilizando diluciones seriadas de los fármacos preparadas en tubos eppendorf y por último distintas diluciones preparadas en tubos eppendorf, pero a partir del stock de aptámero, realizando diferentes tomas.

El control positivo que se utilizó fue Trastuzumab y como control negativo se utilizó H₂O mQ estéril autoclavada al igual que los ensayos comparativos.

Tabla 8: variables modificadas en distintos ensayos de IC₅₀. Se muestran en la primer columna las variables que fueron modificadas y en la segunda y tercera columna los valores utilizados para las líneas celulares BT474 y MDA-MB-231 respectivamente.

	BT474	MDA-MB-231
Número de células plaqueadas por pocillo	12000 – 15000	3000 - 6000
Tiempo de crecimiento de las células (h)	24 – 48	
[] final por pocillo de aptámero 3F21	10 nM – 12,5 μM	
Tiempo de incubación con los aptámeros (h)	24	
Tiempo de incubación con reactivo MTS	40 Min – 1 h	
Tiempo de lectura post agregado reactivo MTS a 492 nm	40 min – 1 h 30 min	

Los diseños de la placa de los ensayos de citotoxicidad para calcular el índice IC₅₀ constaron de triplicados o cuatriplicados para cada concentración diferente de aptámero. Los bordes de la placa de 96 pocillos fueron llenados con 100 uL de blanco (90 μL de medio RPMI 1640 sin SFB + 10 μL de H₂O) Medio RPMI utilizado luego para el

procesamiento de los datos y, no menos importante, para evitar la evaporación del medio en los pocillos donde se encontraban las células sembradas (ver figura 31).

B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	H ₂ O (C-)	1.9	3.9	15.6	31.2	125	250	750	1000	TZM (C+) 1000	B
B	H ₂ O (C-)	1.9	3.9	15.6	31.2	125	250	750	1000	TZM (C+) 1000	B
B	H ₂ O (C-)	1.9	7.8	15.6	62.5	125	500	750	1250	TZM (C+) 1000	B
B	H ₂ O (C-)	1.9	7.8	15.6	62.5	125	500	750	1250	TZM (C+) 1000	B
B	H ₂ O (C-)	3.9	7.8	31.2	62.5	250	500	1000	1250	TZM (C+) 1000	B
B	H ₂ O (C-)	3.9	7.8	31.2	62.5	250	500	1000	1250	TZM (C+) 1000	B
B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

Figura 31: Diseño de la placa de 96 pocillos para los ensayos de citotoxicidad. En los bordes de los pocillos se observa el blanco. De izquierda a derecha se observa primero el control negativo en verde, con agua (H₂O (C-)), seguido por concentraciones crecientes del aptámero F21 de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha. Por último, en positivo en rojo Trastuzumab (TMZ (C+)).

2. Resonancia de plasmón superficial

Para los ensayos de SPR se utilizaron los siguientes reactivos y materiales:

Aptámeros F17, F21, F23, F30 modificados en extremo 3' con un grupo aminohexilo y los mismos aptámeros modificados en el extremo 5' con el mismo grupo funcional. Aptámeros F17, F21, F23, F30 sin modificaciones en los extremos; Aptámero HB5; chip CM5 derivatizado con estreptavidina; porción extracelular del receptor HER2 con un streptag en la porción C-terminal (YCP5458); Buffer Hepes Salino adicionado con 1mM MgCl₂ y 0.005% Tween20; Herceptin (Roche®).

Los equipos utilizados para estos ensayos fueron: Liofilizador (Biobase BK-FD10PT); equipo de SPR Biacore instituto Pasteur (IP) Montevideo, Uruguay.

En primer instancia se realizaron diluciones de cada uno de los aptámeros mencionados en los materiales para llegar a una concentración final de 2 nM de cada uno.

De igual forma se realizaron diluciones para llegar a la misma concentración del receptor HER2 modificado con streptavidina.

Estas muestras fueron liofilizadas durante 24 h para extraer el solvente en el que se encontraban, en este caso H₂O mQ autoclavada.

Una vez obtenido el liofilizado se resuspendieron las muestras en el Buffer Hepes Salino adicionado con 1mM MgCl₂ y 0.005% Tween20. Los aptámeros fueron reestructurados a 95°C durante 10 minutos y luego puestos en hielo para shock térmico.

En el Instituto Pasteur de Montevideo, el personal a cargo del equipo de SPR se encargó de la preparación del chip CM5 derivatizado con estreptavidina y la sensibilización con el receptor HER2 modificado con un streptag en la porción C-terminal tal como se muestra en la figura 32. Esto genera direccionalidad y a su vez la posibilidad de regenerar el sistema para volver a ser utilizado

En esta etapa comienza el ensayo y luego de la primer medición de difracción del haz de luz policromático sobre el prisma luego de haber unido el receptor HER2-Streptag al chip, se agregan las muestras de interés, es decir los aptámeros F17, F21, F23, F24, F30 y el aptámero HB5. Luego se agregó solvente de menor a mayor concentración para separar las muestras del receptor HER2 y poder medir el cambio en el índice de refracción sobre el prisma que eventualmente es medido en unidades de respuesta en función del tiempo en minutos.

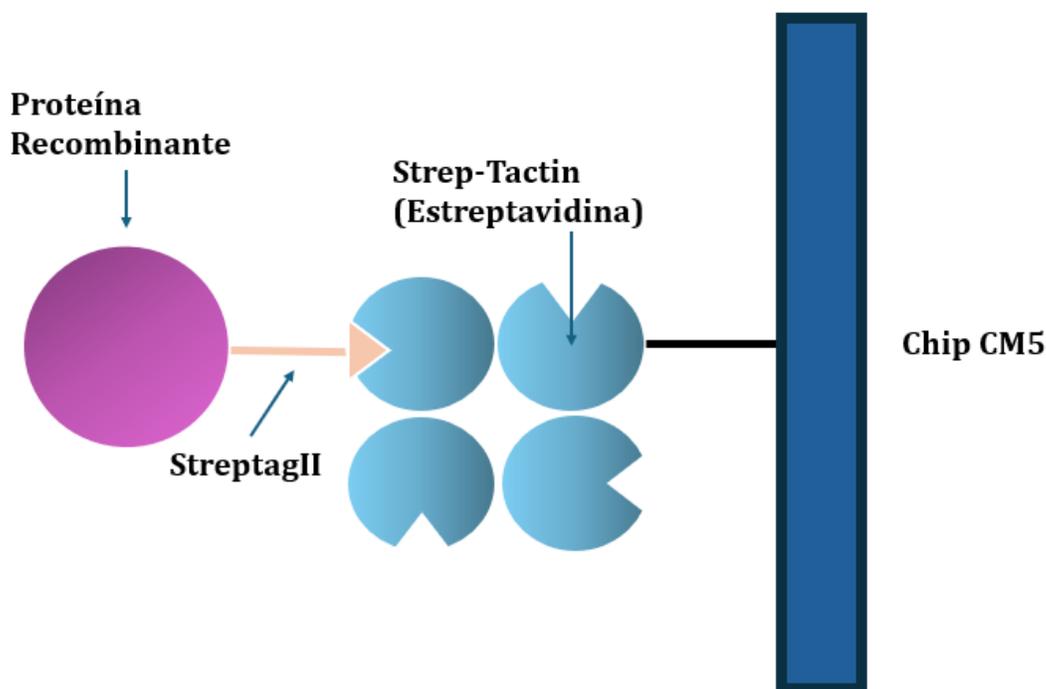


Figura 32: Estrategia para la realización del ensayo de SPR. Esquematación de la unión de la proteína recombinante HER2 con su streptag, unida a la estreptavidina que se conjuga al chip CM5. Esta técnica genera direccionalidad y permite la reutilización del chip luego de cada muestra de aptámero eluida.

3. Análisis bioinformático y modelado molecular

Para la caracterización estructural y dinámica de los aptámeros usando herramientas bioinformáticas y modelado molecular se trabajó en Linux en los servidores de cálculo del grupo de Biofísica Computacional que cuenta con GPUs modelos RTX 3080, 3090 y 4080.

3.1 Predicción de estructuras secundarias de oligonucleótidos

Para el estudio de las estructuras 2D se recurrió inicialmente a tres programas: mfold, RNAstructure y RNAfold y se realizaron las predicciones para los cuatro aptámeros en estudio. Los tres servidores permiten la selección de varios parámetros bajo los cuales se realiza la predicción. Para todos los casos se fijó la concentración a 1 M de Na⁺ Cl⁻ a una temperatura de 37°C. Para mfold y RNAstructure se determinó en 10 el número máximo de estructuras a predecir, mientras que RNAfold solo arroja una única estructura secundaria posible. En todos los casos se seleccionó, entre la opción molécula lineal o circular, la opción lineal. La estructura secundaria se puede clasificar en motivos estructurales como los que se muestran en la Figura 32. Las regiones apareadas según Watson-Crick se encuentran en los “tallos” (*stem* en inglés), los cuales están intercalados por horquillas (*hairpin* en inglés), protuberancias (*Bulge* en inglés), uniones (*junction* en inglés), etc. Estos servidores arrojan más de una estructura posible junto a una energía asociada al ΔG . Cuanto más negativa es la energía, más estable es la estructura predicha. Esto ayuda a elegir entre las distintas soluciones que brindan los programas.

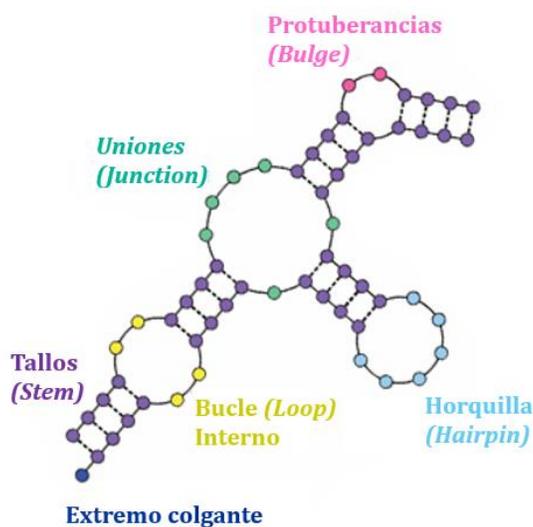


Figura 33: posibles motivos estructurales encontrados en estructuras secundarias. En rosa se observa una protuberancia, en verde unión más conocidas por su nombre en inglés como junction, en violeta los tallos más conocidos por su nombre en inglés como stems, en azul oscuro extremos colgantes, en amarillo bucles internos más conocidos por su nombre en inglés como loops internos y en celeste horquillas más conocidas por su nombre en inglés como hairpin.

3.2 Predicción de estructuras terciarias para oligonucleótidos

Para la obtención de los archivos PDB con las estructuras 3D iniciales se utilizaron dos aproximaciones: 3dDNA y RNAComposer. El primero permite trabajar con ADN, mientras que RNAComposer solo acepta secuencias de ARN. Para poder usarlo, hay que cambiar las T por U en la secuencia y no olvidarse volver a las T cuando se haga la predicción 3D (la corrección en 3D se hace editando el archivo PDB en modo texto, ver más abajo). En esta etapa se debe contar con la secuencia lineal del aptámero y la representación de la estructura secundaria en formato VIENNA. Estos servidores están accesibles en <http://biophy.hust.edu.cn/new/3dRNA> y <https://rnacomposer.cs.put.poznan.pl/>, respectivamente.

3.3 Dinámica molecular de ADN:

Una vez obtenidos los archivos PDB con las estructuras tridimensionales de los aptámeros y sus posibles conformaciones se procesaron los archivos PDB como archivos de texto, con un editor de texto tradicional. En las predicciones 3D iniciales arrojadas por RNAComposer hay que volver a hacer la conversión ARN a ADN. Por lo tanto, se tuvo que modificar los archivos PDB eliminando los grupos hidroxilo (OH) en las ribosas para así obtener el azúcar desoxirribosa y reemplazar los hidrógenos (H) en el carbono 5 de los uracilos por grupos metilo (CH₃) para así transformar los uracilos en timinas. De esta forma se vuelve a la forma DNA de los aptámeros y se pueden realizar los estudios de dinámica molecular. El programa tleap, parte de la suite AMBER22 (D. Case 2023) se utilizó para asistirnos en la conversión de ARN a ADN. También se utilizó tleap para generar la topología que requiere AMBER para poder hacer una simulación. Así se obtuvieron los archivos:

- *prmtop*: Contiene la topología molecular y los parámetros del campo de fuerza que son necesarios para el sistema específico que se va a simular.
- *rst7*: Contiene las coordenadas de los átomos de la molécula, velocidades (opcional) y las dimensiones de la caja de simulación y su forma.

Luego de minimizar, termalizar y equilibrar por 50 ns la estructura del aptámero F21, se llevaron a cabo 3 simulaciones de dinámica molecular de producción. Se hizo una simulación libre durante 500 ns a 25°C que se utilizó para caracterizar la flexibilidad del aptámero, llevando a cabo un análisis de dinámica esencial. Finalmente, del análisis visual con VMD (W. Humphrey 1996) de la trayectoria de producción se escogió una estructura representativa para llevar a cabo los experimentos de docking (ver más abajo). En todos los casos se usó PARMBSC1 para caracterizar al ADN (Ivani et al, Nature Methods, 2016), el solvente usado fue TIP3P (en una caja octaédrica de 10 Å alrededor del aptámero) (S. Boonstra 2016), y el aptámero fue neutralizado con Na⁺ (se aplicaron los parámetros de Cheatham para iones divalentes) (I. Joung 2008). Para correr la

simulación se usó el módulo pmemd.cuda (J. Harris 2022) de AMBER22 que corre sobre las tarjetas gráficas de los servidores de cálculo, llamadas GPU.

Las trayectorias obtenidas fueron analizadas con cptraj de AMBER22 para calcular por ejemplo el RMSD (desvío cuadrático medio, del inglés Root Mean Square Deviation) de las posiciones de cada átomo durante la simulación respecto a la estructura de partida. También se usó VMD como herramienta de análisis visual. Se analizó por ejemplo la conservación de los enlaces de hidrógeno de Watson-Crick en los segmentos de doble hebra en forma B.

3.4 Herramientas de *Docking* molecular

Para generar hipótesis sobre la unión entre las estructuras obtenidas de la dinámica molecular y la molécula diana, que en este caso es la porción extracelular del receptor HER2, se debe contar con la estructura del receptor en formato PDB. Para eso se realizó una búsqueda de todas las estructuras de HER2 disponibles en el Protein Data Bank.

Se utilizaron dos filtrados de búsqueda. Uno solo con las siglas HER2 y otro con las siglas HER2 y ERBB2. Con estas palabras claves se encontraron 26 estructuras. Muchas de las estructuras se encuentran unidas a complejos proteicos como anticuerpos, péptidos y otros compuestos moleculares. De este modo, las 26 estructuras se procesaron con el fin de eliminar cualquier componente que no fuera la porción extracelular del receptor de interés. Se procedió luego a alinear las estructuras usando el programa Pymol. Este programa permite realizar un alineamiento de las secuencias aminoacídicas y superponer las estructuras en la misma posición en los ejes X, Y y Z.

El alineamiento realizado en pymol se bajó en formato jvp. para luego fue analizarlo con más detalle usando el visualizador Jalview. De dicho alineamiento se descartaron 21 estructuras y se volvieron a alinear y analizar los 5 restantes. Finalmente se seleccionó la estructura con código PDB 6J71 para llevar a cabo los experimentos de docking molecular.

Para realizar el docking se debe procesar el archivo PDB seleccionado agregando en este caso los protones (en las estructuras que provienen de difracción de rayos-X no están determinadas las posiciones de los átomos de H, ya que no se observan). Para calcular el estado de protonación correcto de los residuos de HER2 a pH 7, se utilizó el servidor H++ (<https://wenmr.science.uu.nl/>), fijando la constante dieléctrica interna a 4 para las proteínas (A. Cuervo 2014). Los experimentos de unión se llevaron a cabo online usando el algoritmo de docking rígido-rígido implementado en HDock Server (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) usando las opciones por defecto.

E. RESULTADOS

1. Ensayos de viabilidad comparativos

1.1 Resultados para la Línea celular BT474 (++++)

El gráfico que se observa a continuación muestra el porcentaje de células viables vs los aptámeros a una concentración final por pocillo de 1 uM. Se observa el control negativo en verde a la izquierda del gráfico y los diferentes aptámeros a continuación. De izquierda a derecha se graficó primero los aptámeros modificados en el extremo 5', luego los aptámeros modificados en el extremo 3' y por último en rojo se observa el control positivo Trastuzumab que se sabe que inhibe la proliferación celular.

El reactivo MTS metabolizado a formazan y es expulsado por las células vivas para luego medir la coloración en un lector de placas a 492 nm y cuanto más reactivo MTS sea reducido a formazan y expulsado al medio de cultivo, mayor será la coloración y habrá, por ende, mayor número de células vivas en dicho pocillo.

En forma general, cuando expusimos las células BT474 con alta expresión de HER2, se observó una disminución en la viabilidad celular en los pocillos con las células tratadas con fármacos en comparación con el control negativo (sin fármacos). Se vio una mayor capacidad citotóxica en los aptámeros modificados en el extremo 3' en comparación con los aptámeros con la modificación en el extremo 5' (ver figura 34).

Dentro del grupo de los aptámeros modificados en el extremo 3' se pudo observar una mayor capacidad citotóxica por parte del aptámero 3F21, seguido por el aptámero 3F23, 3F17 y 3F30 respectivamente (ver figura 34). El control positivo Trastuzumab presentó una mayor disminución en la viabilidad celular que el resto de las condiciones.

Los resultados mostrados corresponden a un tiempo de 24 horas de incubación con los aptámeros, luego de las cuales se agregó el reactivo MTS y se dejó incubando durante 1 hora antes de realizar las medidas.

Se realizó un análisis estadístico para confirmar que las diferencias observadas entre el control negativo y los fármacos son estadísticamente significativas en la línea BT474. Utilizando el *ordinary one-way ANOVA* en Graphpad, se observó un $F(9, 50) = 5,45$ y un $p < 0,05$.

El análisis estadístico (ver figura 35) por t student entre el control negativo y el aptámero F21 modificado en el extremo 5' mostró un $t(5,52) = 3,45$ y un $p = 0,01$. Para el aptámero F21 modificado en el extremo 3' mostró un $t(5,35) = 5,07$ y un $p = 0,003$. Por último, para el control positivo Trastuzumab indicó un $t(9,63) = 25,05$ y un $p < 0,0001$.

Los resultados observados muestran que la media del porcentaje de células viables para la línea BT474 fue mayor para el grupo Trastuzumab que para el aptámero F21

modificado en el extremo 5', para el modificado en el extremo 3' y para el grupo del control negativo. A su vez la media del porcentaje de células viables fue mayor para el aptámero F21 modificado en el extremo 3' en comparación con el aptámero F21 modificado en 5' y el control negativo.

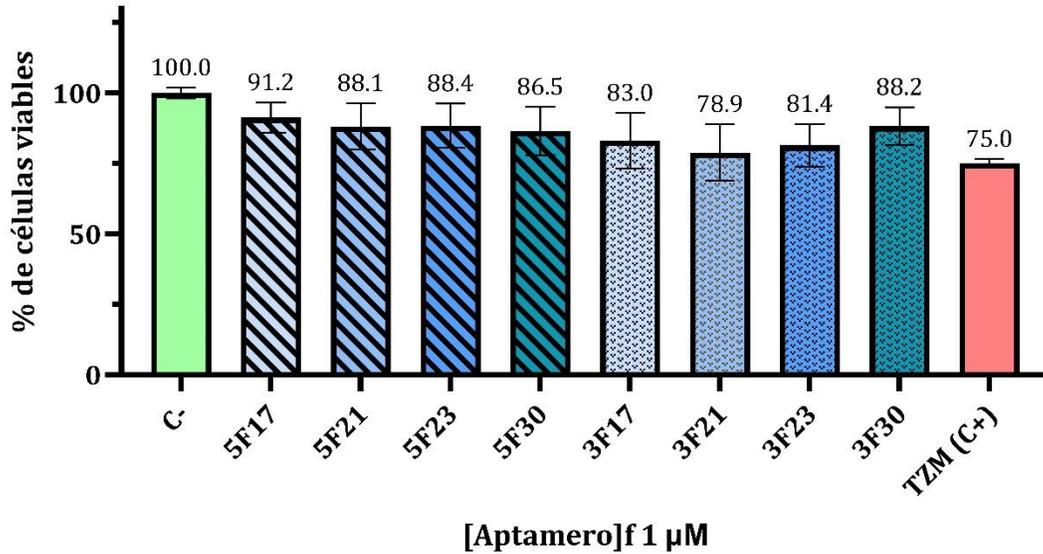


Figura 34: Citotoxicidad mediada por drogas en línea celular BT474. Gráfico de barras mostrando el % de viabilidad celular para los aptámeros modificados en extremo 5' azul de cuadrados chicos y modificados en extremo 3' barras azules de cuadrados grandes. Control negativo (sin tratar) en verde y control positivo en rojo con anticuerpo monoclonal Trastuzumab (BT474).

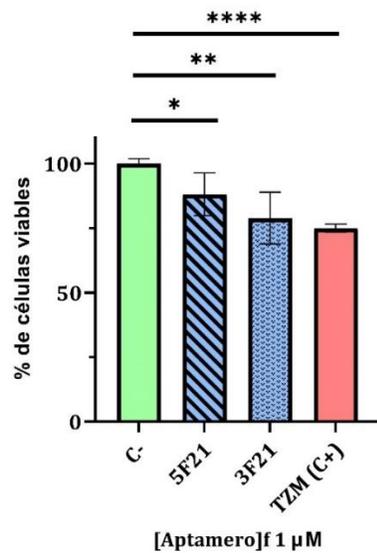


Figura 35: Media (±SD) del % de viabilidad celular para la línea BT474. Prueba t student; en verde se observa el control negativo, en azul (con rayas) el aptámero F21 modificado en el extremo 5', en azul (con puntos) aptámero F21 modificado en el extremo 3' y en rojo el trastuzumab. * diferencia significativa con un p = 0,01 con respecto al control negativo. ** diferencia significativa con un p = 0,003 con respecto al control negativo. **** diferencia significativa con un p = 0,003 con respecto al control negativo. p < 0,0001.

1.2 Resultados para la Línea celular MDA-MB-231 (+)

El gráfico que se observa en la figura 34 sigue el mismo diseño que el anterior con respecto al orden de los fármacos y los controles positivos y negativos.

Para la línea celular MDA-MB-231 que tiene baja expresión del receptor HER2, no se logró observar diferencias entre los aptámeros modificados en ninguno de los dos extremos en comparación con el control sin fármaco. Tampoco se logra observar efecto citotóxico por parte del anticuerpo monoclonal Trastuzumab (control positivo) como era de esperar (ver figura 36).

Al igual que en la BT474, los resultados mostrados corresponden a un tiempo de 24 horas de incubación con los aptámeros, luego de las cuales se agregó el reactivo MTS y se dejó incubando durante 1 hora antes de realizar las medidas.

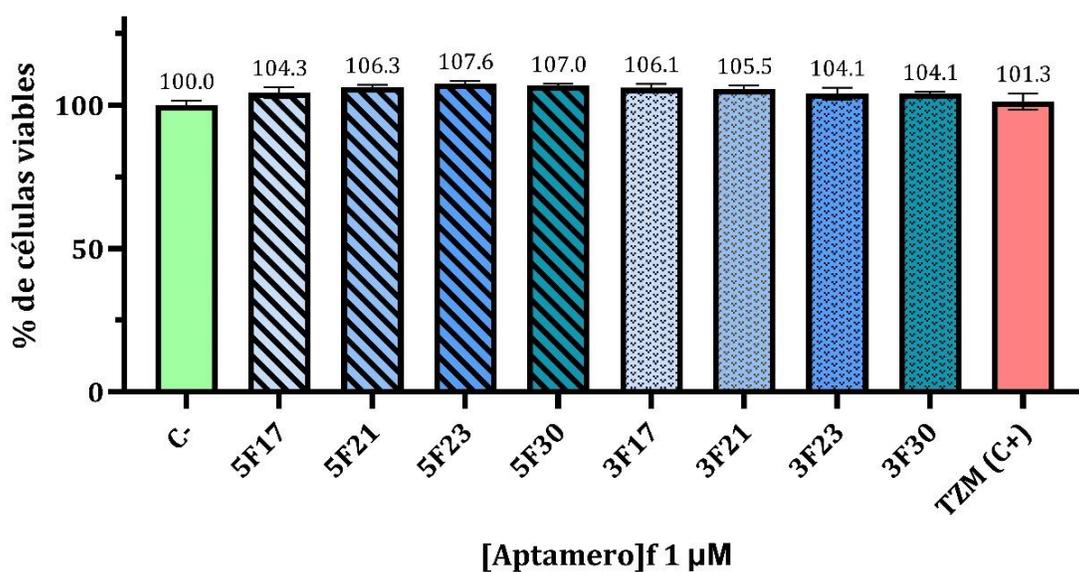


Figura 36: Citotoxicidad mediada por drogas en línea celular MDA-MD-231. Gráfico de barras mostrando el porcentaje de viabilidad celular para los aptámeros modificados en extremo 5' azul de cuadrados chicos y modificados en extremo 3' barras azules de cuadrados grandes. Control negativo (sin tratar) en verde y control positivo en rojo con anticuerpo monoclonal Trastuzumab (MDA-MB- 231).

2. Ensayos de citotoxicidad

2.1 Resultados para la Línea celular BT474 (++++)

Para los ensayos de citotoxicidad, cuya finalidad era llegar a calcular el IC₅₀, se graficó el porcentaje de células vivas en función de la concentración del aptámero F21. De derecha a izquierda se grafica primero el control negativo en verde sin tratar, luego concentraciones finales por pocillo de aptámero en orden ascendente desde 1,9 nM hasta 1259 nM, con un total de 12 concentraciones diferentes y por último a la derecha se ve el control positivo con el mAb Trastuzumab. los resultados mostrados corresponden a un tiempo de incubación de 24 horas con las diferentes concentraciones de aptámero 3F21, luego de las cuales se agregó el reactivo MTS y se dejó incubando durante 1 hora antes de realizar las medidas.

En el caso de la línea celular BT474, se logró observar que el aumento de la concentración del aptámero 3F21 no genera ningún cambio significativo en el número de células viables entre las primeras siete concentraciones (1,9 nM hasta 125 nM). Cuando la concentración aumenta a partir de 250 nM hasta 1250 nM se comienza a observar una disminución en la viabilidad celular (ver figura 37).

El mAb utilizado como control positivo, en concentraciones equivalentes a la penúltima concentración más alta de aptámero probado, muestra una mayor capacidad citotóxica que el resto de las condiciones, incluso mayor a la concentración más alta de 1250 nM.

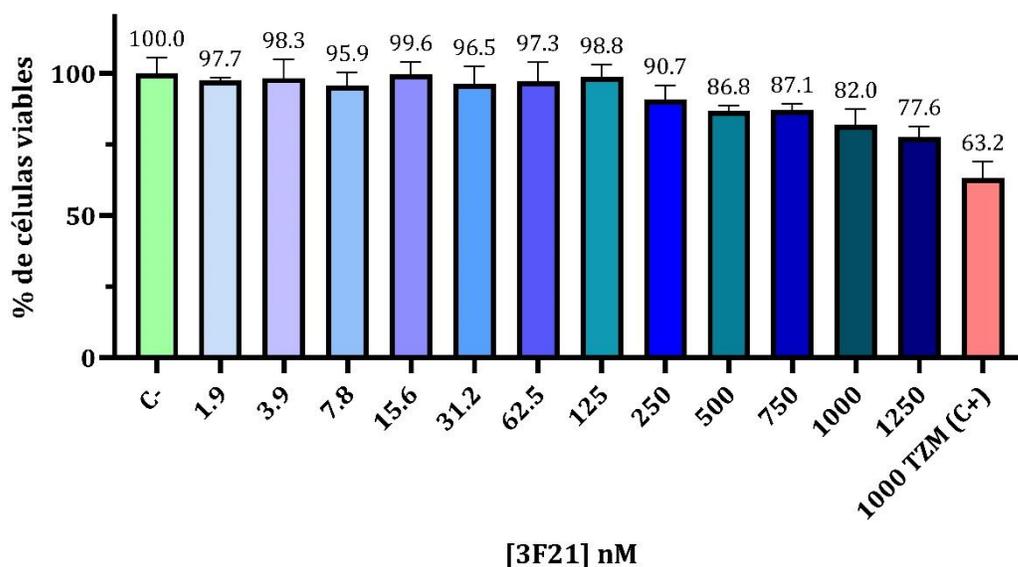


Figura 37: Citotoxicidad mediada por drogas en línea celular BT474. Gráfico de barras mostrando el porcentaje de viabilidad celular para el aptámero modificado en extremo 3' F21 representado como gradiente de celesta a azul oscuro para concentraciones más bajas a más altas respectivamente. Control negativo (sin tratar) en verde y control positivo en rojo con anticuerpo monoclonal Trastuzumab. (BT474).

2.2 Resultados para la Línea celular MDA-MB-231 (+)

En la figura 34 se observa el mismo diseño de gráfico que para el ensayo de citotoxicidad mencionado en la figura 33. A diferencia de lo mencionado anteriormente, y coincidiendo con los ensayos comparativos entre los diferentes aptámeros, no se observa respuesta ni a altas ni a bajas concentraciones en la línea celular MDA-MB-231 por parte del aptámero 3F21 (ver figura 38). El control positivo (Trastuzumab) tampoco presenta diferencias con el control negativo, como se esperaba por ser una línea celular con baja expresión del receptor HER2. Al igual que en la línea celular BT474 los resultados mostrados corresponden a un tiempo de incubación de 24 horas con las diferentes concentraciones de aptámeros 3F21, luego de las cuales se agregó el reactivo MTS y se dejó incubando durante 1 hora antes de realizar las medidas.

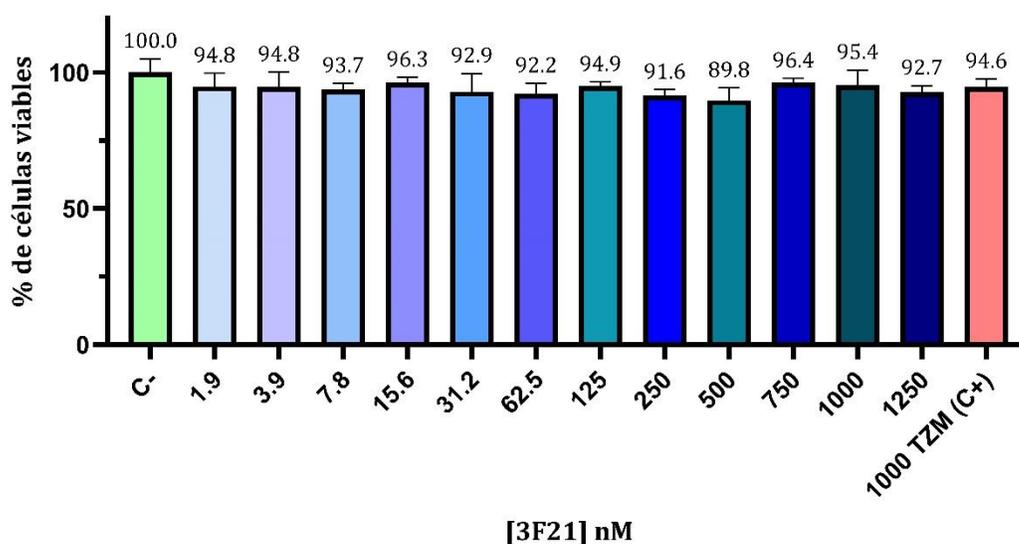


Figura 38: Citotoxicidad mediada por drogas en línea celular MDA-MB-231. Gráfico de barras mostrando el % de viabilidad celular para el aptámero modificado en extremo 3' F21 representado como gradiente de celesta a azul oscuro para concentraciones más bajas a más altas respectivamente. Control negativo (sin tratar) en verde y control positivo en rojo con anticuerpo monoclonal Trastuzumab. (MDA MB 231).

3. Resonancia de plasmon superficial

En una primera instancia en el ensayo de SPR, se verificó la unión del mAb Trastuzumab por el receptor HER2 (curva en verde) unido a STII donde se logró observar una respuesta de unión por parte del anticuerpo (ver figura 39).

Eventualmente se realizó el mismo ensayo para los aptámeros modificados en el extremo 3' y los modificados en el extremo 5' pero no se logró observar señal de unión al conjugado.

Luego se realizaron ensayos de unión por SPR, pero utilizando los 4 aptámeros sin modificar en los extremos, que corresponden a las señales de apariencia basal en escala de grises) (ver figura 39). Dichos aptámeros fueron utilizados previamente para calcular la constante de disociación mediante el ensayo de MST en la universidad de Missouri, donde fue posible calcular la Kd.

A pesar de los resultados obtenidos mediante la técnica MST, por el ensayo de SPR realizado en el IP de Montevideo no se logró observar afinidad por los aptámeros al receptor HER2. En el caso el aptámero HB5, previamente reportado por otros equipos de investigación, que ha sido analizado y su Kd ha sido determinada, no mostro respuesta al igual que ninguno de los aptámeros de nuestro equipo. Este aptámero fue utilizado como un segundo control positivo, al igual que el Trastuzumab (ver figura 39). En resumen, solo se pudo ver respuesta de unión entre proteína-proteína (HER2-Trastuzumab) y no proteína-ácido nucleico (HER2-Aptámero).

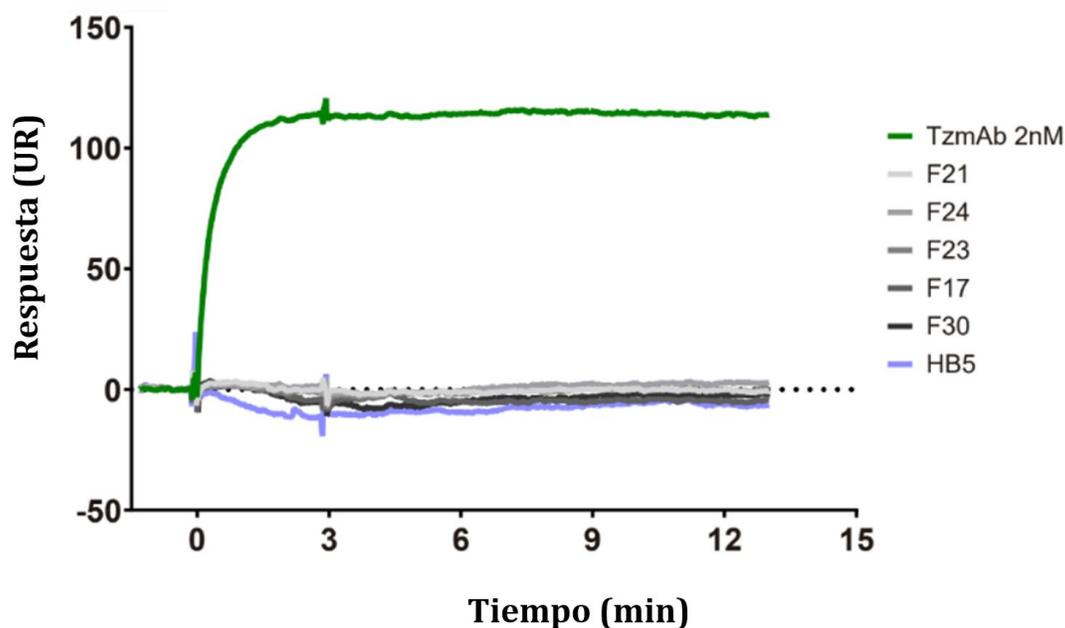


Figura 39: Resonancia de plasmon superficial (SPR). Gráfico de unidades de resonancia o respuesta versus tiempo en minutos para la unión del anticuerpo Trastuzumab en verde. En gradiente de grises se ven los cuatro aptámeros utilizados incluyendo un aptámero de prueba F24 y un control positivo en celeste de un aptámero reportado por otro equipo de investigación llamado HB5.

4. Predicción estructural y modelado molecular

4.1 Predicciones de la estructura secundaria 2D

Luego de analizar las posibles estructuras secundarias utilizando las tres alternativas descritas en la metodología, se optó por utilizar el mfold, que, de todos los servidores probados, parece brindar estructuras secundarias más coherentes, tanto en relación con las formas de plegamiento, como en relación con las energías libres brindadas y la cantidad de variantes disponibles que permite tener en cuenta. Con el mismo, se obtuvieron entre 3 a 8 predicciones de apareamientos diferentes para cada aptámero. Las cuatro propuestas que presentaron una menor energía libre (ΔG) para cada aptámero están reportadas en la Figura 40 con sus respectivos ΔG . También se destaca un número variable de motivos estructurales en cada una de las estructuras como se muestra en la tabla 9.

La predicción que se obtuvo con menor ΔG , es la del aptámero F30 de -8.64 kJ/mol, seguida por el aptámero F17 de -8.50 kJ/mol, el aptámero F23 -8.42 kJ/mol y por último el aptámero F21 con un ΔG de -6.22 kJ/mol.

Una vez obtenidas todas las posibles representaciones de los cuatro aptámeros para evaluar y comparar dichas predicciones se observó que el que tenía una variedad más estables de conformaciones era el aptámero F21. A pesar de que la estructura con la menor energía libre es la representada (ver figura 40) para estudios posteriores no se utilizó la estructura secundaria de menor ΔG ya que esta presenta un motivo estructural de tipo unión (*junction*) muy largo, que no es estructuralmente favorable y por eso se decidió utilizar la tercer predicción obtenida para el aptámero F21 (Figura 41), denominada a partir de ahora como F21c, para proseguir con el análisis de la conformación tridimensional. La misma mostró contener, 2 hairpins, 3 loops internos y una junction. Se muestra la estructura 2D junto a su correspondiente código VIENNA en la figura 41.

No se estudiaron todas las conformaciones posibles para todos los aptámeros de interés por un tema de costo computacional y los límites en tiempo de dedicación que imponen la realización de una tesina de grado, además se estudió el aptámero que experimentalmente había mostrado una menor K_d como se menciona en los antecedentes experimentales.

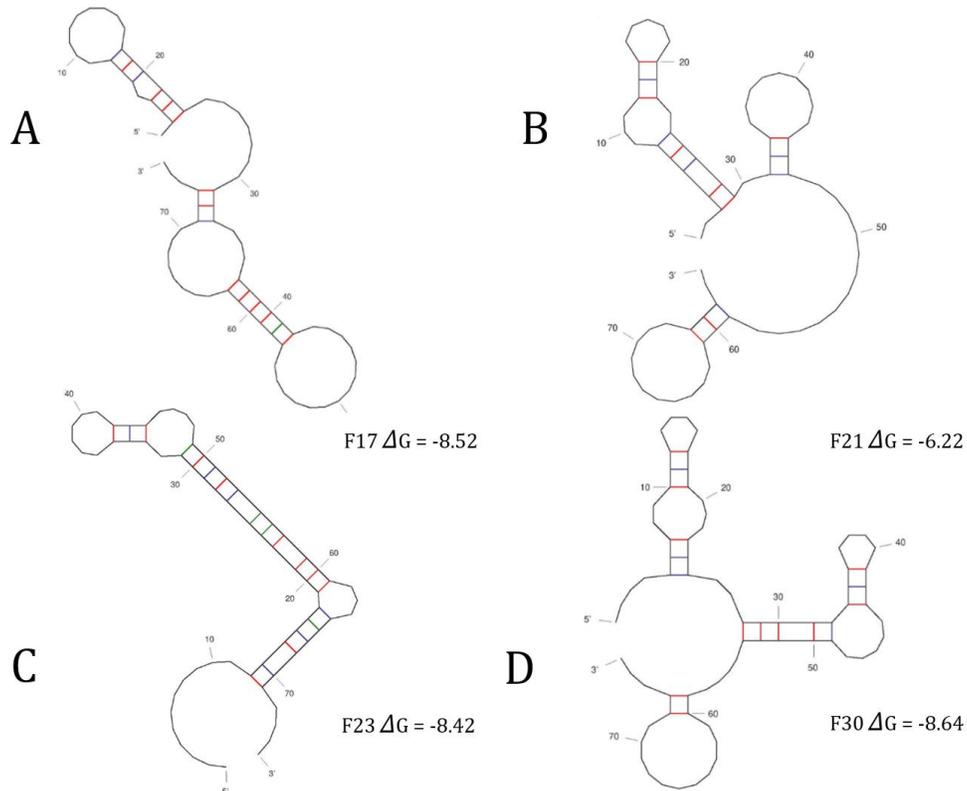
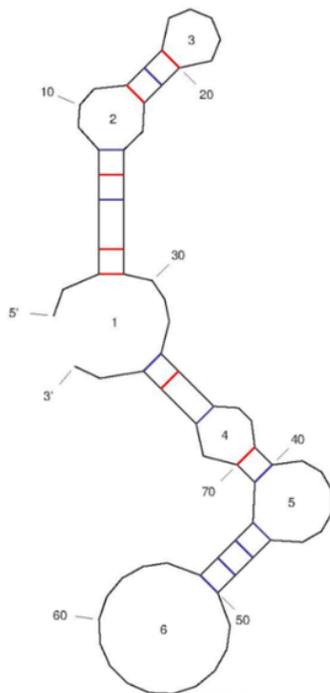


Figura 40: Estructuras secundarias con menor ΔG para cada aptámero. Primeras estructuras secundarias obtenidas utilizando mfold para el aptámero F17 (A), F21 (B), F23 (C) y F30 (D). Se pueden ver los motivos estructurales mencionados en la tabla 9 así como el valor de energía libre ΔG de cada uno de los aptámeros en la esquina inferior derecha de cada estructura.

Tabla 9: Motivos estructurales en las predicciones 2D. Motivos estructurales encontrados en los cuatro aptámeros estudiados. Se contabiliza el número de horquillas, tallos, bucles, uniones, protuberancias y extremos colgantes.

Aptámero	Nº Horquillas	Nº Tallos	Nº Bucles	Nº Uniones	Nº Protuberancias	Nº Extremos colgantes
F17	2	3	1	2	1	2
F21	3	4	1	2	1	2
F23	1	3	2	3	1	2
F30	3	5	2	2	0	2



F21c: $dG = -5.47$

..(((.....(((.....)))))).....(((.....(((.....)))))).....

Figura 41: estructura secundaria del aptámero F21. Tercer estructura obtenida con menor ΔG para el aptámero F21, con 6 loops y sus bases apareadas. Observar la diferencia entre la estructura con menor ΔG del aptámero F21 en la ilustración 31. Las estructuras más estables no son únicamente las de menor ΔG , sino aquellas que presentes patrones de apareamientos coherentes. Grandes tramos de bases sin aparear muestran estructuras simple hebra que fluctúan en el espacio y no son termodinámicamente estables cuando se piensa en la conformación final.

4.2 Predicciones estructurales 3D del aptámero F21

Una vez pasada la etapa de evaluación de estructuras secundarias se utilizó como se menciona en métodos dos predictores de estructuras terciarias, el RNAcomposer y el 3D RNA Xiao Lab. Luego de introducir la secuencia nucleotídica del aptámero F21 y el formato VIENNA, se obtuvieron cinco posibles estructuras tridimensionales usando cada uno de los algoritmos.

El primer paso fue comparar las estructuras brindadas. Se optó por utilizar las estructuras obtenidas mediante RNAcomposer luego de ver que las estructuras obtenidas por 3D RNA Xiao Lab presentaban irregularidades y formas de plegamiento poco favorables para los aptámeros en solución (grandes regiones desapareadas).

A continuación, se muestran de las cinco estructuras posibles obtenidas por RNAcomposer, la segunda, tercera y cuarta en la figura 42, las otras dos estructuras (primera y quinta estructuras) también presentaban irregularidades y motivos que, como en el otro servidor utilizado, no parecían razonables y por eso fueron descartadas

(grandes zonas de ADN simple hebra desapareadas, o *loops* enormes). El orden de las estructuras está relacionado con un puntaje interno del algoritmo, dónde se supone que las primeras predicciones son “más confiables” que las subsiguientes. En definitiva, nos quedamos con dos estructuras A y C, que tienen una conformación más lineal, y la estructura B dónde se ve un claro quiebre en la estructura. Posteriormente se identificó, marcando con colores, los dos motivos comunes presentes analizados previamente por alineamiento de secuencias en MEME.

En el motivo consenso simbolizado en rojo se obtiene mayormente ADN simple cadena desapareado. En el motivo consenso en azul en todos los casos se puede observar claramente una base nitrogenada que queda expuesta hacia fuera del aptámero y en dos de los tres casos un motivo de *hairpin* común. Una vez evaluadas las tres posibles estructuras candidatas a ser sometidas a dinámica molecular se optó por utilizar la segunda estructura (B). Se eligió la estructura más plegada para optimizar la cantidad de moléculas de agua en la simulación de dinámica molecular. Al usar cajas octogonales, las estructuras lineales ocupan mucha agua que es lo más costoso de una simulación de dinámica molecular.

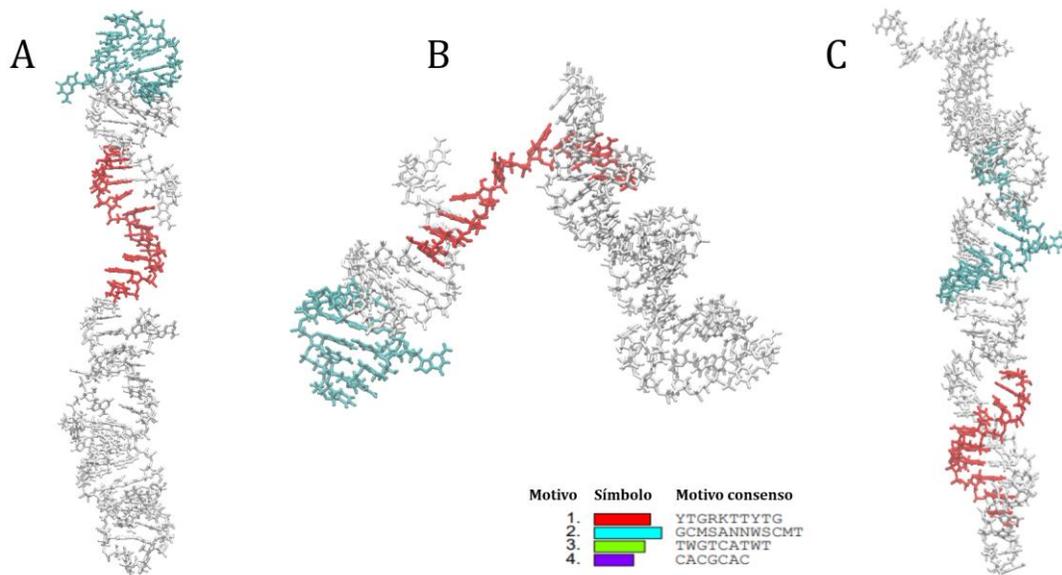


Figura 42: Estructuras tridimensionales posibles para el aptámero F21c. Segunda estructura tridimensional obtenida (A). Tercer estructura obtenida tridimensional (B). Cuarta estructura obtenida (C). Debajo de las predicciones se muestran los motivos consenso de los 4 aptámeros estudiados.

4.3 Dinámica molecular del aptámero F21

Luego de la minimización, termalización y equilibración durante 10 ns, se simularon 500 ns de dinámica que se denomina de producción. Una medida de la convergencia de la estructura se puede obtener midiendo el desvío cuadrático medio de los átomos a lo largo del tiempo. Si la simulación está en equilibrio, la fluctuación de los átomos debería ser más o menos constante alrededor de un determinado valor medio.

Durante los primeros 50 ns de simulación, la estructura se apartó más de 10 Å de la estructura del RNAComposer para luego estabilizarse en los primeros 100 ns (estos datos no se muestran). De todos modos, descartamos los primeros 200 ns y solo se analizaron los 300 ns finales (ver figura 43). En la etapa que consideramos convergida, el RMSD medio fue de $5.2 \text{ \AA} \pm 1.2$, un valor bajo si se considera que tenemos 77 residuos.

Capturamos tres instantes de la dinámica donde se muestra el movimiento de *bending* de los extremos del aptámero. También podemos ver que el quiebre que existía en la estructura de RNAComposer (figura 42 B), ya no está presente. Esa parte se ha linealizado como mostraban las estructuras A y C del RNAComposer. Sin embargo, las estructuras obtenidas durante la dinámica luego de convergencia muestran un quiebre en “t” (“t” en analogía a los ARN de transferencia), o dos quiebres formando una “U”, que no habían sido predichos por RNAComposer.

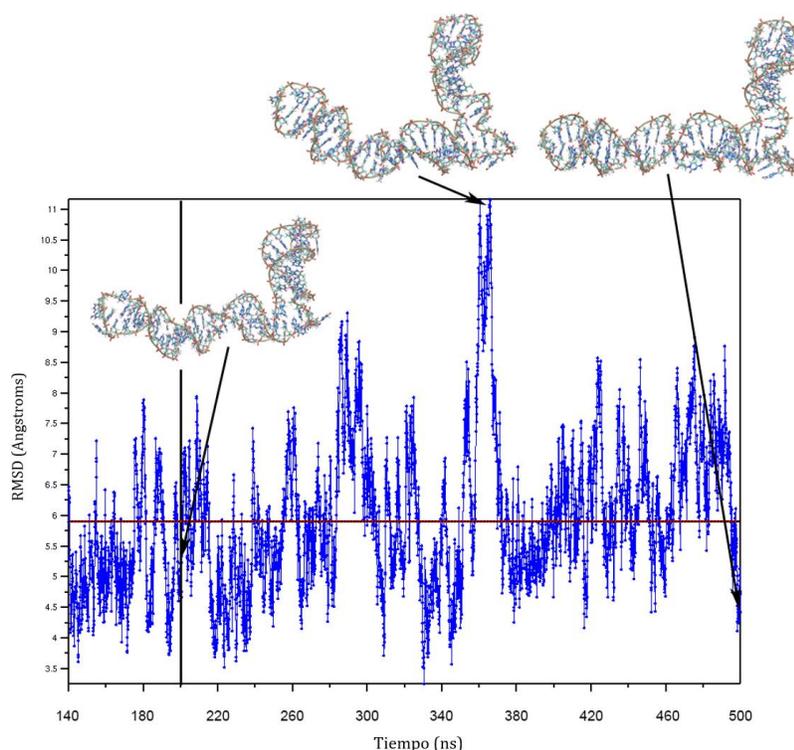


Figura 43: RMSD promedio durante los últimos 300 ns de 500 ns totales. Se muestra el desvío cuadrático medio de los átomos respecto al promedio de la simulación luego de equilibrar. Los primeros 200 ns se consideraron de equilibración y no se tomaron en cuenta. El promedio de $5.2 \text{ \AA} \pm 1.2$ (línea roja) se obtuvo de la línea negra vertical en adelante. Antes de la equilibración el RMSD se apartó 10 Å de la estructura inicial (RNAComposer). Se ilustran 3 sub-estados que aparecen durante la simulación.

Ese movimiento de *bending* de los extremos uno hacia el otro se hace evidente al mirar la dinámica esencial (ver figura 44). La dinámica esencial no es otra cosa que un análisis de Componentes Principales (PCA) aplicado a las coordenadas x,y,z a lo largo del tiempo. Mientras que el primer modo esencial (colección de átomos que tienen un movimiento común durante la dinámica) es un movimiento de reorganización de los *loops* internos, los modos 2 y 3 son modos de *bending*.

Estos 3 modos esenciales o componentes principales juntos (que son ortogonales entre sí) representan el 59 % de todo el movimiento que tiene el aptámero durante la simulación.

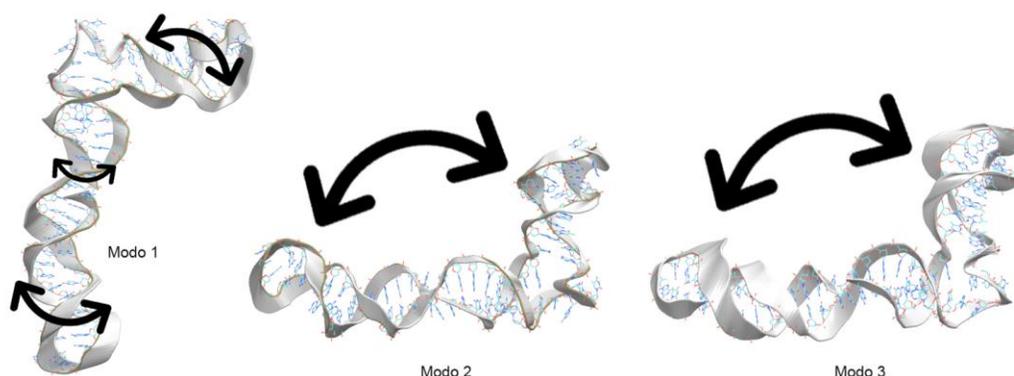


Figura 44: Tres primeros modos de la dinámica esencial. Se muestra 3 estructuras que se corresponden con los 3 primeros modos. El grosor del backbone (cinta blanca) es representativa de cuanto se mueve esa región. Cuánto más anchas las cintas, más móvil es esa colección de átomos en ese modo en particular. Para facilitar la comprensión, se añadieron flechas negras que intentan explicar cómo se da el movimiento colectivo en cada modo. Entre los tres, estos modos representan el 59% del movimiento total del aptámero durante la simulación.

Si bien lo ideal es llevar a cabo varias réplicas de la simulación, o mejor aún hacer simulaciones de muestreo avanzado a diferentes temperaturas para capturar todos los sub-estados conformacionales estables, en los tiempos de una tesina, elegimos la última estructura de la simulación como representativa del conjunto de estructuras después de equilibración. La estructura en cuestión (ver figura 45), siendo ADN, muestra gran similitud con un ARN de transferencia con un quiebre en forma de “t”. Los dos extremos desapareados forman enlaces intermoleculares dando lugar a una doble hebra casi canónica, donde es difícil discernir las puntas de la secuencia. Esa estructura fue usada en los experimentos de *docking* que se presentan más adelante.

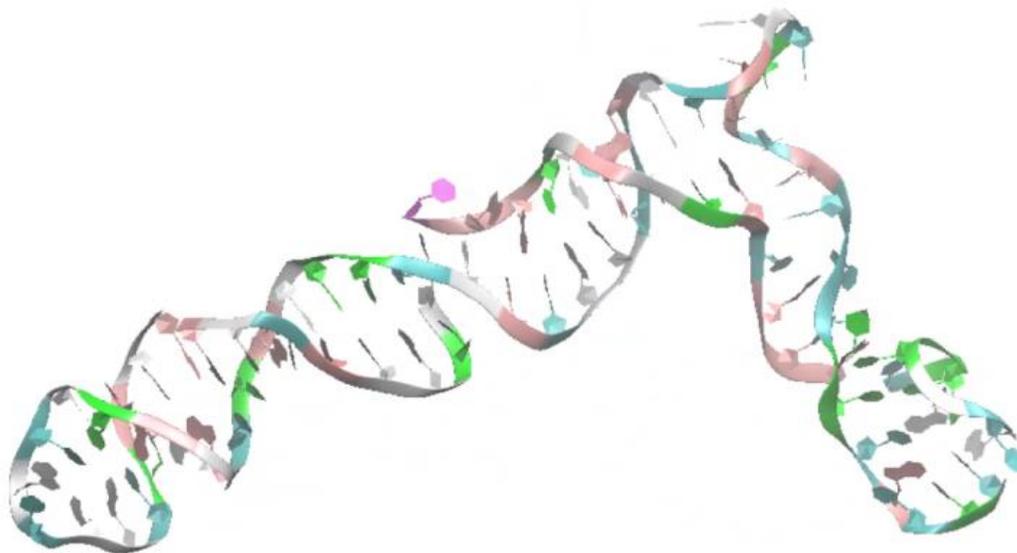


Figura 45: estructura final obtenida luego de la última dinámica molecular realizada para el aptámero F21. Las cuatro bases nitrogenadas se ven coloreadas de diferente forma para mejorar la visualización de los cada nucleótido y sus interacciones. También se observan de diferentes colores la última base de los extremos 5' y 3' de oligonucleótido.

4.4 Evaluación de las estructuras de HER2 en el PDB:

Usando las palabras claves explicitadas en los materiales y métodos, se obtuvieron 26 estructuras del receptor HER2. La mayoría determinadas por rayos-X y otras por cryo-EM. Las estructuras obtenidas en formato PDB fueron post procesadas para dejar solo el receptor HER2 de interés (muchas estructuras en el PDB incluían otras moléculas unidas a HER2 que fueron eliminadas). Las estructuras relevadas, junto a información clave sobre su obtención, se muestran en la tabla 10. Esto es, de izquierda a derecha, el número de residuos aminoacídicos de las estructuras de HER2, el método experimental de obtención Cryo-EM o difracción de rayos X (X-RAY Dif), la resolución de las estructuras en Armstrong y por último el organismo del que provienen y el sistema de expresión. Además, se agregó a la tabla el código de búsqueda (PDB id) de cada estructura en la segunda columna, así como el enlace DOI en la última para facilitar la localización de los archivos en la base de datos del PDB. En la columna “imagen original” se hace referencia a la o las moléculas que se encontraban unido el receptor HER2 antes de ser eliminadas de los PDB. Se observa que hay varios ligandos estudiados para HER2 como mAbs, péptidos, compuestos orgánicos pequeños, homodimerizaciones del receptor HER2 y dimerizaciones con otros miembros de la familia EGFR, entre otros.

Con respecto al largo de las estructuras se puede observar que hay grandes diferencias entre el número de residuos aminoacídicos de la estructura con menor número de

residuos y la de mayor, siendo estos 510 la estructura 2A91 (N° 11 en tabla 10) y 644 la estructura 8FFJ (N° 5), es decir un total de 134 residuos aminoacídicos de diferencia.

También se observan diferencias en el límite de resolución siendo la estructura con menor resolución de 7.50 Å la estructura 8FFJ (N° 5 en tabla 10) y la de mayor resolución de 2.25 Å la estructura 5MY6 (N° 15).

Tabla 10: análisis de estructuras disponibles en la base de datos Protein Data Bank para el receptor HER2. Se muestra el código de la estructura en la primer columna, seguido por el número de residuos aminoacídicos de la estructura COLUMNA 2, el método de obtención por Microscopia electrónica criogénica (Cryo-EM) o difracción de rayos X (X-RAY Dif) COLUMNA 3, resolución de la imagen en Armstrong (Å) COLUMNA 4, organismos de origen COLUMNA 5, sistema de expresión COLUMNA 6, imagen original (receptor HER2 unido a las estructuras nombradas columna) COLUMNA 7 y link de cita de cada estructura DOI COLUMNA 8.

	CODIGO	N° de Residuos	Metodo	Resolucion (Å)	Organismo	Sistema de expresion	Imagen original	DOI
1	7MN5	629	Cryo-EM	2.93	H. Sapiens	E. Coli	HER2/HER3/NRG1b	https://doi.org/10.2210/pdb7MN5/pdb
2	7MN6	629	Cryo-EM	3.09	H. Sapiens	E. Coli	HER2 S310F/HER3/NRG1b	https://doi.org/10.2210/pdb7MN6/pdb
3	6OGE	644	Cryo-EM	4.36	H. Sapiens, C. Griseus		HER2/Trastuzumab/Pertuzumab	https://doi.org/10.2210/pdb6OGE/pdb
4	7MN8	629	Cryo-EM	3.45	H. Sapiens	E. Coli	HER2/HER3/NRG1b/Trastuzumab	https://doi.org/10.2210/pdb7MN8/pdb
5	8FFJ	644	Cryo-EM	7.50	H. Sapiens, C. Griseus		HER2/Zanidatamab	https://doi.org/10.2210/pdb8FFJ/pdb
6	8HGO	599	Cryo-EM	3.31	H. Sapiens	E. Coli	HER2/EGFR	https://doi.org/10.2210/pdb8HGO/pdb
7	8HGP	599	Cryo-EM	4.53	H. Sapiens	E. Coli	HER2/EGFR	https://doi.org/10.2210/pdb8HGP/pdb
8	8Q6J	624	Cryo-EM	3.30	C. Griseus, H. Sapiens		HER2/Trastuzumab/Pertuzumab	https://doi.org/10.2210/pdb8Q6J/pdb
9	6BGT	607	X-RAY Dif	2.70	H. Sapiens		HER2/Trastuzumab Fab mutante	https://doi.org/10.2210/pdb6BGT/pdb
10	3WLW	564	X-RAY Dif	3.09	H. Sapiens	C. Griseus	ErbB2 homodimero dominio extracelular	https://doi.org/10.2210/pdb3WLW/pdb
11	2A91	510	X-RAY Dif	2.50	C. Griseus, H. Sapiens		ErbB2 dom 1-3	https://doi.org/10.2210/pdb2A91/pdb
12	N18Y	608	X-RAY Dif	2.40	R. Norvegicus	C. Griseus	HER2 Rata	https://doi.org/10.2210/pdb1N8Y/pdb
13	N18Z	607	X-RAY Dif	2.52	H. Sapiens, M. Musculus	C. Griseus	HER2/Fab	https://doi.org/10.2210/pdb1N8Z/pdb
14	3WSQ	564	X-RAY Dif	3.50	H. Sapiens	C. Griseus	HER2/Fab	https://doi.org/10.2210/pdb3WSQ/pdb
15	5MY6	597	X-RAY Dif	2.25	H. Sapiens, C. Dromedarius	H. Sapiens, E. Coli	HER2/Nb	https://doi.org/10.2210/pdb5MY6/pdb
16	6J7I	639	X-RAY Dif	2.92	H. Sapiens	C. Griseus	HER2/HuA21/SCIV	https://doi.org/10.2210/pdb6J7I/pdb
17	3MZW	578	X-RAY Dif	2.90	H. Sapiens, S Aureus	C. Griseus	HER2/Affibody	https://doi.org/10.2210/pdb3MZW/pdb
18	5O4G	542	X-RAY Dif	3.00	H. Sapiens	H. Sapiens	HER2/Fabmf3958	https://doi.org/10.2210/pdb5O4G/pdb
19	6ATT	575	X-RAY Dif	3.77	H. Sapiens	H. Sapiens exp vector pBGSA	HER2/Fab	https://doi.org/10.2210/pdb6ATT/pdb
20	7QVK	519	X-RAY Dif	3.10	H. Sapiens, C. Griseus	H. Sapiens, C. Griseus	HER2/NNM-02	https://doi.org/10.2210/pdb7QVK/pdb
21	5K33	576	X-RAY Dif	3.30	H. Sapiens	H. Sapiens, C. Griseus	HER2/FxabSTAB19	https://doi.org/10.2210/pdb5K33/pdb
22	5KWG	575	X-RAY Dif	4.30	H. Sapiens	C. Griseus, H. Sapiens	HER2/FH10-03-6	https://doi.org/10.2210/pdb5KWG/pdb
23	3N85	620	X-RAY Dif	3.20	H. Sapiens	C. Griseus, E. Coli	HER2/Trimer/Ab	https://doi.org/10.2210/pdb3N85/pdb
24	3BE1	607	X-RAY Dif	2.90	H. Sapiens	C. Griseus, E. Coli	HER2/bH1Fab	https://doi.org/10.2210/pdb3BE1/pdb
25	1S78	564	X-RAY Dif	3.25	H. Sapiens, M. Musculus	C. Griseus, E. Coli	HER2/Pertuzumab	https://doi.org/10.2210/pdb1S78/pdb
26	6BGT	607	X-RAY Dif	2.70	H. Sapiens	H. Sapiens	HER2/TrastuzumabFab	https://doi.org/10.2210/pdb6BGT/pdb

Posteriormente, usando Pymol, se llevó a cabo un alineamiento 3D de las 26 estructuras (figura 46 A). Una vez alineadas las 26 secuencias se observa que a pesar de las diferencias reportadas en la tabla 10, las estructuras comparten la estructura secundaria y los subdominios del receptor HER2 prácticamente incambiables en el espacio. Esto podría no haber sido el caso, dado la diversidad de métodos, condiciones y complejos diferentes analizados. La conservación de la estructura, indica que una sola estructura podría actuar como representante del conjunto. Para poder elegirla (y luego usarla en el *docking*), nos quedamos primero con las 4 que mostraban más cantidad de aminoácidos, sin cortes en la cadena principal y con mejor resolución.

Estas cuatro estructuras (ver figura 46 B) corresponden a los códigos 7MN5, 6OGE, 8FFJ y 6J71 (1, 3, 5 y 16 en la tabla 10).

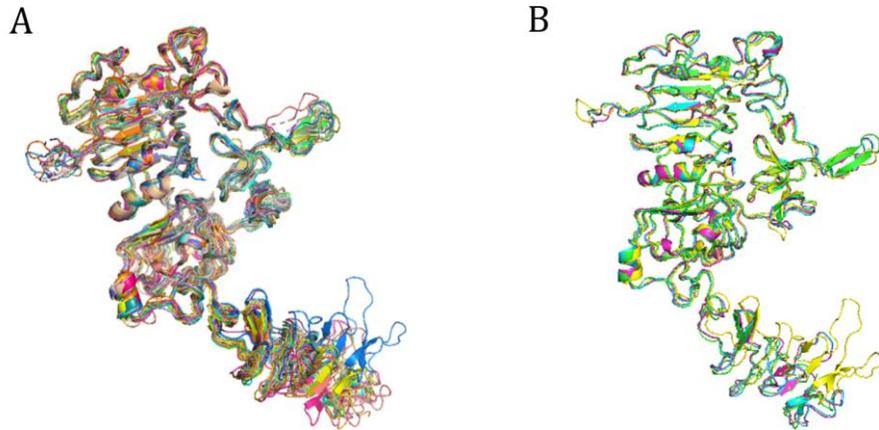


Figura 46: alineamiento de estructuras HER2 en Paymol. Superposición de las 26 estructuras 3D limpias del receptor HER2 (A), cada estructura está representada por un color distinto y superposición de las 4 estructuras de HER2 seleccionadas luego de la primer superposición (B). Las estructuras, en este caso más visibles que en la superposición A, están coloreadas de un solo color para poder distinguir patrones y diferencias en los solapamientos de las estructuras.

De las 4 estructuras preseleccionadas, la 6J71 mostró tener la cadena más larga íntegra (estructura 16 de la tabla 10) y fue elegida finalmente como representante del conjunto para los experimentos de *docking* (figura 47).

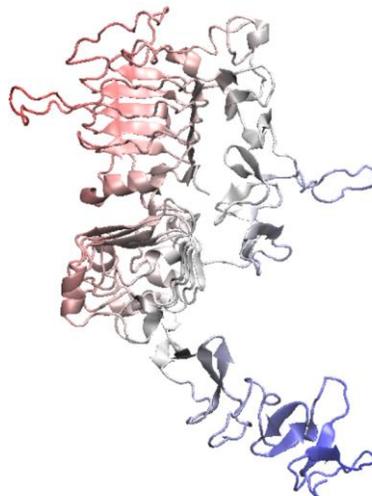


Figura 47: 6J71, estructura HER2 final. Se definen los extremos carboxilo y amino en rojo y azul respectivamente atravesando un degrade hacia el blanco para mejorar la visualización de la integridad de la cadena principal de la proteína.

4.5 Docking molecular F21C-HER2

Del docking rígido realizado con HDOCK, se obtuvo un total de 100 posibles complejos entre el aptámero F21 y el receptor HER2. En este caso nuevamente, las primeras estructuras predichas de la unión F21-HER2 son según el puntaje interno del programa mejores. Se tomaron como referencia las tres primeras para analizar en mayor profundidad.

Las tres poses se ilustran en la figura 48. En el primer complejo representado con el aptámero en amarillo (A), se logra observar dos zonas de contacto, la primera es entre uno de los extremos del aptámero plegado con el subdominio I del receptor HER2 (imagen del medio) y la segunda se ve entre el otro extremo del aptámero y el subdominio IV del receptor HER2 (imagen de la derecha). En la imagen de la izquierda (figura 48) donde se observa el complejo entero, se observa que la zona de quiebre queda prácticamente excluida de la interacción.

El segundo complejo representado en verde (B) muestra un tipo de interacción entre ambas moléculas diferente. Se observan zonas de contacto entre la región de quiebre del aptámero y los subdominios II, III y IV, en particular en la hendidura que forman los 3 subdominios.

Por último, en el tercer complejo con el aptámero representado en rojo (C) se observan zonas de interacción entre el aptámero desde uno de los extremos del plegamiento hasta el comienzo del quiebre de dicha estructura y los subdominios I, III y IV del receptor HER2, dejando el otro extremo del aptámero sin contacto.

El *docking score* que representa que tan fiable es la interacción entre las moléculas fueron de -279.78 para el primer complejo, -275.66 para el segundo complejo y -271.76 para el tercero.

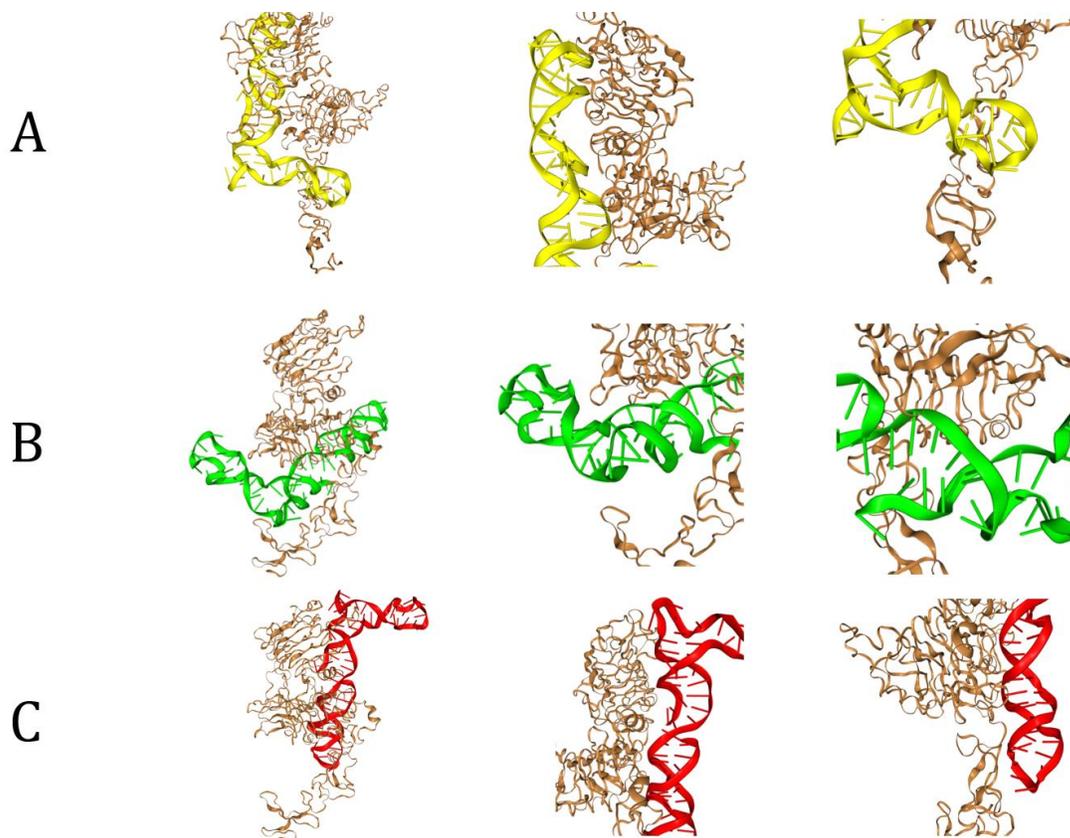


Figura 48: Docking HER2-Aptámero F21. Primer docking más probable para el receptor HER2 (fila A) y el aptámero F21. Segundo docking más probable para el receptor HER2 y el aptámero F21 (fila B). Tercer docking más probable para el receptor HER2 y el aptámero F21 (fila C). En las columnas se muestra el complejo en su conjunto y dos ampliaciones a las zonas de contacto entre F21 y HER2.

Una vez observadas de forma global las interacciones entre ambas estructuras a nivel molecular se determinaron cuáles fueron las interacciones a nivel atómico. Estas pueden ser específicas entre grupos funcionales definidos de las bases (ver figura 49 A), interacciones inespecíficas que corresponden a las interacciones mayormente electrostáticas con el esqueleto azúcar-fosfato del aptámero (ver figura 49 B), e interacciones de tipo “artefectos” generados por el predictor, que, en busca de las mejores poses, genera regiones dónde las interacciones no son físicamente posibles (ver figura 49 C).

En el primer complejo se logró observar una sola interacción específica de 2.89 Å entre el nitrógeno 7 de la adenina 26 con el oxígeno del hidroxilo del grupo R de la treonina 75 de HER2 (figura 49 A). Con respecto al complejo molecular mostrado en (B) en la figura 47, se encontró también una interacción específica entre el nitrógeno 7 de la adenina 72 y el hidroxilo de la glutamina 404 con una distancia de 2.80 Å. Para el complejo C se observaron 5 interacciones específicas entre la el oxígeno y el nitrógeno de la glutamina 51 con el oxígeno 6 y el nitrógeno 7 de la guanina 31 respectivamente a una distancia de 2.96 y 3.67 Å, entre el oxígeno de la glutamina 75 y el nitrógeno 6 de la adenina 76 a una

distancia de 2.63 Å, entre el oxígeno de la glutamina 207 y el nitrógeno 2 de la guanina 42 a una distancia de 2.88 Å y entre el nitrógeno de la histidina 193 y el nitrógeno 3 de la guanina 42 a una distancia de 2.56 Å. También se contabilizaron y observaron las interacciones inespecíficas y artefactos generados por el servidor que se detallan en la tabla 11.

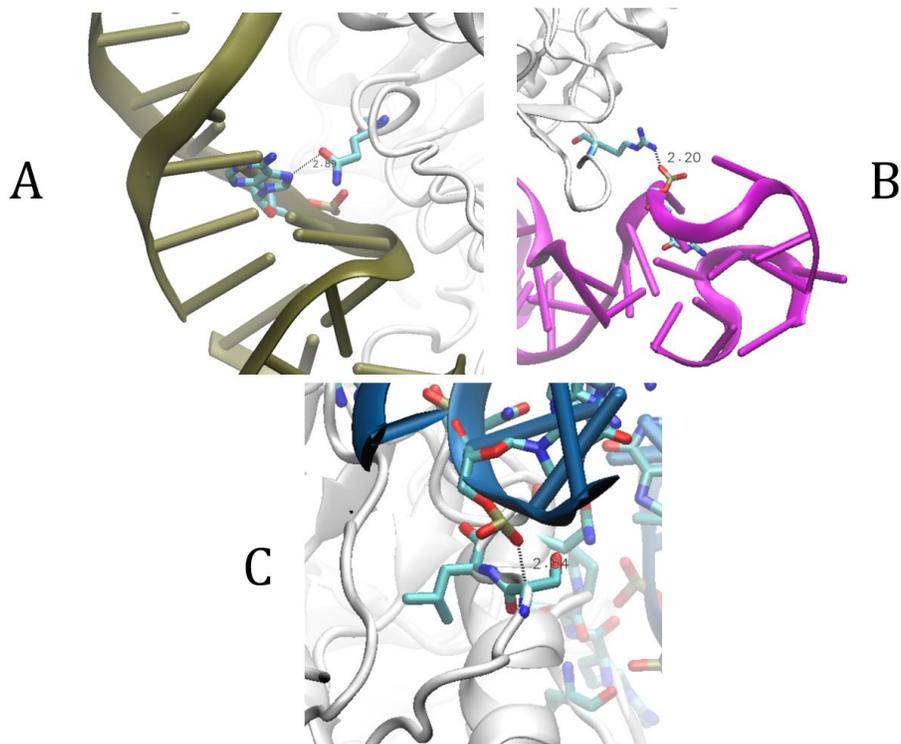


Figura 49: Interacciones específica, inespecíficas y artefactos encontrados en los primeros 3 complejos estudiados del docking entre el aptámero y el receptor HER2. Se observa la única interacción específica (A) del primer complejo, una de las 9 interacciones inespecíficas (B) del segundo complejo y uno de los 3 artefactos (C) en el tercer complejo.

Docking	Interacciones específicas	Interacciones inespecíficas	Artefactos de docking
Primer complejo	1	11	1
Segundo complejo	1	9	1
Tercer complejo	5	7	3

Tabla 11: Interacciones atómicas del docking rígido entre HER2 y el aptámero F21 en HDOCK. Especificación del número de interacciones específicas, interacciones inespecíficas y artefactos generados por el algoritmo de HDOCK.

Existen otros servidores para predecir la unión entre moléculas, y sin duda debería probarse hacer *docking* flexible para mejorar los resultados. Pero cuando se estaba terminando de escribir esta tesis, el servidor de Deep Mind de Google llamado AlphaFold 3 se publicó en Nature (Abramson, J et al 2024) prometiendo que ahora la IA puede predecir con exactitud la estructura de las proteínas unidas a ADN y ARN. La predicción se hace en minutos en el servidor: <https://alphafoldserver.com/about>.

Cómo puede observarse en la figura 50, la IA falla completamente al proporcionar un plegamiento creíble para la secuencia simple cadena de ADN, mientras es capaz de predecir con precisión la estructura del receptor HER2. Esto resalta la validez e importancia del enfoque adoptado en esta tesis para predecir, pasando de 2D a 4D, la estructura del aptámero F21c.

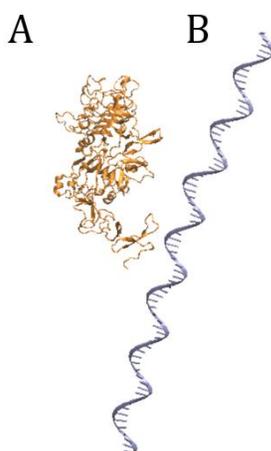


Figura 50: Predicción realizada usando AlphaFold 3. Predicción de la interacción estructural entre F21 y HER2. Con solo brindar las secuencias se observa el receptor HER2 perfectamente plegado (A) en comparación con las estructuras de los PDB analizados; pero el algoritmo no pudo plegar la secuencia nucleotídica del aptámero (B).

F. DISCUSION Y CONCLUSIONES

El objetivo de la búsqueda de biofármacos contra el cáncer de mama, o cualquier otro tipo de cáncer, es obtener moléculas con una especificidad y afinidad superior a las de los fármacos existentes. Aunque estos fármacos pueden cumplir su objetivo, a menudo presentan riesgos y efectos secundarios que pueden deteriorar significativamente la salud de los pacientes o incluso empeorar su situación. Las técnicas para la obtención de biofármacos, como la técnica SELEX, están en constante evolución. Cada vez surgen nuevas variantes que complejizan los sistemas de búsqueda y, a su vez, permiten la selección de biofármacos generados bajo condiciones específicas, ya sean casi fisiológicas o totalmente fisiológicas. Así, un proceso de selección puede variar desde una proteína aislada en solución hasta monocapas celulares, muestras de tejidos simples o complejos de pacientes e incluso animales vivos. Los aptámeros reportados en este trabajo mostraron resultados mixtos y difíciles de replicar, por lo que se plantearán mejoras en el desarrollo de los protocolos de evaluación para seguir probándolos.

Los ensayos de citotoxicidad por precipitación de cristales, como los ensayos de MTT y MTS, son altamente sensibles a las condiciones en las que se realizan. Estas condiciones pueden influir significativamente en los resultados. Se ajustaron varios parámetros para obtener resultados medibles.

De los ensayos de viabilidad celular, se observó una mayor capacidad citotóxica en los aptámeros modificados en el extremo 3' en comparación con los modificados en el extremo 5'. Aunque se trata de una pequeña modificación, la incorporación de un grupo aminohexilo terminal, es importante considerar que incluso el más mínimo cambio puede afectar la conformación final de la molécula, y, por ende, su unión y/o capacidad de inhibir el crecimiento celular o inducir la muerte celular.

Dentro de los aptámeros modificados en el extremo 3', el aptámero F21 mostró la mayor capacidad citotóxica. Sin embargo, este ensayo no pudo ser replicado debido a problemas con el equipo, lo que obligó a cambiar de instalaciones. Este factor debe ser tenido en cuenta al considerar la reproducibilidad de los resultados. En futuras pruebas, podrían evaluarse más condiciones, como aumentar el tiempo de incubación con el fármaco, entre otras.

De confirmarse los resultados, sería posible evaluar el mecanismo por el cual alguno de estos aptámeros genera efectos citotóxicos o inhibe el crecimiento. Un ejemplo claro encontrado en la bibliografía es el anticuerpo monoclonal Trastuzumab, utilizado como control positivo en nuestros ensayos. Este anticuerpo, al unirse al dominio IV de la porción extracelular del receptor HER2 en su forma monomérica, inhibe la dimerización con otros miembros de la familia EGFR o consigo mismo, evitando la generación de cascadas de señalización intracelular. Los aptámeros podrían actuar de forma similar o mediante algún otro mecanismo, ya sea por unión a su blanco o por efectos tras su internalización, si es que esto último ocurre.

Antes de seguir probando condiciones de MTS, se optó por confirmar la Kd de los aptámeros mediante SPR. El único fármaco utilizado que mostró afinidad por el receptor

HER2 en el ensayo fue el anticuerpo monoclonal anti-HER2, Trastuzumab. Este resultado era esperado, ya que fue nuestro control positivo. Sin embargo, ninguno de los aptámeros mostró una unión detectable mediante esta tecnología, lo que pone en duda los resultados obtenidos previamente por MST. Aunque son técnicas diferentes, deberían ofrecer resultados comparables.

Uno de los aptámeros utilizados para dicho ensayo fue el aptámero HB5, que ha sido reportado por otros equipos de investigación como teniendo afinidad por el receptor HER2. Se esperaba observar una respuesta en el ensayo, pero este control aptámero que actuaría como positivo tampoco mostró señal. La MST es una metodología en disolución que requiere que el aptámero esté marcado con un fluoróforo, mientras que la SPR se realiza con el receptor acoplado a una superficie. Es posible que haya aspectos adicionales en la SPR que se podrían optimizar, como el uso de un chip tipo CM5 o un chip NTA, o ajustar las condiciones de corrida y el protocolo de sensibilización del chip. Dado que la reestructuración de los aptámeros se realizó en un buffer Hepes salino necesario para la SPR, el buffer utilizado podría ser una causa de la falta de observación de la unión aptámero-HER2.

Se podría considerar realizar una reestructuración en Binding Buffer y luego separar los aptámeros reestructurados (por ejemplo, mediante filtrado por membrana) antes de resuspenderlos en el buffer correspondiente para el ensayo de SPR. Eventualmente, se podrían realizar pruebas de competencia entre el mAb Trastuzumab y los aptámeros para evaluar si los aptámeros desplazan al Trastuzumab, uniendo primero el mAb y luego agregando los aptámeros. También se podría evaluar la intensidad de la señal entre una muestra que solo tenga mAb y otra con una mezcla de mAb y los aptámeros de interés.

El equipo utilizado en el Instituto Pasteur es más adecuado para el estudio de interacciones proteína-proteína, por lo que podría ser necesario optimizar el protocolo, no solo para la unión de los aptámeros al receptor, sino también para todos los pasos previos relacionados con la preparación y sensibilización del chip.

Respecto a los resultados obtenidos mediante herramientas bioinformáticas, se destaca principalmente la importancia del enfoque adoptado que involucró pasar de la secuencia nucleotídica a la estructura 3D y la flexibilidad (4D) en etapas, integrando diferentes algoritmos. Cada uno de ellos tiene sus aproximaciones y limitaciones y es importante conocer en qué se basan para hacer la predicción correspondiente para poder elegir con un criterio racional. Todos los servidores usados arrojan más de una solución que debe ser analizada. La estructura predicha con “mejor puntuación”, no siempre es la más razonable desde el punto de vista químico. Esto pasa particularmente con las predicciones 2D y 3D iniciales. Al usar esos algoritmos muchas aproximaciones, sus predicciones deben considerarse con cuidado. En todos los casos, la dinámica molecular resultó ser una herramienta fundamental para minimizar y optimizar los contactos moleculares internos al aptámero, y del aptámero con el solvente. En nuestro caso se realizó las dinámicas a 25 °C y utilizando Na⁺, pero se podría probar condiciones diferentes de temperatura, cómo temperatura fisiológica, así como la adición de otros iones que podrían estar presentes en el solvente de por ejemplo el *Binding Buffer*. Es sin

duda una herramienta ineludible para estudiar la flexibilidad molecular de los aptámeros.

Las estructuras equilibradas gracias a la dinámica molecular pueden finalmente ser usadas para los experimentos de unión. Se sabe que el tipo de biofarmacos con los que se está trabajando son desarrollados para presentar una afinidad y especificidad única por un ligando. Así que de las poses obtenidas de los experimentos de *docking* molecular, es posible generar hipótesis sobre dicha unión específica y proponer mutantes. Esto se logra cambiando átomos y grupos funcionales esenciales para la interacción predicha por *docking*, por ejemplo, cambiando la adenina 26 del aptámero F21c por una citosina. Eso debería debilitar la única interacción específica con la treonina y desestabilizar el complejo. Esto es relativamente sencillo de hacer, ya que comprar el aptámero con una (o unas pocas) mutaciones es barato y se podrían volver a realizar los experimentos de unión (en las condiciones adecuadas). Otra manera de contrastar las hipótesis sobre la unión es mediante métodos experimentales como por ejemplo dicroísmo circular, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear, entre otros. Para poder acceder a este tipo de técnicas de alto costo es necesario realizar más análisis experimentales y teóricos para poder determinar si el aptámero seleccionado es un posible candidato para el tratamiento o la detección de cáncer de mama. En el caso de encontrar nuevos resultados positivos o confirmar algunos de los observados, se podría pensar en realizar estas técnicas de alto costo para determinar finalmente la unión y estructura final de las moléculas.

En conclusión, las condiciones de los ensayos pueden ser puestas a punto y el potencial de estos aptámeros no queda descartado. Si bien hemos encontrado algunos resultados ambiguos comparando los ensayos de afinidad por MST y SPR, los ensayos de viabilidad celular que muestran resultados prometedores han sido difíciles de replicar por condiciones externas. El análisis bioinformático permitió generar un protocolo de predicción de secuencias simple cadena de ADN que la IA más nueva no puede resolver, pero en todos los puntos se puede profundizar ya que la cantidad de herramientas bioinformáticas y opciones disponibles son abundantes y extremadamente versátiles, y cada una requiere de adquirir varias *expertises*.

G. BIBLIOGRAFÍA

1. Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S., & Longacre, M. (2013). Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic

- overview. *International journal of molecular sciences*, 14(10), 21087–21113. <https://doi.org/10.3390/ijms141021087>
2. Senga, S. S., & Grose, R. P. (2021). Hallmarks of cancer-the new testament. *Open biology*, 11(1), 200358. <https://doi.org/10.1098/rsob.200358>
 3. Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, 10.1002/ijc.33588. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
 4. Vineis, P., & Wild, C. P. (2014). Global cancer patterns: causes and prevention. *Lancet* (London, England), 383(9916), 549–557. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62224-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62224-2)
 5. Senga, S. S., & Grose, R. P. (2021). Hallmarks of cancer-the new testament. *Open biology*, 11(1), 200358. <https://doi.org/10.1098/rsob.200358>
 6. Bhushan, A., Gonsalves, A., & Menon, J. U. (2021). Current State of Breast Cancer Diagnosis, Treatment, and Theranostics. *Pharmaceutics*, 13(5), 723. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050723>
 7. Garvey, C. J., & Hanlon, R. (2002). Computed tomography in clinical practice. *BMJ* (Clinical research ed.), 324(7345), 1077–1080. <https://doi.org/10.1136/bmj.324.7345.1077>
 8. Berger A. (2002). Magnetic resonance imaging. *BMJ* (Clinical research ed.), 324(7328), 35. <https://doi.org/10.1136/bmj.324.7328.35>
 9. van Beek, E. J., & Hoffman, E. A. (2008). Functional imaging: CT and MRI. *Clinics in chest medicine*, 29(1), 195–vii. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2007.12.003>
 10. Kawada, K., Iwamoto, M., & Sakai, Y. (2016). Mechanisms underlying ¹⁸F-fluorodeoxyglucose accumulation in colorectal cancer. *World journal of radiology*, 8(11), 880–886. <https://doi.org/10.4329/wjr.v8.i11.880>
 11. Yandrapalli S, Puckett Y. SPECT Imaging. [Updated 2022 Oct 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564426/>
 12. Weissleder, Weissleder R. (2001). A clearer vision for in vivo imaging. *Nature biotechnology*, 19(4), 316–317. <https://doi.org/10.1038/86684>
 13. Siragusa, M. A., Rémenieras, J. P., Bouakaz, A., Escoffre, J. M., Patat, F., Dujardin, P. A., Brizard, B., Belzung, C., Camus, V., El-Hage, W., & Desmidt, T. (2020). A systematic review of ultrasound imaging and therapy in mental disorders. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 101, 109919. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.109919>
 14. Ahmed Abd EL-Ghani, Fatma & Elmoggy, Mohammed & Atwan, Ahmed. (2015). Current trends in medical image registration and fusion. *Egyptian Informatics Journal*. <http://doi.org/10.1016/j.eij.2015.09.002>
 15. Henry, N. L., & Hayes, D. F. (2012). Cancer biomarkers. *Molecular oncology*, 6(2), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.01.010>
 16. Borrebaeck C. A. (2017). Precision diagnostics: moving towards protein biomarker signatures of clinical utility in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 17(3), 199–204. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.153>

17. Thenrajan, T., Alwarappan, S., & Wilson, J. (2023). Molecular Diagnosis and Cancer Prognosis-A Concise Review. *Diagnostics* (Basel, Switzerland), 13(4), 766. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13040766>
18. He, N., Thippabhotla, S., Zhong, C., Greenberg, Z., Xu, L., Pessetto, Z., Godwin, A. K., Zeng, Y., & He, M. (2022). Nano pom-poms prepared exosomes enable highly specific cancer biomarker detection. *Communications biology*, 5(1), 660. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03598-0>
19. Aznab, M., Izadi, B., Amirian, F., Khazaei, S., Madani, S. H., & Ramezani, M. (2022). Comparison of Immunohistochemical Methods (IHC) and Fluorescent in Situ Hybridization (FISH) in the Detection of HER 2 /Neu Gene in Kurdish Patients with Breast Cancer in Western Iran. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*, 16(4), 217–223. <https://doi.org/10.18502/ijhoscr.v16i4.10879>
20. Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1897, 289–298. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25
21. Zielinski, R., Hassan, M., Lyakhov, I., Needle, D., Chernomordik, V., Garcia-Glaessner, A., Ardeshirpour, Y., Capala, J., & Gandjbakhche, A. (2012). Affibody-DyLight conjugates for in vivo assessment of HER2 expression by near-infrared optical imaging. *PloS one*, 7(7), e41016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041016>
22. He, N., Thippabhotla, S., Zhong, C., Greenberg, Z., Xu, L., Pessetto, Z., Godwin, A. K., Zeng, Y., & He, M. (2022). Nano pom-poms prepared exosomes enable highly specific cancer biomarker detection. *Communications biology*, 5(1), 660. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03598-0>
23. Schirmacher V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International journal of oncology*, 54(2), 407–419. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4661>
24. Pollock, B. E., Stafford, S. L., Utter, A., Giannini, C., & Schreiner, S. A. (2003). Stereotactic radiosurgery provides equivalent tumor control to Simpson Grade 1 resection for patients with small- to medium-size meningiomas. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 55(4), 1000–1005. [https://doi.org/10.1016/s0360-3016\(02\)04356-0](https://doi.org/10.1016/s0360-3016(02)04356-0)
25. Bramhe, S., & Pathak, S. S. (2022). Robotic Surgery: A Narrative Review. *Cureus*, 14(9), e29179. <https://doi.org/10.7759/cureus.29179>
26. Anand, U., Dey, A., Chandel, A. K. S., Sanyal, R., Mishra, A., Pandey, D. K., De Falco, V., Upadhyay, A., Kandimalla, R., Chaudhary, A., Dhanjal, J. K., Dewanjee, S., Vallamkondu, J., & Pérez de la Lastra, J. M. (2022). Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes & diseases*, 10(4), 1367–1401. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.02.007>
27. Amjad MT, Chidharla A, Kasi A. Cancer Chemotherapy. [Updated 2023 Feb 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564367/>

28. Maani EV, Maani CV. Radiation Therapy. [Updated 2022 Oct 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537036/>
29. Wohlrab J. (2019). Grundlagen der Pharmakologie biologischer Arzneimittel [Basics of the pharmacology of biopharmaceuticals]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 70(12), 926–933. <https://doi.org/10.1007/s00105-019-04502-4>
30. Tsimberidou, A. M., Fountzilas, E., Nikanjam, M., & Kurzrock, R. (2020). Review of precision cancer medicine: Evolution of the treatment paradigm. *Cancer treatment reviews*, 86, 102019. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102019>
31. Schirrmacher V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International journal of oncology*, 54(2), 407–419. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4661>
32. Pucci, C., Martinelli, C., & Ciofani, G. (2019). Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience*, 13, 961. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.961>
33. Shen, T., Zhang, Y., Zhou, S., Lin, S., Zhang, X. B., & Zhu, G. (2020). Nucleic Acid Immunotherapeutics for Cancer. *ACS applied bio materials*, 3(5), 2838–2849. <https://doi.org/10.1021/acsbm.0c00101>
34. Breast Cancer in Uruguay. Period 2016-2020. <https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/BREAST-CANCER-uc259>. 02-07-2024
35. Torres-Román, J. S., Ybaseta-Medina, J., Loli-Guevara, S., Bazalar-Palacios, J., Valcarcel, B., Arce-Huamani, M. A., Alvarez, C. S., & Hurtado-Roca, Y. (2023). Disparities in breast cancer mortality among Latin American women: trends and predictions for 2030. *BMC public health*, 23(1), 1449. <https://doi.org/10.1186/s12889-023-16328-w>
36. Watkins E. J. (2019). Overview of breast cancer. *JAAPA : official journal of the American Academy of Physician Assistants*, 32(10), 13–17. <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000580524.95733.3d>
37. DeSantis, C. E., Bray, F., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Anderson, B. O., & Jemal, A. (2015). International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 24(10), 1495–1506. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0535>
38. Kalwaniya, D. S., Gairola, M., Gupta, S., & Pawan, G. (2023). Ductal Carcinoma in Situ: A Detailed Review of Current Practices. *Cureus*, 15(4), e37932. <https://doi.org/10.7759/cureus.37932>
39. Limaiem F, Khan M, Lotfollahzadeh S. Carcinoma de mama lobular. [Actualizado el 3 de junio de 2023]. En: StatPearls [Internet]. Isla del Tesoro (FL): StatPearls Publishing; 2024 enero-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554578/>

40. Watkins E. J. (2019). Overview of breast cancer. JAAPA : official journal of the American Academy of Physician Assistants, 32(10), 13–17. <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000580524.95733.3d>
41. DeSantis, C. E., Bray, F., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Anderson, B. O., & Jemal, A. (2015). International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 24(10), 1495–1506. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0535>
42. Watkins E. J. (2019). Overview of breast cancer. JAAPA : official journal of the American Academy of Physician Assistants, 32(10), 13–17. <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000580524.95733.3d>
43. Juanpere, S., Perez, E., Huc, O., Motos, N., Pont, J., & Pedraza, S. (2011). Imaging of breast implants-a pictorial review. *Insights into imaging*, 2(6), 653–670. <https://doi.org/10.1007/s13244-011-0122-3>
44. Basilion J. P. (2001). Current and future technologies for breast cancer imaging. *Breast cancer research : BCR*, 3(1), 14–16. <https://doi.org/10.1186/bcr264>
45. Iranmakani S., Mortezaazadeh T., Sajadian F., Ghaziani MF, Ghafari A., Khezerloo D., Musa AE Una revisión de diversas modalidades en imágenes mamarias: aspectos técnicos y resultados clínicos. *Egipto. J. Radiol. Núcleo. Medicina*. 2020; 51:57. <https://doi:10.1186/s43055-020-00175-5>
46. Zhang, X. H., & Xiao, C. (2018). Diagnostic Value of Nineteen Different Imaging Methods for Patients with Breast Cancer: a Network Meta-Analysis. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 46(5), 2041–2055. <https://doi.org/10.1159/000489443>
47. Polyak K. (2011). Heterogeneity in breast cancer. *The Journal of clinical investigation*, 121(10), 3786–3788. <https://doi.org/10.1172/JCI60534>
48. Hammond, M. E., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S., Fitzgibbons, P. L., Francis, G., Goldstein, N. S., Hayes, M., Hicks, D. G., Lester, S., Love, R., Mangu, P. B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C. K., Paik, S., Perlmutter, J., Rhodes, A., ... Wolff, A. C. (2010). American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(16), 2784–2795. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.6529>
49. Wolff, A. C., Hammond, M. E., Hicks, D. G., Dowsett, M., McShane, L. M., Allison, K. H., Allred, D. C., Bartlett, J. M., Bilous, M., Fitzgibbons, P., Hanna, W., Jenkins, R. B., Mangu, P. B., Paik, S., Perez, E. A., Press, M. F., Spears, P. A., Vance, G. H., Viale, G., Hayes, D. F., ... College of American Pathologists (2014). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 138(2), 241–256. <https://doi.org/10.5858/arpa.2013-0953-SA>

50. Bhushan, A., Gonsalves, A., & Menon, J. U. (2021). Current State of Breast Cancer Diagnosis, Treatment, and Theranostics. *Pharmaceutics*, 13(5), 723. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050723>
51. Lemmon, M. A., Schlessinger, J., & Ferguson, K. M. (2014). The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(4), a020768. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020768>
52. Moasser M. M. (2007). Targeting the function of the HER2 oncogene in human cancer therapeutics. *Oncogene*, 26(46), 6577–6592. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210478>
53. Iqbal, N., & Iqbal, N. (2014). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Molecular biology international*, 2014, 852748. <https://doi.org/10.1155/2014/852748>
54. Mok T. S. (2011). Personalized medicine in lung cancer: what we need to know. *Nature reviews. Clinical oncology*, 8(11), 661–668. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.126>
55. Arteaga, C. L., Sliwkowski, M. X., Osborne, C. K., Perez, E. A., Puglisi, F., & Gianni, L. (2011). Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nature reviews. Clinical oncology*, 9(1), 16–32. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.177>
56. Libermann, T. A., Nusbaum, H. R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M. D., Ullrich, A., & Schlessinger, J. (1985). Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature*, 313(5998), 144–147. <https://doi.org/10.1038/313144a0>
57. Lee, J. C., Vivanco, I., Beroukhim, R., Huang, J. H., Feng, W. L., DeBiasi, R. M., Yoshimoto, K., King, J. C., Nghiemphu, P., Yuza, Y., Xu, Q., Greulich, H., Thomas, R. K., Paez, J. G., Peck, T. C., Linhart, D. J., Glatt, K. A., Getz, G., Onofrio, R., Ziaugra, L., ... Mellinger, I. K. (2006). Epidermal growth factor receptor activation in glioblastoma through novel missense mutations in the extracellular domain. *PLoS medicine*, 3(12), e485. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030485>
58. Arteaga C. L. (2003). ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Experimental cell research*, 284(1), 122–130. [https://doi.org/10.1016/s0014-4827\(02\)00104-0](https://doi.org/10.1016/s0014-4827(02)00104-0)
59. Moasser M. M. (2007). Targeting the function of the HER2 oncogene in human cancer therapeutics. *Oncogene*, 26(46), 6577–6592. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210478>
60. Zhang, H., Berezov, A., Wang, Q., Zhang, G., Drebin, J., Murali, R., & Greene, M. I. (2007). ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *The Journal of clinical investigation*, 117(8), 2051–2058. <https://doi.org/10.1172/JCI32278>
61. Popescu, N. C., King, C. R., & Kraus, M. H. (1989). Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. *Genomics*, 4(3), 362–366. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(89\)90343-1](https://doi.org/10.1016/0888-7543(89)90343-1)

62. Shih, C., Padhy, L. C., Murray, M., & Weinberg, R. A. (1981). Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature*, 290(5803), 261–264. <https://doi.org/10.1038/290261a0>
63. King, C. R., Kraus, M. H., & Aaronson, S. A. (1985). Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science (New York, N.Y.)*, 229(4717), 974–976. <https://doi.org/10.1126/science.2992089>
64. Akiyama, T., Sudo, C., Ogawara, H., Toyoshima, K., & Yamamoto, T. (1986). The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science (New York, N.Y.)*, 232(4758), 1644–1646. <https://doi.org/10.1126/science.3012781>
65. Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney, D. W., Jr, & Leahy, D. J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*, 421(6924), 756–760. <https://doi.org/10.1038/nature01392>
66. Krishnamurti, U., & Silverman, J. F. (2014). HER2 in breast cancer: a review and update. *Advances in anatomic pathology*, 21(2), 100–107. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000015>
67. Achalla, L. S. V., Shinde, R. K., Jogdand, S., & Vodithala, S. (2022). Review of the Role of HER2/neu in Colorectal Carcinomas. *Cureus*, 14(5), e25409. <https://doi.org/10.7759/cureus.25409>
68. Bartley, A. N., Washington, M. K., Ventura, C. B., Ismaila, N., Colasacco, C., Benson, A. B., 3rd, Carrato, A., Gulley, M. L., Jain, D., Kakar, S., Mackay, H. J., Streutker, C., Tang, L., Troxell, M., & Ajani, J. A. (2016). HER2 Testing and Clinical Decision Making in Gastroesophageal Adenocarcinoma: Guideline From the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 140(12), 1345–1363. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0331-CP>
69. Giordano, S. H., Franzoi, M. A. B., Temin, S., Anders, C. K., Chandarlapaty, S., Crews, J. R., Kirshner, J. J., Krop, I. E., Lin, N. U., Morikawa, A., Patt, D. A., Perlmutter, J., Ramakrishna, N., & Davidson, N. E. (2022). Systemic Therapy for Advanced Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: ASCO Guideline Update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 40(23), 2612–2635. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.00519>
70. Swain, S. M., Shastry, M., & Hamilton, E. (2023). Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nature reviews. Drug discovery*, 22(2), 101–126. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00579-0>
71. Kaushik, M., Kaushik, S., Roy, K., Singh, A., Mahendru, S., Kumar, M., Chaudhary, S., Ahmed, S., & Kukreti, S. (2016). A bouquet of DNA structures: Emerging diversity. *Biochemistry and biophysics reports*, 5, 388–395. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.01.013>
72. Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4968), 505–510. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>

73. Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287), 818–822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>
74. Zhou, J., & Rossi, J. (2017). Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nature reviews. Drug discovery*, 16(3), 181–202. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.199>
75. Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1992). Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature*, 355(6363), 850–852. <https://doi.org/10.1038/355850a0>
76. Jenison, R. D., Gill, S. C., Pardi, A., & Polisky, B. (1994). High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5152), 1425–1429. <https://doi.org/10.1126/science.7510417>
77. Mendonsa, S. D., & Bowser, M. T. (2004). In vitro evolution of functional DNA using capillary electrophoresis. *Journal of the American Chemical Society*, 126(1), 20–21. <https://doi.org/10.1021/ja037832s>
78. Mendonsa, S. D., & Bowser, M. T. (2004). In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Analytical chemistry*, 76(18), 5387–5392. <https://doi.org/10.1021/ac049857v>
79. Hybarger, G., Bynum, J., Williams, R. F., Valdes, J. J., & Chambers, J. P. (2006). A microfluidic SELEX prototype. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 384(1), 191–198. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0089-3>
80. Daniels, D. A., Chen, H., Hicke, B. J., Swiderek, K. M., & Gold, L. (2003). A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15416–15421. <https://doi.org/10.1073/pnas.2136683100>
81. Mi, J., Liu, Y., Rabbani, Z. N., Yang, Z., Urban, J. H., Sullenger, B. A., & Clary, B. M. (2010). In vivo selection of tumor-targeting RNA motifs. *Nature chemical biology*, 6(1), 22–24. <https://doi.org/10.1038/nchembio.277>
82. Zhuo, Z., Yu, Y., Wang, M., Li, J., Zhang, Z., Liu, J., Wu, X., Lu, A., Zhang, G., & Zhang, B. (2017). Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. *International journal of molecular sciences*, 18(10), 2142. <https://doi.org/10.3390/ijms18102142>
83. Zhuo, Z., Yu, Y., Wang, M., Li, J., Zhang, Z., Liu, J., Wu, X., Lu, A., Zhang, G., & Zhang, B. (2017). Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. *International journal of molecular sciences*, 18(10), 2142. <https://doi.org/10.3390/ijms18102142>
84. Dunn, Matthew & Jimenez, Randi & Chaput, John. (2017). Analysis of aptamer discovery and technology. *Nature Reviews Chemistry*. 1. s41570-017. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0076>.
85. Flinders, J., DeFina, S. C., Brackett, D. M., Baugh, C., Wilson, C., & Dieckmann, T. (2004). Recognition of planar and nonplanar ligands in the malachite green-RNA aptamer complex. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 5(1), 62–72. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300701>
86. Koerselman, M., Morshuis, L. C. M., & Karperien, M. (2023). The use of peptides, aptamers, and variable domains of heavy chain only antibodies in tissue

- engineering and regenerative medicine. *Acta biomaterialia*, 170, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.07.045>
87. Adachi, T., & Nakamura, Y. (2019). Aptamers: A Review of Their Chemical Properties and Modifications for Therapeutic Application. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(23), 4229. <https://doi.org/10.3390/molecules24234229>
88. Shakeel, L., Khan, A., & Akilimali, A. (2024). "Izervay (avacincaptad pegol): paving the way for vision preservation in geographic atrophy". *Annals of medicine and surgery* (2012), 86(5), 2413–2416. <https://doi.org/10.1097/MS9.0000000000002021>
89. Liu, Z., Duan, J. H., Song, Y. M., Ma, J., Wang, F. D., Lu, X., & Yang, X. D. (2012). Novel HER2 aptamer selectively delivers cytotoxic drug to HER2-positive breast cancer cells in vitro. *Journal of translational medicine*, 10, 148. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-148>
90. Qingpeng Zeng, Wentao Liu, Shangjun Lin, Zhencheng Chen, Lizeng Zeng, Fangrong Hu, Aptamer HB5 modified terahertz metasurface biosensor used for specific detection of HER2, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 355, 2022, 131337, ISSN 0925-4005, <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131337>
91. Niazi, J. H., Verma, S. K., Niazi, S., & Qureshi, A. (2015). In vitro HER2 protein-induced affinity dissociation of carbon nanotube-wrapped anti-HER2 aptamers for HER2 protein detection. *The Analyst*, 140(1), 243–249. <https://doi.org/10.1039/c4an01665c>
92. Gijs, M., Penner, G., Blackler, G. B., Impens, N. R., Baatout, S., Luxen, A., & Aerts, A. M. (2016). Improved Aptamers for the Diagnosis and Potential Treatment of HER2-Positive Cancer. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 9(2), 29. <https://doi.org/10.3390/ph9020029>
93. Mahlknecht, G., Maron, R., Mancini, M., Schechter, B., Sela, M., & Yarden, Y. (2013). Aptamer to ErbB-2/HER2 enhances degradation of the target and inhibits tumorigenic growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(20), 8170–8175. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302594110>
94. McKeague, M., Calzada, V., & Cercgua, L. (2022). The minimum aptamer publication standards (MAPS guidelines) for de novo aptamer selection. <http://japtamers.co.uk/wp-content/uploads/2022/05/McKeague.pdf>
95. Bailey, T. L., Johnson, J., Grant, C. E., & Noble, W. S. (2015). The MEME Suite. *Nucleic acids research*, 43(W1), W39–W49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>
96. Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
97. Riss T, Niles A, Moravec R, et al. Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. 2019 May 1. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540958/>
98. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. *Assay*

- Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
99. Nguyen, H. H., Park, J., Kang, S., & Kim, M. (2015). Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications. *Sensors* (Basel, Switzerland), 15(5), 10481–10510. <https://doi.org/10.3390/s150510481>
 100. Dans, P. D., Walther, J., Gómez, H., & Orozco, M. (2016). Multiscale simulation of DNA. *Current opinion in structural biology*, 37, 29–45. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.11.011>
 101. Zuker M. (1989). Computer prediction of RNA structure. *Methods in enzymology*, 180, 262–288. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(89\)80106-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(89)80106-5)
 102. SantaLucia J., Jr (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4), 1460–1465. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1460>
 103. Xu, Z. Z., & Mathews, D. H. (2016). Secondary Structure Prediction of Single Sequences Using RNAstructure. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1490, 15–34. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6433-8_2
 104. Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner Zu Siederdisen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F., & Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for molecular biology : AMB*, 6, 26. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26>
 105. Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA website. *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue), W70–W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn188>
 106. Dans, P., Gallego, D., Balaceanu, A., Modeling, Simulations, and Bioinformatics at the Service of RNA Structure, *Chem*, Volume 5, Issue 1, 2019, Pages 51-73, ISSN 2451-9294, <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2018.09.015>.
 107. Neguembor, M. V., Arcon, J. P., Buitrago, D., Lema, R., Walther, J., Garate, X., Martin, L., Romero, P., AlHaj Abed, J., Gut, M., Blanc, J., Lakadamyali, M., Wu, C. T., Brun Heath, I., Orozco, M., Dans, P. D., & Cosma, M. P. (2022). MiOS, an integrated imaging and computational strategy to model gene folding with nucleosome resolution. *Nature structural & molecular biology*, 29(10), 1011–1023. <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00839-y>
 108. Zhang, Y., Xiong, Y., & Xiao, Y. (2022). 3dDNA: A Computational Method of Building DNA 3D Structures. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(18), 5936. <https://doi.org/10.3390/molecules27185936>
 109. Das, R., Kretsch, R. C., Simpkin, A. J., Mulvaney, T., Pham, P., Rangan, R., Bu, F., Keegan, R. M., Topf, M., Rigden, D. J., Miao, Z., & Westhof, E. (2023). Assessment of three-dimensional RNA structure prediction in CASP15. *bioRxiv : the preprint server for biology*, 2023.04.25.538330. <https://doi.org/10.1101/2023.04.25.538330>
 110. Biesiada, M., Purzycka, K. J., Szachniuk, M., Blazewicz, J., & Adamiak, R. W. (2016). Automated RNA 3D Structure Prediction with RNAComposer. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1490, 199–215. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6433-8_13
 111. Badar, M.S., Shamsi, S., Ahmed, J., Alam, M.A. (2022). Molecular Dynamics Simulations: Concept, Methods, and Applications. In: Rezaei, N. (eds)

- Transdisciplinarity. Integrated Science, vol 5. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-94651-7_7
112. Frenkel, D., & Smit, B. (2002b). Molecular Dynamics in Various Ensembles. En Elsevier eBooks (pp. 139-163). <https://doi.org/10.1016/b978-012267351-1/50008-0>
 113. Case, D. A., Aktulga, H. M., Belfon, K., Cerutti, D. S., Cisneros, G. A., Cruzeiro, V. W. D., Forouzes, N., Giese, T. J., Götz, A. W., Gohlke, H., Izadi, S., Kasavajhala, K., Kaymak, M. C., King, E., Kurtzman, T., Lee, T. S., Li, P., Liu, J., Luchko, T., Luo, R., ... Merz, K. M., Jr (2023). AmberTools. Journal of chemical information and modeling, 63(20), 6183–6191. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c01153>
 114. Ivani, I., Dans, P. D., Noy, A., Pérez, A., Faustino, I., Hospital, A., Walther, J., Andrio, P., Goñi, R., Balaceanu, A., Portella, G., Battistini, F., Gelpí, J. L., González, C., Vendruscolo, M., Laughton, C. A., Harris, S. A., Case, D. A., & Orozco, M. (2016). Parmbsc1: a refined force field for DNA simulations. Nature methods, 13(1), 55–58. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3658>
 115. Dans, P. D., Ivani, I., Hospital, A., Portella, G., González, C., & Orozco, M. (2017). How accurate are accurate force-fields for B-DNA?. Nucleic acids research, 45(7), 4217–4230. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1355>
 116. Agu, P. C., Afiukwa, C. A., Orji, O. U., Ezeh, E. M., Ofoke, I. H., Ogbu, C. O., Ugwuja, E. I., & Aja, P. M. (2023). Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. Scientific reports, 13(1), 13398. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2>
 117. Ambrosetti, F., Jandova, Z., & Bonvin, A. M. J. J. (2023). Information-Driven Antibody-Antigen Modelling with HADDOCK. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2552, 267–282. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2609-2_1
 118. Agu, P. C., Afiukwa, C. A., Orji, O. U., Ezeh, E. M., Ofoke, I. H., Ogbu, C. O., Ugwuja, E. I., & Aja, P. M. (2023). Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. Scientific reports, 13(1), 13398. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2>
 119. Vo, T., Paul, A., Kumar, A., Boykin, D. W., & Wilson, W. D. (2019). Biosensor-surface plasmon resonance: A strategy to help establish a new generation RNA-specific small molecules. Methods (San Diego, Calif.), 167, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.05.005>
 120. Case, D. A., Aktulga, H. M., Belfon, K., Cerutti, D. S., Cisneros, G. A., Cruzeiro, V. W. D., Forouzes, N., Giese, T. J., Götz, A. W., Gohlke, H., Izadi, S., Kasavajhala, K., Kaymak, M. C., King, E., Kurtzman, T., Lee, T. S., Li, P., Liu, J., Luchko, T., Luo, R., ... Merz, K. M., Jr (2023). AmberTools. Journal of chemical information and modeling, 63(20), 6183–6191. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c01153>
 121. Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. Journal of molecular graphics, 14(1), 33–28. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
 122. Ivani, I., Dans, P. D., Noy, A., Pérez, A., Faustino, I., Hospital, A., Walther, J., Andrio, P., Goñi, R., Balaceanu, A., Portella, G., Battistini, F., Gelpí, J. L., González, C., Vendruscolo, M., Laughton, C. A., Harris, S. A., Case, D. A., & Orozco, M. (2016). Parmbsc1: a refined force field for DNA simulations. Nature methods, 13(1), 55–58. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3658>

123. Boonstra, S., Onck, P. R., & Giessen, E.v (2016). CHARMM TIP3P Water Model Suppresses Peptide Folding by Solvating the Unfolded State. *The journal of physical chemistry. B*, 120(15), 3692–3698. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.6b01316>
124. Joung, I. S., & Cheatham, T. E., 3rd (2008). Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations. *The journal of physical chemistry. B*, 112(30), 9020–9041. <https://doi.org/10.1021/jp8001614>
125. Harris, J. A., Liu, R., Martins de Oliveira, V., Vázquez-Montelongo, E. A., Henderson, J. A., & Shen, J. (2022). GPU-Accelerated All-Atom Particle-Mesh Ewald Continuous Constant pH Molecular Dynamics in Amber. *Journal of chemical theory and computation*, 18(12), 7510–7527. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.2c00586>
126. Cuervo, A., Dans, P. D., Carrascosa, J. L., Orozco, M., Gomila, G., & Fumagalli, L. (2014). Direct measurement of the dielectric polarization properties of DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35), E3624–E3630. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405702111>

H. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1	Diversos factores que caracterizan el cáncer.
Figura 2	Casos de cáncer más comunes en 2020.
Figura 3	Esquematación de los efectos que generan las causas endógenas.
Figura 4	Esquema de diagnósticos, terapias y nanomedicina actuales.
Figura 5	Imágenes obtenidas por diferentes metodologías del cerebro de un paciente.
Figura 6	Imágenes de hibridación in-situ fluorescente (FISH).
Figura 7	Microscopía confocal de células HER2 positivas y HER2 negativas expuestas a ZHER2-DyLight-488.
Figura 8	Enfoque de terapias contra el cáncer.
Figura 9	Ejemplificación de terapias con ácidos nucleicos
Figura 10	Gráficos de casos nuevos (A), decesos (B) y prevalencia (C) a nivel mundial durante el 2012.
Figura 11	Diferentes enfoques para la detección de cáncer de mama.
Figura 12	Esquematación de la familia EGFR.
Figura 13	Dimerización del receptor HER2 consigo mismo y con otros miembros de la familia EGFR.
Figura 14	Receptor HER2.
Figura 15	Línea temporal del descubrimiento de la familia EGFR y HER2.
Figura 16	Estructura básica de un aptámero y su secuencia complementaria.
Figura 17	Representación esquemática del proceso de SELEX.
Figura 18	Estructura terciaria de un aptámero.
Figura 19	Comparación del tamaño entre diferentes moléculas.
Figura 20	Resultado del MST para el aptámero F21.
Figura 21	Alineación de 6 secuencias diferentes de aptámeros.
Figura 22	Representación de los procesos que ocurren en un cultivo celular expuesto al reactivo MTT.
Figura 23	Concepto de biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR).
Figura 24	Diseño del chip de reconocimiento.
Figura 25	Plegamiento de una molécula de ssARN.
Figura 26	Propagación de las ecuaciones de Newton a lo largo del tiempo.
Figura 27	Hamiltoniano de energía clásico.
Figura 28	Cultivos celulares de las líneas utilizadas vistos bajo microscopio de contraste de fases.
Figura 29	Reacción química llevada a cabo por enzimas deshidrogenasas en el reactivo MTS.
Figura 30	Diseño de la placa de 96 pocillos para los ensayos comparativos.
Figura 31	Diseño de la placa de 96 pocillos para los ensayos de citotoxicidad.
Figura 32	Preparación del chip CM5.
Figura 33	Posibles motivos estructurales encontrados en estructuras secundarias.
Figura 34	Citotoxicidad mediada por drogas en línea celular BT474.
Figura 35	Media (\pm SD) del % de viabilidad celular para la línea BT474.
Figura 36	Citotoxicidad mediada por drogas en línea celular MDA-MD-231.
Figura 37	Citotoxicidad mediada por drogas en línea celular BT474.
Figura 38	Citotoxicidad mediada por drogas en línea celular MDA-MB-231.

Figura 39	Resonancia de plasmon superficial (SPR).
Figura 40	Estructuras secundarias con menor ΔG para cada aptámero.
Figura 41	Estructura secundaria del aptámero F21.
Figura 42	Estructuras tridimensionales posibles para el aptámero F21c.
Figura 43	RMSD promedio durante los últimos 300 ns de 500 ns totales.
Figura 44	3 primeros modos de la dinámica esencial.
Figura 45	Estructura final luego de la última dinámica molecular realizada para el aptámero F21.
Figura 46	Alineamiento de estructuras HER2 en Paymol.
Figura 47	6J71 estructura HER2 final.
Figura 48	Docking HER2-Aptámero F21
Figura 49	Interacciones específica, inespecíficas y artefactos encontrados en los primeros 3 complejos estudiados del docking entre el aptámero y el receptor HER2.
Figura 50	Predicción realizada usando Alphafold 3.
Tabla 1	Características de las técnicas de imagenología más usuales.
Tabla 2	Biomarcadores proteicos.
Tabla 3	Clasificaciones de terapias farmacológicas.
Tabla 4	Subtipos de cáncer de mama.
Tabla 5	Lista de medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de cáncer de mama.
Tabla 6	Tabla comparativa de biofarmacos ampliamente estudiados
Tabla 7	Variables modificadas en distintos ensayos comparativos.
Tabla 8	variables modificadas en distintos ensayos de IC ₅₀ .
Tabla 9	Motivos estructurales en las predicciones 2D.
Tabla 10	Análisis de estructuras disponibles en la base de datos Protein data Bank para el receptor HER2.
Tabla 11	Interacciones atómicas del docking rígido entre HER2 y el aptámero F21 en HDock.

I. GLOSARIO DE ACRONIMOS

¹ H-RMN	Resonancia magnética de protones (del inglés proton nuclear magnetic Resonance)
ADK	Adenilato quinasa (del inglés Adenylate kinase)
APC	Célula presentadora de antígeno (del inglés Antigen-presenting cell).
ATCC	Colección de cultivos tipo americanos (del inglés the American Type Culture Collection).
BSGI	Imagenología gamma específica de mama (del inglés breast-specific gamma imaging).
BT474	línea celular de cáncer de mama humana.
BTC	Betacelulina (del inglés betacellulin).
CA	Antígeno de carbohidratos (del inglés Carbohydrate antigen).
CA 15.3	Antígeno de carbohidratos 15.3 (del inglés Carbohydrate antigen 15.3).
CA 19-9	Antígeno de carbohidratos 19-9 (del inglés Carbohydrate antigen 19-9).
CA 27.9	Antígeno de carbohidratos 27.9 (del inglés Carbohydrate antigen 27.9).
CA 125	Antígeno de carbohidratos 125 (del inglés Carbohydrate antigen 125).
CAR	Receptor quimérico específico de antígeno (del inglés Chimeric antigen receptor).
CAR-T	Células T con receptores quiméricos de antígenos (del inglés T Cell with chimeric antigen receptor).
Cas9	Proteína 9 asociada a CRISPR (del inglés CRISPR associated protein 9).
CDK4/6	Inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina 4 y 6.
CDN	Dinucleótidos cíclicos (del inglés Cyclic dinucleotides)
CEA	Antígeno carcinoembrionario (del inglés carcinoembryonic antigen).
CENUR	Centro Universitario Regional Litoral Norte.
cGAS	GMP-AMP sintasa ciclase (del inglés GMP-AMP synthase cyclase).
CM5	Dextrano carbometilado (del inglés carboxymethylated dextran).
CRISPR	Secuencias Palindrómicas cortas agrupadas regularmente intercaladas (del inglés clustered regularly interspaced short palindromic repeats).
Cryo-Em	Microscopía electrónica criogénica (del inglés Cryogenic electron microscopy).
CT	Tomografía computarizada (del inglés Computed Tomography).
CT-Scan	Scanner por tomografía computarizada (del inglés Computed Tomography scanner).
DCE-MRE	Perfusión por resonancia magnética con contraste dinámico (Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging).
DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés Deoxyribonucleic Acid).
dsDNA	ADN de doble cadena (del inglés double strand DNA).
dsRNA	ARN de doble cadena (del inglés double strand RNA).
DXd	Deruxtecán.
DWI	Imágenes ponderadas por difusión (Diffusion-weighted imaging).
EGF	Factor de crecimiento epitelial (del inglés Epithelial growth factor).
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés Epidermal Growth Factor Receptor).
EPR	Epiregulina (del inglés epiregulin).
ER+	Receptor de estrógeno positivo (del inglés positive Estrogen Receptor).

ER	Receptor de estrógeno (del inglés Estrogen Receptor).
ErbB2	Protooncogén de HER2.
ErbB3	Protooncogén de HER3.
ErbB4	Protooncogén de HER4.
FDA	Administración de alimentos y medicamentos (del inglés Food and Drug Administration).
FDG	Fluorodesoxiglucosa (del inglés Fluorodeoxyglucose).
FISH	Hibridación in situ fluorescente (del inglés Fluorescence In situ Hybridation).
g-hGC	gonadotropina coriónica humana g (Del inglés Human chorionic gonadotropin).
GA	Atrofia geográfica (del inglés Geographic Atrophy).
GF	Factor de crecimiento (del inglés growth factor).
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor).
H&E	Hematoxilina y eosina (del inglés hematoxylin and eosine).
HB-EGF	Factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina del inglés Heparin-binding EGF-like growth factor).
HDAC	Inhibidores de la histona desacetilasa (del inglés Histone Deacetylase inhibitors).
HEK293	Célula embrionaria de riñón humano.
HER1	Receptor humano epitelial de tipo 1 (del inglés Human Epithelial Factor 1).
HER2	Receptor humano epitelial de tipo 2 (del inglés Human Epithelial Factor 2).
HER2 +	Receptor humano epitelial de tipo 2 positivo (del inglés Human Epithelial Factor 2).
HER2 -	Receptor humano epitelial de tipo 2 negativo (del inglés Human Epithelial Factor 2).
HER3	Receptor humano epitelial de tipo 3 (del inglés Human Epithelial Factor 3).
HER4	Receptor humano epitelial de tipo 4 (del inglés Human Epithelial Factor 4).
HR	Receptor hormonal (del inglés Hormonal Receptor).
HR+	Receptor hormonal positivo (del inglés Hormonal Receptor).
HR-	Receptor hormonal negativo (del inglés Hormonal Receptor).
IDC	Carcinoma ductales infiltrantes (del inglés Invasive Ductal Carcinoma).
IDT	Tecnologías de DNA integradas (del inglés integrated DNA technologies)
IC ₅₀	Concentración inhibidora media máxima (del inglés half maximal Inhibitory Concentration).
IgG	Inmunoglobulina G (del inglés immunoglobulin G)
IHC	Inmunohistoquímica (del inglés Immunohistochemistry).
IKK	I κ B quinasa (del inglés I κ B kinase)
INSOAP	Sociedad internacional de aptámeros (del inglés International Society On Aptamers).
IP	Instituto Pasteur.
IRF3	Factor regulador de interferón 3 (del inglés Interferon regulatory factor 3).
iRNA	RNA de interferencia (del inglés interference RNA).
IRYCIS	Instituto Ramon y Cajal de Investigación Sanitaria.

Kd	Constante de disociación (del inglés dissociation constant).
Kon	Constante de la tasa de asociación.
Koff	Constante de la tasa de separación.
Ki-67	Antígeno Kiel 67 (del inglés Antigen Kiel 67).
LDH	Lactato deshidrogenasa (del inglés Lactate Dehydrogenase).
mAb	Anticuerpo monoclonal (del inglés monoclonal Antibody).
MAFFT	Alineación de secuencias múltiples basada en la transformación rápida Fourier (del inglés Multiple Sequence Alignment based on Fast Fourier Transform).
MDA-MB-231	Línea celular de cáncer de mama de humano.
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos del inglés (mitogen-activated protein kinase).
MAPKK	MAPK quinasa (del inglés MAPK kinase).
MEME	Em múltiples para la obtención de motivos (del inglés Multiple Em for Motif Elicitation).
MDM2	Inhibidores del homólogo doble minuto 2 de p53/ratón (del inglés p53/mouse minute 2 double homologue inhibitors).
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés major histocompatibility complex).
MRE	Elastografía por Resonancia magnética (del inglés Magnetic Resonance elastography).
MRI	Imagen por resonancia magnética (del inglés Magnetic Resonance Imaging).
mRNA	RNA mensajero (del inglés Messenger RNA).
MST	Termoforesis a microescala (del inglés Microscale Thermophoresis).
MTS	Nombre IUPAC del reactivo MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium].
mTOR	Inhibidores del objetivo mecanicista de la rapamicina (del inglés Inhibitors of the mechanistic target of rapamycin).
MTT	Nombre IUPAC del reactivo MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide).
ncRNA	ARN no codificante (del inglés non coding RNA).
NCI	Instituto nacional del cáncer (del inglés national cancer institute).
NF- κ B	factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas (del inglés Nuclear Factor-kappa B).
NIH-3T3	Línea celular de neuroblastomas de rata.
NK	Asesina natural (del inglés Natural killer).
NRG1	Neuregulina 1 (del inglés Neuregulin 1).
NRG2	Neuregulina 2 (del inglés Neuregulin 2).
NRG3	Neuregulina 3 (del inglés Neuregulin 3).
NRG4	Neuregulina 4 (del inglés Neuregulin 4).
NTA	Ácido nitrilotriacético (del inglés nitrilotriacetic acid).
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés Pathogen-associated molecular patterns).
Pan-PI3Ki	Copanlisib, Inhibidor de la fosfoinositol 3-quinasa (del inglés Phosphoinositide 3-kinases inhibitor).

PARP	Inhibidores de la poli (adenosina difosfato-ribosa) polimerasa (del inglés Poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase inhibitors).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction).
PDB	Banco de datos de proteínas (Por sus siglas en inglés Protein data Bank).
PET	Tomografía por emisión de positrones (del inglés Positron Emission Tomography).
PET-CT	Tomografía por emisión de positrones-tomografía computarizada (del inglés Positron emission tomography-computed tomography).
PI3K	Inhibidor de la fosfoinositol 3-quinasa (del inglés Phosphoinositide 3-kinases inhibitor).
PI3K /Akt	Fosfoinositol 3-cinasa / Proteína quinasa B (del inglés Phosphoinositide 3-kinases / Protein kinase B).
PIK3CA	Subunidad catalítica alfa de fosfatidilinositol-4-5-bifosfato 3-quinasa (del inglés phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit Alpha).
piRNA	RNA interactuante con PIWI (del inglés PIWI-Interacting RNA).
PKC	Proteína quinasa C (del inglés Protein kinase C).
PL-D1	Fosfolipasa D1 (del inglés phospholipase D1).
PLC	Fosfolipasa C (del inglés Phospholipase C).
PR	Receptor de progesterona (del inglés Progesteron Receptor).
PR+	Receptor de progesterona positivo (del inglés positive Progesteron Receptor).
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés Pattern Recognition Receptor).
PSA	Antígeno específico de la próstata (del inglés Prostate-Specific Antigen).
q-PCR	PCR cuantitativa (del inglés quantitative PCR).
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (del inglés phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase).
Raf	Protooncogén serina/treonina-proteína quinasa (del inglés proto-oncogene serine/threonine-protein kinase).
RAS	Virus de sarcoma de rata (del inglés Rat sarcoma virus).
RF	Radio frecuencia (del inglés Radio Frequency).
RMSD	Desvío cuadrático medio (del inglés root mean square Deviation).
RNA	Ácido ribonucleico (del inglés Ribonucleic Acid).
RND	Nucleótidos random (del inglés Random Nucleotide).
RPMI	Instituto memorial Roswell Park (del inglés Roswell Park Memorial Institute).
RT-PCR	PCR por retrotranscripción (del inglés retro transcription PCR)
RTK	Receptor tirosin quinasa (del inglés Receptor Tyrosine Kinase).
RU	Unidades de respuesta (del inglés Response Units).
SELEX	Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (del inglés Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment).
SERD	Degradadores selectivos de los receptores de estrógeno (del inglés selective estrogen receptor degrader).
SFB	Suero fetal bobino (del inglés fetal bovine serum).
shRNA	Horquilla corta de ARN (del inglés short hairpin RNA).
siRNA	ARN silenciador (del inglés silencing RNA).

SLNB	Biopsia de ganglio linfático centinela (del inglés sentinel lymph node biopsy).
ssDNA	ADN de simple cadena (del inglés single strand DNA).
ssRNA	ARN de simple cadena (del inglés single strand RNA).
SPECT	Tomografía computarizada por emisión de fotón único (del inglés Single Photon Emission Computed Tomography).
SPR	Resonancia de factor superficial (del inglés Surface Plasmon Resonance)
ssRNA	RNA de simple cadena (del inglés single strand RNA).
Stat6	transductor de señal y activador de la transcripción 6 (del inglés Signal transducer and activator of transcription 6).
STII	Estreptavidina (del inglés Streptavidin).
STING	Estimulador de genes de interferón (del inglés Stimulator of interferon genes).
Tc-99m	Tecnecio 99 metaestable (del inglés Technetium 99 metastable).
T-DM1	Trastuzumab Emtansina (del inglés Trastuzumab emtansine).
T-DXd	Trastuzumab-Deruxtecán.
TAA	Antígenos asociados a tumores (del inglés tumor associated antigen).
TBK	Quinasa 1 de unión a TANK (del inglés TANK-binding kinase 1).
TGF- α	Factor de crecimiento tumoral alfa (del inglés tumoral growth factor alpha).
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral beta (del inglés Tumoral growth factor beta).
TKI	Inhibidor de tirosin quinasa (del inglés tyrosine kinase inhibitor).
TNBC	Cáncer de mama triple negativo (del inglés triple negative breast cancer).
TRIF	interferón beta inductor de adaptador que contiene dominio TIR conocido (TIR domain-containing adaptor inducing IFN-beta).
TLR	Receptores de tipo toll (del inglés Toll like receptor).
UI	Imagen por ultrasonido (del inglés ultrasound imaging).
VMD	Dinámicas moleculares visuales (del inglés visual molecular dynamics).
VPH	Virus del papiloma humano (del inglés Human Papillomavirus).
X-RAY Dif	Difracción de rayos X (del inglés X-Ray diffraction).
XTT	Nombre IUPAC del reactivo: XTT 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide).
WST-1	Nombre IUPAC del reactivo WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium).

J. AGRADECIMIENTOS

Este proyecto de tesis no solo refleja mi esfuerzo y desarrollo intelectual y profesional, sino que también representa algo mucho más amplio y significativo. Es una manifestación del apoyo constante que he recibido de mi familia y amigos a lo largo de los años. Me han acompañado y alentado, incluso en momentos en los que no creía posible llegar hasta aquí.

Tengo la suerte de decir que la lista de personas a quienes debo gratitud es considerablemente extensa, pero deseo destacar especialmente a mi madre, Rosana Delia Panizza del Pino; mi abuela, Tatiana López Melo; y mi abuelo, Emidio Augusto de Castro de Freitas. Estos tres pilares han sostenido mi vida, y todo lo que he logrado se debe a su apoyo, no solo en lo profesional, sino también en mi desarrollo como ser humano.

También quiero agradecer a Soffa Romano García y Antonella Batalla Aguilera. Estas personas son prueba de que, a pesar del paso del tiempo y de los caminos divergentes que tomamos, es posible forjar vínculos tan fuertes que resisten las décadas y cualquier obstáculo. No solo es posible conservar las amistades, sino también fortalecerlas y hacerlas cada vez más sólidas e inquebrantables.

Durante mi carrera, he tenido grandes referentes: profesionales cuyo trabajo he admirado y he tenido el privilegio de conocer, así como otros que fueron fundamentales para mi formación como científico. El mayor reconocimiento va dirigido a la Dra. Victoria Calzada, quien, a pesar de mi falta de experiencia, me brindó numerosas oportunidades desde el momento en que busqué integrarme a su equipo de investigación. También agradezco al Dr. Pablo Dans, quien, junto con Victoria, me proporcionó las herramientas necesarias para finalizar mi formación con orgullo y me enseñó valiosos aspectos laborales, como la importancia de trabajar con honestidad y ética.

Quiero expresar mi agradecimiento al tribunal evaluador, compuesto por el Dr. Juan Pablo Tosar, el Dr. Marcos Couto y la Lic. en Bioquímica Clínica Romina Medeiros, cuyos aportes y correcciones fueron esenciales para mejorar la presentación final de mi trabajo y para aportar sugerencias muy valiosas para el proyecto de investigación.

Un reconocimiento especial al Dr. Hugo Cerecetto, jefe del área de Radiofarmacia, un excelente científico y docente. Además de su vocación como científico, se esfuerza diariamente por el instituto del cual somos parte y por ofrecer a los estudiantes clases enriquecedoras e interesantes.

Agradezco también a todos mis compañeros del área de Radiofarmacia del Centro de Investigaciones Nucleares, quienes estuvieron a mi lado cuando necesité ayuda. Asimismo, al equipo de Bioinformática del CENUR Litoral Norte, con quienes tuve el placer de trabajar en el Instituto Pasteur, y al Departamento de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene, con quienes colaboramos en este proyecto.

Esta sección podría extenderse mucho más, pero finalmente quiero agradecer a L'Oréal-UNESCO por la financiación de este proyecto de investigación, a través del premio otorgado a la Dra. Victoria Calzada por el Programa L'Oréal-UNESCO para las Mujeres en la Ciencia.