

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Construcción de un Sistema Reportero para el Tamizaje de
Compuestos Bioactivos Contra el Gen asociado al Cáncer
PD-L1

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Allison Nicole Asencio Muñoz

Steven Abel Merchán Magallanes

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2018

DEDICATORIA

A Dios, por su inmenso amor y por todos los talentos depositados en mí. A mi madre por su paciencia y amor diario, sobre todo por su comprensión. Te amo mamá. A todos los maestros que han inculcado en mí no sólo conocimientos sino también muchos valores, a quienes ya partieron de este mundo y a quienes aún siguen dando todo de sí en las aulas, siempre los tengo presente. A mi tía Vicenta, sé que no estás aquí, pero con mucho amor esto va para ti. Al final de todo, la montaña delante no es imposible de pasar si estás acompañada de personas que te valoran y te motivan a ser una mejor persona, de qué vale un conocimiento si no es compartido con los demás, de qué vale si no es inculcado con amor, y de qué vale si no va acompañado de mucho entusiasmo, dedicación, pero sobre todo de amor. ¡Qué nunca falte amor en lo que hagas!

Allison Nicole.

A mi mamá, hermanas y a todas las personas que les apasione la ciencia,

Steven Abel.

AGRADECIMIENTOS

Nuestros más sinceros agradecimientos al Laboratorio de Biomedicina de la ESPOL por su eterna paciencia para con nosotros, al profesor Washington B. Cárdenas por su motivación e imaginación en la inmunología, a Mariuxi Mirabá por su apoyo durante todo este proceso, a nuestra tutora Fernanda Cordeiro y a todos los que pertenecen al laboratorio. A la universidad por estos 5 largos años inculcando en nosotros los conocimientos, y a todos los profesores que formaron parte de nuestra vida estudiantil desde la escuela hasta la actualidad.

¡Gracias Totales!

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Steven Merchán* y *Allison Asencio* damos nuestro consentimiento para que la ESPOI realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”

Allison Nicole Asencio
Muñoz

Steven Abel Merchán
Magallanes

EVALUADORES

.....
Ph.D. Diego Arturo Gallardo Polit

PROFESOR DE LA MATERIA

.....
Ph.D. Fernanda Bertuccez Cordeiro

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El cáncer es la enfermedad no transmisible de mayor impacto a nivel mundial, y es una de las principales causas de muerte en la actualidad. Los tratamientos actuales como la quimioterapia, la radioterapia, la inmunoterapia tienen tasas de éxitos relativamente buena, pero con un sin número de efectos secundarios, sin poner a consideración los altos costos que limita su acceso. La búsqueda por compuestos naturales que tengan potencial anticancerígeno está direccionándose a la fauna marina, especialmente hacia los productos naturales marinos (MNPs) extraídos de los invertebrados.

Ecuador es uno de los principales países megadiversos a nivel mundial. La gran biodiversidad acuática ecuatoriana junto a la creciente extracción de metabolitos proveniente crea la necesidad de desarrollar una plataforma de tamizaje de dichos extractos de acuerdo a la aplicación en salud humana o animal.

Existen una gran variedad de genes involucrados con promover la actividad de las células cancerígenas y que permiten que se desarrolle el microambiente tumoral. Entre ellas se encuentra el Ligando de la Muerte Programada I (PD-L1) el cuál evita la destrucción de las células tumorales pasando el control realizado por las células T. Por esta razón, se ha convertido en un gen diana para las investigaciones de fármacos contra el cáncer.

El presente trabajo tuvo como objetivo la generación de un sistema reportero fluorescente para el promotor del PD-L1, con el fin de crear el primer sistema de tamizaje en el país para la evaluación de los compuestos bioactivos extraídos de la biodiversidad ecuatoriana y conocer su potencial como producto farmacéutico antineoplásico.

Se logró realizar el diseño y el ensamblaje del sistema reportero GFP comprobándolo mediante PCR. Para proyectos futuros, se comprobará su viabilidad y su uso como herramienta de tamizaje.

Palabras Claves: Ligando de la Muerte Programada I (PD-L1), compuestos bioactivos, cáncer, gen reportero GFP.

ABSTRACT

Cancer is the most important non-communicable disease worldwide and is one of the leading causes of death now. Current treatments such as chemotherapy, radiotherapy, and immunotherapy have relatively good success rates, but they produce a lot of effects on patients, however, their high costs limit to their access. The search of natural compounds that have potential against cancer is directing towards marine fauna, especially marine natural products (NPMs) extracted from invertebrates.

Ecuador is one of the main megadiverse countries worldwide. The great Ecuadorian aquatic biodiversity together with the extraction of metabolites from it, creates the need to develop a screening platform for these extracts according to the application in human or animal health.

There is a great variety of genes involved in promoting the activity of cancer cells and allowing the tumor microenvironment to develop. Among them is the Programmed Death League I (PD-L1) which prevents the destruction of tumor cells by passing the control performed by the T cells. For this reason, it has become a target gene for drug investigations against cancer.

The objective of this work was to generate a fluorescent reporter system for the PD-L1 promoter, in order to create the first screening system in the country for the evaluation of bioactive compounds extracted from Ecuadorian biodiversity and to know their potential as an antineoplastic pharmaceutical product.

The design and assembly of the GFP reporter system was verified by PCR. For future projects, its viability and its use as a screening tool will be checked.

Key Words: Ligand of Programmed Death I (PD-L1), bioactive compounds, cancer, GFP reporter gene.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	VI
ABSTRACT.....	VII
ÍNDICE GENERAL	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS	XII
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introducción	1
1.1.1 Descripción del Problema	3
1.1.2 Justificación	4
1.1.3 Objetivos	5
1.1.3.1 Objetivo General	5
1.1.3.1 Objetivo Específico	5
1.2 Marco Teórico	6
1.2.1 Cáncer	6
1.2.1.1 Definición, características y tipos	6
1.2.1.2 Tipos de Cáncer	7
1.2.1.3 Causas del Cáncer	7
1.2.1.4 Biología del Cáncer	8
1.2.1.5 Tratamientos contra El cáncer: costos, toxicidad y éxito	9
1.2.2 Ligando de la Muerte Celular Programada (PD-L1)	13
1.2.2.1 Definición y Función	13
1.2.2.2 PD-L1 y el microambiente tumoral	13
1.2.2.3 Mutaciones en el Gen y el Promotor PD-L1.....	16
1.2.2.4 Inmunoterapia: Dirigida a PDL1	16
1.2.3 Compuestos Bioactivos	17
1.2.3.1 Cáncer y Compuestos Bioactivos Marinos	17
1.2.3.2 Clasificación química de compuestos bioactivos marinos	19
1.2.3.3 MNPs en investigación o en etapas preclínicas clasificadas por objetivos moleculares de cáncer.....	21
CAPÍTULO 2	23
2. METODOLOGIA.....	23

2.1 Materiales y Métodos	23
2.1.1 Recursos Bioinformáticos	23
2.1.2 Identificación Y Descripción Del Gen PD-L1	24
2.1.3 Primer: Diseño Y Evaluación	24
2.1.4 PCR	25
2.5 Clonación	25
2.1.6 Construcción De Sistema Reportero Fluorescente	26
2.1.7 Digestión.....	28
2.1.7.1 Primera Digestión	28
2.1.7.2 Segunda Digestión	28
2.1.8 LIGACIÓN	29
CAPÍTULO 3	30
3. RESULTADOS	30
3.1.- PCR-ESTÁNDAR.....	30
3.2.- Clonación en pGEM-T.....	31
3.3.- Ensamblaje pCAGGs-eGFP-PD-L1p-AP1.....	32
3.3.1.- Ensamblaje pCAGGs-eGFP-AP1	32
3.3.2.- Ensamblaje pCAGGs-eGFP-PD-L1p-AP1.....	32
CAPÍTULO 4	34
4.1 Conclusiones y Recomendaciones	34
BIBLIOGRAFÍA.....	36
ANEXOS.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- MAPA MUNDIAL CON LAS TASAS DE MORTALIDAD PROVOCADA POR CUALQUIER TIPO DE CÁNCER EN AMBOS SEXOS A EXCEPCIÓN DE CÁNCER DE PIEL EN EL 2012. FUENTE: (FERLAY ET AL., 2015).....	6
FIGURA 2.- INTERACCIÓN DE LAS CÉLULAS INMUNITARIAS Y TUMORALES CON LA CÉLULA T CITOTÓXICA A TRAVÉS DEL LIGANDO PD-L1. SE OBSERVA LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA GENERADA POR LA SECRECIÓN DE INTERFERÓN GAMMA. FUENTE: (RESEARCH, 2012) CITADO EN (ABYNTEK BIOPHARMA, 2017).....	14
FIGURA 3.- MECANISMO DE EVASIÓN DE LA CÉLULA TUMORAL DE LA RESPUESTA INMUNITARIA USANDO PD-L1. FUENTE: (TRIPLETT ET AL., 2018).....	15
FIGURA 4.- NÚMERO DE PUBLICACIONES EN RELACIÓN CON LOS COMPUESTOS MARINOS EN LOS ÚLTIMOS 20 AÑOS EN DONDE SE OBSERVAN EL AUMENTO DE PUBLICACIONES DE CÁNCER CON RESPECTO CON OTRAS ENFERMEDADES. FUENTE: (RUIZ-TORRES ET AL., 2017).....	18
FIGURA 5.- PRINCIPALES OBJETIVOS MOLECULARES DE COMPUESTOS MARINOS QUE SE SABE MODULAN DIFERENTES CARACTERÍSTICAS O SELLOS DISTINTIVOS DEL CÁNCER. FUENTE: (ZONDER ET AL., 2001).....	21
FIGURA 6.- PD-L1 SE ENCUENTRA EN EL LOCUS 9P24.1 DEL CROMOSOMA 9 HUMANO; CONSTA DE 6 EXONES Y 5 INTRONES; EMPIEZA EN LA POSICIÓN 5,450,503 Y TERMINA 5,470,566. Y POSEE UN TAMAÑO DE 20,064 PB. FUENTE: STEVEN MERCHÁN.....	24
FIGURA 7.- pGEM-T ES UN PLÁSMIDO DE TRANSPORTE UTILIZADO PARA LA CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR, POSEE 3000 PB. FUENTE: GENEIOUS 8.7	26
FIGURA 8.- pCAGGS-EGFP PRESENTA 5 486 PB QUE ES UN PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN CONSTITUTIVA. CREADO EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS Y SECUENCIADO EXPRESA EGFP (GEN FLUORESCENTE). FUENTE: GENEIOUS 8.7	27
FIGURA 9.- pCAGGS-EGFP-AP1-PD-L1P PRESENTA 6077 PB QUE ES LA CONSTRUCCIÓN FINAL EN EL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN CONSTITUTIVA QUE EXPRESA EGFP (GEN FLUORESCENTE). FUENTE: GENEIOUS 8.7	27
FIGURA 10A.- LA REGIÓN DEL PROMOTOR PD-L1 FUE AMPLIFICADO POR PCR, EL MARCADOR ES DE 1 KB LADDER, A LA IZQUIERDA SE ENCUENTRAN LOS CONTROLES (C-) Y LAS MUESTRAS QUE ERAN 3.1A, 3.1B Y ECO07 BAJO DOS TEMPERATURAS 57 °C Y 59 °C.	30

FIGURA 11.- **A)** FRAGMENTO AP1 FUE AMPLIFICADO POR PCR, EL MARCADOR ES DE 1 KB LADDER, EL CONTROL (C-) Y LAS MUESTRAS QUE ERAN 3.1B Y EcoO7 BAJO DOS TEMPERATURAS 57 °C Y 59 °C. **B)** INTRÓN FRAGMENTO RECONSTITUIDO FUE AMPLIFICADO POR PCR, EL MARCADO ES DE 1 KB LADDER, LOS CONTROLES SE ENCUENTRAN A LA IZQUIERDA Y LAS MUESTRAS ERAN DE pCAGGS-EGFP BAJO TRES TEMPERATURAS DE 61 °C, 63 °C, 65 °C.31

FIGURA 12.- **A)** FRAGMENTO AP1 FUE AMPLIFICADO POR PCR EN LA COMPROBACIÓN DE LA COLONIA G, H, I, J, K, L; EL MARCADOR ES DE 1 KB LADDER, CONTROL NEGATIVO (C-), CONTROL POSITIVO(C+), DONDE SE OBSERVA QUE LAS COLONIAS J, K, L SON LAS QUE POSEÍAN EL INSERTO. **B)** FRAGMENTO INTRÓN FUE AMPLIFICADO POR PCR EN LA COMPROBACIÓN DE LA COLONIA P, Q, R, S, T, U; EL MARCADOR ES DE 1 KB LADDER, CONTROL NEGATIVO (C-), CONTROL POSITIVO(C+), DONDE TODAS POSEÍAN EL INSERTO.; **c)** FRAGMENTO PD-L1P FUE AMPLIFICADO POR PCR EN LA COMPROBACIÓN DE LA COLONIA 1,2; EL MARCADOR ES DE 1 KB LADDER, CONTROLES NEGATIVOS (C-), CONTROLE POSITIVOS(C+), DONDE EL INSERTO SOLO LA COLONIA 1.31

FIGURA 13.- **A)** FRAGMENTO AP1 FUE AMPLIFICADO POR PCR EN LA COMPROBACIÓN DE LA COLONIA A, B, C, D, E, F; EL MARCADOR ES DE 1 KB LADDER, DOS CONTROLES NEGATIVOS (C-), CONTROL DE EXTRACCIÓN (C.C), CONTROL POSITIVO(C+), DONDE SE OBSERVA QUE LAS COLONIAS D, E, F SON LAS QUE POSEÍAN EL INSERTO. **B)** EL TAMAÑO DEL FRAGMENTO AP1 ES DE 272 PB; **c)** INSERCIÓN DEL FRAGMENTO EN EL PLÁSMIDO. **FUENTE:** GENEIOUS V8.1.8.32

FIGURA 14.- **A)** FRAGMENTO PD-L1P+INTRÓN FUE AMPLIFICADO POR PCR EN LA COMPROBACIÓN DE LA COLONIA; EL MARCADOR ES DE 1 KB LADDER, DOS CONTROLES NEGATIVOS (C-), DONDE SE OBSERVA UNA BANDA 1170 PB QUE SE APROXIMA QUE TIENE EL INSERTO. **B)** EL TAMAÑO DEL FRAGMENTO PD-L1P + INTRÓN ES DE 1173 PB; **c)** INSERCIÓN DEL FRAGMENTO EN EL PLÁSMIDO, **FUENTE:** GENEIOUS V8.1.8.33

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.- LISTA DE MEDICAMENTOS ANTICANCEROSOS MARINOS APROBADOS POR LA FDA Y LA EMEA DE UNA FUENTE DE INVERTEBRADOS. FUENTE: AUTORES.	19
TABLA 2.- PLATAFORMAS DE INFORMACIÓN Y SECUENCIAS DE ONCOGENES. FUENTE: STEVEN MERCHÁN.	23
TABLA 3.- PROGRAMAS BIOINFORMÁTICOS UTILIZADOS. FUENTE: STEVEN MERCHÁN.	24
TABLA 4.- LISTA DE INICIADORES DE PUBLICACIONES QUE FUERON EXAMINADAS ENTRE 2016 – 2018 FUENTE: STEVEN MERCHÁN((GARCIA-DIAZ ET AL., 2017)(JIANG ET AL., 2018) (TAO ET AL., 2017)(LI ET AL., 2016))	25
TABLA 5.- MATERIALES PARA LA REALIZACIÓN DE LA DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO PCAGGS-EGFP	28
TABLA 6.- MATERIALES PARA LA REALIZACIÓN DE LA DIGESTIÓN DEL PLÁSMIDO PCAGGS-EGFP-AP1	28
TABLA 7.- MATERIALES PARA LA REALIZACIÓN DE LA LIGACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE PD-L1, CON EL INTRÓN Y PCAGGS-EGFP-AP1.....	29

CAPÍTULO 1

1.1 Introducción

El cáncer es la enfermedad no-transmisible de mayor importancia en el mundo y que tiene un mayor impacto en los países de bajos a medios ingresos económicos (Ginsburg et al., 2012). Las estadísticas afirman que es una de las principales causas de muerte en el mundo, con aproximadamente 8,2 millones de casos fatales al año y 14,1 millones de nuevos casos anualmente entre niños y adultos (Globocan, 2012). En Ecuador, de las 30 razones principales de muerte, un tercio son por tumores malignos, de los cuáles el cáncer de estómago es el de mayor incidencia (Organización Mundial de la Salud, 2014). Los otros tipos de cáncer más comunes en el país, entre el 2011 y el 2013, en orden descendente fueron el carcinoma de mama, tiroides, próstata, cérvico uterino y de piel (SOLCA, 2017).

Los tratamientos contra cáncer más usados son la intervención quirúrgica, en donde se extrae los tumores primarios, acompañado de la quimioterapia y la radioterapia para destruir las células cancerígenas residuales. Esto genera un amplio número de efectos secundarios agresivos en los pacientes (“OMS-Tratamiento del cáncer,” 2012). A nivel mundial, la investigación de tratamientos para combatir la proliferación del ambiente tumoral ha dado grandes resultados, generando terapias más direccionadas y específicas según cada tipo de cáncer (National Cancer Institute, 2017b). Sin embargo, Ecuador los avances de inmunoterapia o medicina de precisión aún no están al alcance de los pacientes, incluso los tratamientos ya existentes son abandonados por falta de presupuesto económico (Bravo, 2017). Además, la investigación sobre esta enfermedad en el país está más centrada en las partes epidemiológica, preventiva y de mortalidad. En la actualidad, el mayor avance ha sido la creación del Registro Nacional de Tumores (RNT), que recolecta información sobre la distribución de la variedad de tumores según variables demográficas a nivel hospitalario (Pacheco Ojeda, 2017).

Los últimos avances en la investigación científica de nuevas moléculas con potenciales aplicaciones contra el cáncer se han centrado en la fauna marina (G. P. Hu et al., 2011). Los compuestos secundarios que producen los invertebrados marinos, como respuesta a las condiciones competitivas de su ambiente, han sido estudiados por sus posibles aplicaciones farmacológicas, y una gran variedad de compuestos bioactivos o productos naturales marinos (MNPs) ya se utilizan como drogas antineoplásicas (Ruiz-Torres et al., 2017). Las drogas antineoplásicas son aquellos medicamentos anticancerosos que actúan en cualquier fase del ciclo celular o en la regulación de la proliferación tumoral,

inhibiendo el crecimiento de las células cancerígenas e inclusive destruyéndolas (M. Ángeles Gómez del Rio y Benedí, 2006).

Ecuador, es considerado como uno de los países más megadiversos por su riqueza y variedad de especies por unidad de metro cuadrado (Ministerio de Turismo, 2014). La fauna y flora a nivel terrestre se encuentra mayormente caracterizada en comparación con la acuática, pero en la actualidad se está realizando la caracterización de la biodiversidad de invertebrados marinos (Triviño, Miguel; Cardenas, 2014). El Centro Nacional de Investigación Marina (CENAIM), está realizando el levantamiento de la biodiversidad faunística de la Reserva Marina El Pelado (REMAPE), con el propósito de generar información de los invertebrados más abundantes y de interés con respecto a su taxonomía, metagenómica, metaboloma y bioactividad de sus compuestos (CENAIM, 2017). Esta investigación ofrece una oportunidad para identificar procesos o compuestos con aplicaciones biotecnológicas, entre ellas la posible identificación de moléculas con actividad anticancerígena o antitumoral (CENAIM, 2017).

El conocimiento científico que se está generando de la biodiversidad de invertebrados marinos ecuatorianos y, en especial, la generación diversos extractos con potenciales aplicaciones farmacológicas, crea la necesidad de desarrollar una plataforma de tamizaje de dichos extractos de acuerdo con sus posibles aplicaciones en salud humana o animal. En el caso de compuestos anti-cancerosos o anti-neoplásicos, se requiere una plataforma de tamizaje inteligente o específica de compuestos que bloqueen los diferentes genes o pasos bioquímicos asociados a la proliferación de los diferentes tipos de cáncer.

El presente trabajo tiene como objetivo la construcción de un sistema reportero fluorescente, como herramienta para la evaluación de compuestos bioactivos extraídos de porífero, para bloquear la transcripción del gen asociado al cáncer Ligando de la Muerte Programada 1 (PD-L1). El PD-L1 se estableció como gen diana para la construcción del sistema reportero fluorescente por su relación con la mayoría de los cánceres agresivos, como el cáncer de mama y pulmonar, e inclusive ha sido un gen de interés en la medicina de precisión e inmunoterapia.

1.1.1 Descripción del Problema

Los países en desarrollo, son donde se da el 57% de los casos de cáncer (Globocan, 2012), y a su vez donde el 99% de las personas mueren sin ser tratadas (Worldcancerday.org, 2012). En el año 2017 se estimó que apenas el 26 % de los países de recursos limitados tenían los medios necesarios para atender patologías de sus ciudadanos, y menos de un 30% poseen los requerimientos necesarios para tratar pacientes con cáncer (Plummer et al., 2016). Las estadísticas muestran que 1 de cada 5 países en vías de desarrollo, tienen la capacidad de impulsar investigación para generar políticas preventivas contra el cáncer (Organización Mundial de la Salud, 2014).

En el año 2012, el Ecuador reportó 13,844 casos de cáncer, con una fatalidad del 93,1% (Ferlay et al., 2015). Los porcentajes de pacientes con cáncer está en constante crecimiento y los tratamientos son más costosos y de difícil acceso (Bravo, 2017). Además, Las investigaciones en el campo de la inmunología y de la oncológica no están ampliamente desarrollados.

Por otro lado, la toxicidad y los efectos secundarios que generan los tratamientos existentes exigen la búsqueda de tratamientos más efectivos, con menos síntomas adversos y que sean económicamente accesible para la población. Los compuestos bioactivos extraídos de invertebrados de la biodiversidad ecuatoriana ofrecen una alternativa local que puede competir con los compuestos importados con alto costo para el sistema de salud del Ecuador.

Por esta razón se genera la necesidad de encontrar una forma rápida, eficiente y de bajo costo para realizar un tamizaje de compuestos que puedan tener actividad antineoplásica y con el que se pueda evaluar distintos genes estrechamente relacionados con el cáncer.

1.1.2 Justificación

El ecosistema marino es una fuente de compuestos bioactivos con estructuras químicas diversificadas, con un gran potencial para usarse en la industria farmacéutica (Ruiz-Torres et al., 2017). La aplicación de tecnologías de prospección marina, en conjunto con el desarrollo de nuevas tecnologías analíticas, han centrado su interés en MNPs (G. P. Hu et al., 2011).

La generación de un sistema reportero específico para la evaluación *in vitro* de posibles compuestos antineoplásicos ofrece una herramienta fundamental para el tamizaje de estos compuestos en forma rápida, específica y en forma masiva. También podría ser usado con diferentes genes diana, según la investigación que se plantee.

El sistema propuesto va encaminado a identificar metabolitos que interfieran específicamente con mecanismos celulares que promueven la formación del microambiente tumoral y evitan la acción del sistema inmune del huésped para la eliminación de las células tumorales.

La implementación del sistema reportero podría llevar a la identificación de metabolitos con actividad neoplásica específica, atractivos para la inversión extranjera, pero con un nivel de caracterización farmacológica adecuado para su licenciamiento. Es decir, el Ecuador podría explotar sustentablemente su biodiversidad marina y no ser solo proveedor de materia primaria con limitado valor agregado. Además, se creará la plataforma farmacológica que permita desarrollar ensayos preclínicos y clínicos para una mayor independencia de medicamentos importados para asegurar la salud de los ecuatorianos.

1.1.3 Objetivos

1.1.3.1 Objetivo General

- ❖ Construir un sistema reportero con un gen fluorescente para la evaluación de compuestos bioactivos de la biodiversidad ecuatoriana, visualizando la inhibición del promotor del gen asociado al cáncer "*Program Death Ligand 1*".

1.1.3.1 Objetivo Específico

- ❖ Diseñar el sistema reportero del gen PD-L1 humano mediante la fusión de su promotor y el gen reportero fluorescente eGFP.
- ❖ Ensamblaje del sistema reportero en un plásmido de expresión.

1.2 Marco Teórico

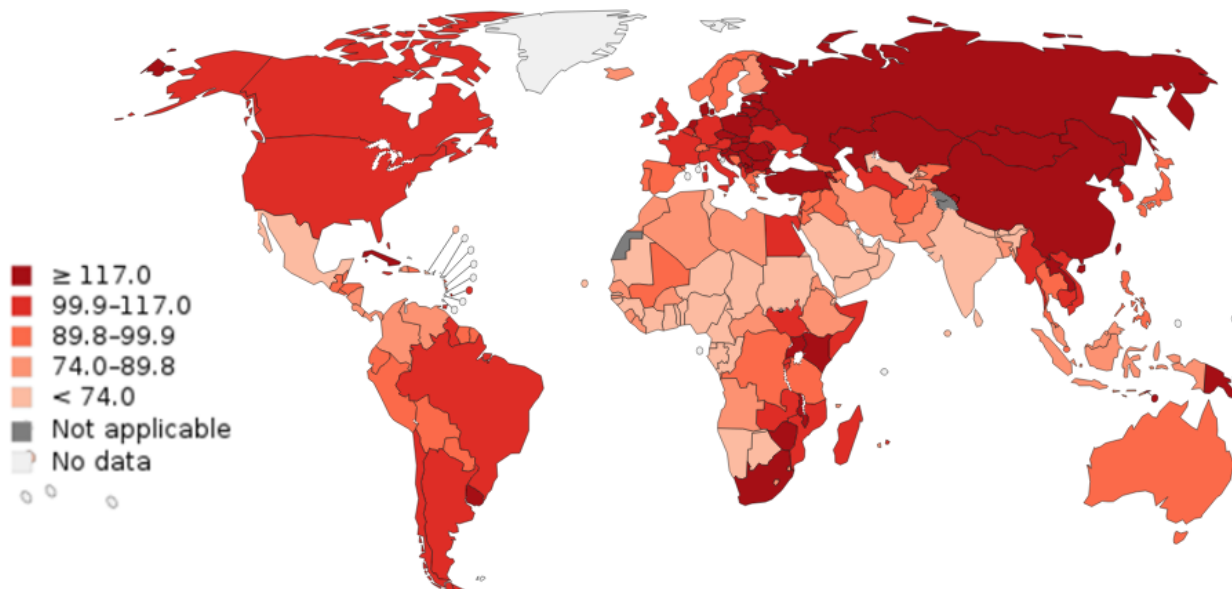
1.2.1 Cáncer

1.2.1.1 Definición, características y tipos

El cáncer es un término que abarca todas las enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células que tienen un crecimiento y división sin control en cualquier parte del cuerpo (Dr. Javier Puente & Dr. Guillermo de Velasco, 2017). El problema con estas células anormales es que no siguen la muerte programada que toda unidad celular tiene, sino que se divide sin límites, convirtiéndose en inmortales.

La acumulación de estas células cancerígenas desemboca en el desarrollo de una masa llamada tumor o neoplasia, que podría llegar a sustituir o a destruir los tejidos sanos, los que se conocen como tumores malignos, o aquellos con una tasa de crecimiento muy baja y que no afectan a los tejidos circundantes, que se conocen como benignos (Dr. Javier Puente & Dr. Guillermo de Velasco, 2017).

Las células tumorales pueden viajar e invadir cualquier tejido, sin importar la distancia, en los cuales al encontrar nichos perfectos terminan originando metástasis, que es cuando el cáncer se ha distribuido por todo el organismo (Mitrus I, Bryndza E, Sochanik A, 2012).



All rights reserved. The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization / International Agency for Research on Cancer concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate borderlines for which there may not yet be full agreement.

Data source: GLOBOCAN 2012
Map production: IARC (<http://gco.iarc.fr/today>)
World Health Organization

 World Health Organization
© International Agency for Research on Cancer 2018

Figura 1.- Mapa Mundial con las tasas de Mortalidad provocada por cualquier tipo de cáncer en ambos sexos a excepción de cáncer de piel en el 2012. **Fuente:** (Ferlay et al., 2015)

Las estadísticas mundiales establecen al cáncer como un de las principales causas de muerte. En el 2012, según la información analizada por la “World Health Organization”, de los 13 mil casos detectados en el Ecuador, 93,1% murió, y la tasa a nivel mundial es que por cada 100.000 personas enfermas el 94% de los casos muere.

En Europa, los diagnósticos previos y el tratar a los pacientes antes que el cáncer este en fases terminales ha permitido que disminuya la mortalidad a pesar de que la probabilidad de desarrollarlo haya aumentado (Catherine Sánchez, 2013). Sin embargo, en Ecuador los métodos de diagnóstico no están tan desarrollados, y muchos de los casos detectados están en fases avanzadas o incluso ya en metástasis.

1.2.1.2 Tipos de Cáncer

Existen gran variedad de tipos de cáncer, como el linfoma, tiroides, hueso, entre muchos más. Cada uno de ellos afecta hombres o mujeres sin importar la edad, pero en los que se relacionan a niños son provocados principalmente por mutaciones durante el desarrollo embrionario, mientras que, en los adultos, se producen más por el estilo de vida y riesgo ambiental.

Los tipos de cáncer que más comunes y que más muertes producen son a nivel mundial cáncer de colon y recto, de pulmón, próstata, seno, cérvico uterino, melanoma y tiroides. Para ser considerados como los más comunes deben superar los 40.000 casos cada año (Siegel, Miller, & Jemal, 2017).

Según la “World Health Organization” (WHO) el mayor número muertes provocadas por cáncer en el Ecuador son producto del cáncer de estómago y el cáncer cérvico uterino (Antoni, Soerjomataram, Møller, Bray, & Ferlay, 2016). Sin embargo, por incidencia de cáncer, el de próstata también encabeza uno de los principales lugares.

1.2.1.3 Causas del Cáncer

El cáncer es el resultado de mutaciones que se han generado en la secuencia del ADN de las células cancerígenas (Stratton, Campbell, & Futreal, 2009). Las razones que provoca estas mutaciones son muy variadas, van desde exposiciones diarias a compuestos químicos tóxicos hasta contraerla por herencia.

El cáncer por exposición a químicos fue identificado desde el año 1775, sin embargo pasaron 150 años para que realmente se descubriera que muchos trabajadores adquirirían la enfermedad por las dosis de químicos, como el arsénico, benceno o cadmio, a los que eran expuestos día a día (Paolo Boffetta et al., 2000). En los países en desarrollo no hay estadísticas fiables sobre al grado de exposición que tienen los empleados en sus jornadas laborales, pero se conoce a nivel mundial que del 2 al 8%

de los cánceres están ligados al tipo de trabajo que se tiene (Paolo Boffetta et al., 2000). Además, la bioseguridad que debe haber en los diferentes laboratorios, hospitales, entre otros, también es deficiente.

Por otro lado, no son sólo químicos los causantes, sino también rayos UV, rayos X, medicina, el estilo de vida de las personas y diferentes factores ambientales a los que se exponga la persona. El estilo de vida de la persona ha sido el causante de la mayoría de los casos en los adultos. El no alimentarse adecuadamente o con altos contenido en grasa, el consumo excesivo de alcohol y tabaco, la falta de chequeos médicos y preventivos, promueven que ciertos tipos de cáncer se desarrollen (Dr. Javier Puente & Dr. Guillermo de Velasco, 2017).

Por otro lado, el cáncer ha llegado a ser una enfermedad que no importa la condición física y el estado de salud de la persona, ni cuánto se cuide, si tiene en sus genes alguna mutación que reciba un estímulo para su expresión, provocarían el crecimiento acelerado de las células cancerígenas. Es el caso de ciertos tipos de cáncer que se convierten en hereditarios (Dr. Javier Puente & Dr. Guillermo de Velasco, 2017), donde sus mutaciones se transmiten de generación a generación, y pueden llegar a desarrollar la enfermedad muchas generaciones futuras según el estilo de vida que lleve la persona.

1.2.1.4 Biología del Cáncer

El microambiente tumoral, se define como el conjunto de “células normales, moléculas y vasos sanguíneos que alimentan un tumor” (National Cancer Institute, n.d.). El crecimiento y la diseminación del tumor, está condicionado a este microambiente, pero también puede modificarse según las necesidades de las células cancerígenas.

En los últimos años, se ha venido estudiando un nuevo enfoque para entender el desarrollo del cáncer y la razón de que sea difícil encontrar un método efectivo para contrarrestarlo. Este nuevo análisis ya no considera al tumor como células anormales aisladas, sino como un microcosmo que se transforma según un proceso ecológico y evolutivo.

Las células cancerígenas evolucionan como lo haría cualquier individuo en su ambiente, por medio de la selección natural. Las tres condiciones que se requiere para que haya selección natural son una diversidad genética en la población, que estas variantes sean heredables, y que favorezcan la supervivencia de los descendientes que posean dicha característica. Las células presentes en los tumores tienen diferentes mutaciones haciendo que haya variabilidad genética, al dividirse permite que estas características se pasen a sus clones, y, por último, estas mutaciones que poseen les dan ventajas sobre las células sanas, tales como evitar la muerte programada, el aumento del tamaño

de los vasos sanguíneos que las alimenten, la evasión del sistema inmune, entre otras. (Merlo, Pepper, Reid, & Maley, 2006)

La evolución que sufren las células de los tumores les permiten tener respuestas adaptativas que las hace ser más resistentes a las quimioterapias, o a los otros tratamientos médicos (The Wistar Institute, 2006). Por esta razón, si una de las células cancerígenas residuales que queda luego de una intervención quirúrgica, o algunas de las que son sometidas a quimioterapia tienen una mutación que las hace ser más aptas, la terapia aplicada no tendría efecto alguno. Por ejemplo, se ha descubierto ciertos clones en el cáncer de pulmón que tienen mutaciones puntuales en el Factor de Crecimiento epidérmico (EGFR) que los hace resistentes a los inhibidores de EGFR (Merlo et al., 2006). Desde este otro punto de vista, las distintas terapias también estarían generando una selección artificial.

Por otro lado, las relaciones intraespecíficas de mutualismo, competencia y parasitismo también se observan en las células cancerígenas. El mutualismo se da en la diseminación a otras partes del cuerpo, o cuando las células tumorales dividen sus funciones para generar una respuesta en el microambiente que requieran a parte de ellas mientras las otras guardan energía para otros procesos. La competencia cuando luchan por recursos con las demás células, y el parasitismo en la formación de vasos sanguíneos nuevos para nutrir el tumor, proceso que se conoce como angiogénesis.

Todo esto se observa en el microambiente tumoral, y el comprender la biología del cáncer, explicaría porque las terapias comunes usadas para el cáncer no son tan efectivas, y la necesidad de la búsqueda de compuestos bioactivos que intervengan en las células cancerígenas y su interacción con el microambiente de manera más específica, para mejorar las estrategias de prevención y de terapias de los pacientes.

1.2.1.5 Tratamientos contra El cáncer: costos, toxicidad y éxito

Los tratamientos y avances que hay hasta la actualidad contra el cáncer no están disponibles para todos los pacientes porque implican un alto valor económico. Además, todas las terapias generan efectos secundarios sobre los pacientes, los cuales son muy dolorosos o insoportables. Los tratamientos que se usan son la intervención quirúrgica, la quimioterapia, la radioterapia, la medicina de precisión, terapias hormonales, trasplante de células madres y la inmunoterapia (National Cancer Institute, 2017). La aplicación de cada uno de ellos depende del tipo de cáncer y la fase en la que se encuentre el paciente.

La intervención quirúrgica es la primera que se utiliza en un paciente cuando recién se detecta el tumor. Se extrae toda la neoplasia, aunque pueden quedar células residuales

que pueden volver a originarlo por lo que este tratamiento siempre se utiliza al mismo tiempo que la quimioterapia o a la radioterapia.

La quimioterapia utiliza medicamentos administrados por vía intravenosa u oral para destruir toda célula cancerígena o ralentizar el crecimiento del tumor. Se puede aplicar tanto antes de la intervención quirúrgica o de la radioterapia, como después, incluso en el cáncer recurrente, en cáncer de sangre o en la metástasis. Este tratamiento no es específico, influyen en todas las células activas, y aunque son las células tumorales las que están en mayor densidad por su rápida diseminación y son a quienes principalmente atacaría, también pueden afectar a células sanas cercanas al tumor (American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2018) . Por esta razón se generan efectos secundarios como fatiga, dolor de cabeza, muscular o estomacal, afecciones al pulmón, al corazón u a otro órgano, la pérdida de cabello y de apetito, entre otros síntomas que pueden acompañar al paciente por todo el tratamiento, incluso después (ASCO, 2017a).

La radioterapia es un tratamiento que utiliza dosis altas de radiación para reducir el tamaño de los tumores destruyendo células cancerígenas (National Cancer Institute, 2017). Su eficacia para hacerlo es muy alta, por lo que es uno de los tratamientos comúnmente usados, pero también puede lacerar células sanas circundantes. Tiene varios efectos secundarios parecidos al de la quimioterapia, como cansancio, problemas cutáneos, llagas, náuseas y vómitos, recuentos sanguíneos bajos, pérdida de apetito, y una muy baja probabilidad de que se genere un nuevo cáncer (American Cancer Society, 2017)(ASCO, 2016).

La terapia hormonal o terapia endócrina es un tratamiento que utiliza hormonas de crecimiento para ralentizar o detener el desarrollo del cáncer, especialmente para cáncer de próstata y de mama (National Cancer Institute, 2015). Se lo usa como adyuvante en conjunto con los otros tratamientos, y para reducir los síntomas o evitarlos. Los efectos secundarios varían según el fármaco utilizado, algunos de ellos como el tamoxifeno, puede llegar a producir cáncer de endometrio o de útero. Los otros efectos son la formación de coágulos, apoplejía, disminución de masa ósea, dolor en las articulaciones, riesgo de ataque cardíaco y más (Kohler et al., 2015).

El trasplante de células madres es una terapia que se usa debido a las altas dosis de quimioterapia o de radioterapia que reciben los pacientes. Estas altas dosis dañan o pueden destruir la médula ósea, quedando incapaz el paciente de producir los glóbulos sanguíneos: rojos, blancos o plaquetas. Debido a esto, se requiere un trasplante de médula ósea o de células madre de sangre periférica, que puede provenir del mismo paciente, de gemelos idénticos, o de algún familiar o persona no emparentada. Este

tratamiento principalmente se usa para la leucemia o el linfoma, pero requiere una comprobación de la compatibilidad del donante con las células del paciente, con el fin de disminuir efectos secundarios. Los efectos que se puede originar son la fatiga, vómito, falta de apetito, hemorragias, la necesidad de transfusiones sanguíneas o la enfermedad del injerto, cuando el sistema inmune reconoce las células trasplantadas como extrañas y las atacan, (American Cancer Society, n.d.). Este tratamiento es uno de los más caros, debido a lo complicado del proceso, pero los avances terapéuticos permiten estancias en el hospital más cortas bajando el precio, pero no significativamente (National Cancer Institute, 2013).

La inmunoterapia engloba varias terapias que se relacionan con utilizar al sistema inmune para combatir las células cancerígenas. En este tipo de tratamiento estimula las defensas propias del cuerpo sea con sus propias sustancias o fabricadas en laboratorio permitiendo detener el crecimiento de los tumores, evitando su diseminación al resto del cuerpo o ayudando a que las células inmunitarias logren reconocer a las células tumorales como foráneas. Entre las principales inmunoterapias se encuentran los anticuerpos monoclonales, terapia con virus oncolíticos, con células T, vacunas contra el cáncer y la inmunoterapia no específica con interferones e interleucinas (Leukemia & Lymphoma Society, 2015). Las ventajas de estos tratamientos es que son más específicos para el tumor, y que actúan bloqueando los puntos de control inmunitario, como el PD1-PDL1 o la CTLA-4, o atacando proteínas específicas de las células cancerígenas, como en el caso de los anticuerpos monoclonales. Los virus oncolíticos son infectados directamente sobre los tumores para que se repliquen y provoquen la lisis de sólo las células tumorales, incluso generando anticuerpos que permiten el reconocimiento por parte del sistema inmune (ASCO, 2017b). Sin embargo, también presentan efectos secundarios leves y graves. Dentro de los leves, es la fatiga, síntomas de gripe, fiebre y escalofríos, mientras que en los graves pueden llegar a inflamar hígado, cerebro, corazón, colón, o presentar problemas hormonales. Por esta razón, las terapias inmunes no pueden ser aplicadas a todos los pacientes, y está en investigación a qué tipo de pacientes no les causa efectos secundarios, y a quienes les podría causar efectos graves (Laura Porter-ASCO, 2018).

La medicina de precisión o terapia dirigida está entre uno de los nuevos tratamientos aplicados y al igual que la inmunoterapia es específica porque se hace según las características genómicas y moleculares del tumor de cada paciente, además de sus hábitos y su historial clínico. Este tipo de tratamiento se puede dar debido al conocimiento de las mutaciones genéticas que permiten el desarrollo de los tumores y metástasis, el encontrar fármacos que actúen específicamente a nivel de esas

alteraciones y al análisis de toda la información del paciente. La medicina de precisión sólo se ha aplicado en países desarrollados, pues necesitan una gran base de datos confidencial, y un presupuesto alto para investigación. Las terapias dirigidas utilizan anticuerpos monoclonales o moléculas pequeñas (Sociedad Española de Oncología Médica(SEOM), 2018). Entre las ventajas que ofrece, están que los medicamentos son específicos para los blancos del tumor del paciente, permite que el sistema inmune destruya estas células, impide que haya la angiogénesis, puede causar la apoptosis de las células cancerígenas, y evitar que el microambiente tumoral siga alimentando el tumor. Sin embargo, también tiene desventajas como la evolución de las células cancerígenas haciéndose resistentes a los medicamentos, blancos que no tengan fármacos o compuestos bioactivos específicos para ellos, o blancos que se compartan con otras células del cuerpo, y efectos secundarios como problemas en la piel, de coagulación de la sangre, cicatrización de heridas, diarrea, presión arterial alta, entre otras (National Cancer Institute, 2014).

Para los pacientes tener cáncer no es lo único que les preocupa. Sin considerar los efectos secundarios y la toxicidad de las terapias que pueden presentarse a lo largo del tratamiento, y permanecer desde días hasta años, el precio para acceder a estas terapias, son mucho más preocupantes. En los países desarrollados, los gobiernos y distintas asociaciones y organizaciones clínicas y de investigación invierten para poder mejorar las condiciones de vida de los pacientes que tienen la enfermedad. Sin embargo, en los países en desarrollo, o con un subdesarrollo oncológico, es donde más personas con algún tipo de cáncer hay. Estadísticamente, la mitad de los casos, el 57%, ocurre en los países en desarrollo, y en donde el 99% de las muertes sin tratamiento y dolorosas se dan (Valeria Perasso, 2016). Los costos de las terapias son tan altos, que la medicina de precisión, y la inmunoterapia son tratamientos que no existen, y en que la quimioterapia y la radioterapia son muy caras para continuarlas (Bravo, 2017).

En el Ecuador, la quimioterapia y la radioterapia son las terapias más utilizadas, a las cuáles no todos los pacientes tienen acceso. Estos tratamientos sólo pueden recibirse en las dos ciudades principales. En el 2016, se abrió la primera sala de terapia biológica en el país, pero no existe información pública de cuántas personas tratan al año, ni del porcentaje de éxito tenido (Redaccion Médica, 2016). Los valores para este tratamiento son de \$8000 por paciente.

1.2.2 Ligando de la Muerte Celular Programada (PD-L1)

1.2.2.1 Definición y Función

El PD-L1 o ligando de la muerte celular programada tipo I es una proteína transmembranal presente en las células linfoides, mieloides, en las células presentadoras de antígenos, en islotes pancreáticos y del útero. La proteína de PD-L1 pertenece a la familia de los receptores B7 y es codificada por el gen CD274, que se encuentra en el cromosoma 9, y posee un tamaño total de 20,064 pb, con 6 exones (Jiang et al., 2018).

Tiene como función principal interactuar con el receptor de la muerte programada (PD1) de las células T y de ese modo inhibir la señal apoptótica (Lee et al., 2006). PD1 está encargado en la regulación de la activación de linfocitos, y de la inflamación de los tejidos en la respuesta inmune. La interacción de PD1 con su ligando PD-L1, activan las células T pero también pueden inhibir su actividad al dejarlas exhaustas.

En células que están en etapa de senescencia celular, la expresión de este ligando PDL1 disminuye, lo que produce que las células T induzcan a esta célula a la apoptosis. Este ligando con su receptor está muy relacionado con la regulación del sistema inmune, evita que haya una respuesta contra células propias del organismo, y son uno de los mecanismos a través del cual, las células T reconocen que pertenece al cuerpo y que no.

La expresión de PD-L1 puede darse constitutivamente o de forma inducida. Constitutivamente está expresado en las células presentadoras de antígenos (APC) como los macrófagos y las células dendríticas. Es inducida su expresión en ciertos tipos celulares como respuesta a las citoquinas que promueven la inflamación. Estos pueden ser las epiteliales y endoteliales, linfocitos T, células B y monocitos (Dong et al., 2002). Sin embargo, el PD-L1 no sólo está presente en estas células, sino en ciertas células cancerígenas, engañando al sistema inmune y evitando que se genere una respuesta inmunitaria contra ellas (Figura 2 y 3).

1.2.2.2 PD-L1 y el microambiente tumoral

El cáncer tiene una gran variedad de formas de crear el ambiente tumoral como la señalización proliferativa sostenida, el evitar la apoptosis, las mutaciones, la activación de invasión y metástasis, la evasión del sistema inmune, entre otras (Catherine Sánchez, 2013). Además, son una gran variedad de genes que se ven involucrados tanto a nivel de transcripción (genético) como traducción (proteico). El microambiente tumoral es un tejido complejo formado por todas las células, cancerígenas y sanas, por

vasos sanguíneos y moléculas como proteasas, citoquinas, factores de crecimiento que interactúan con el tumor.

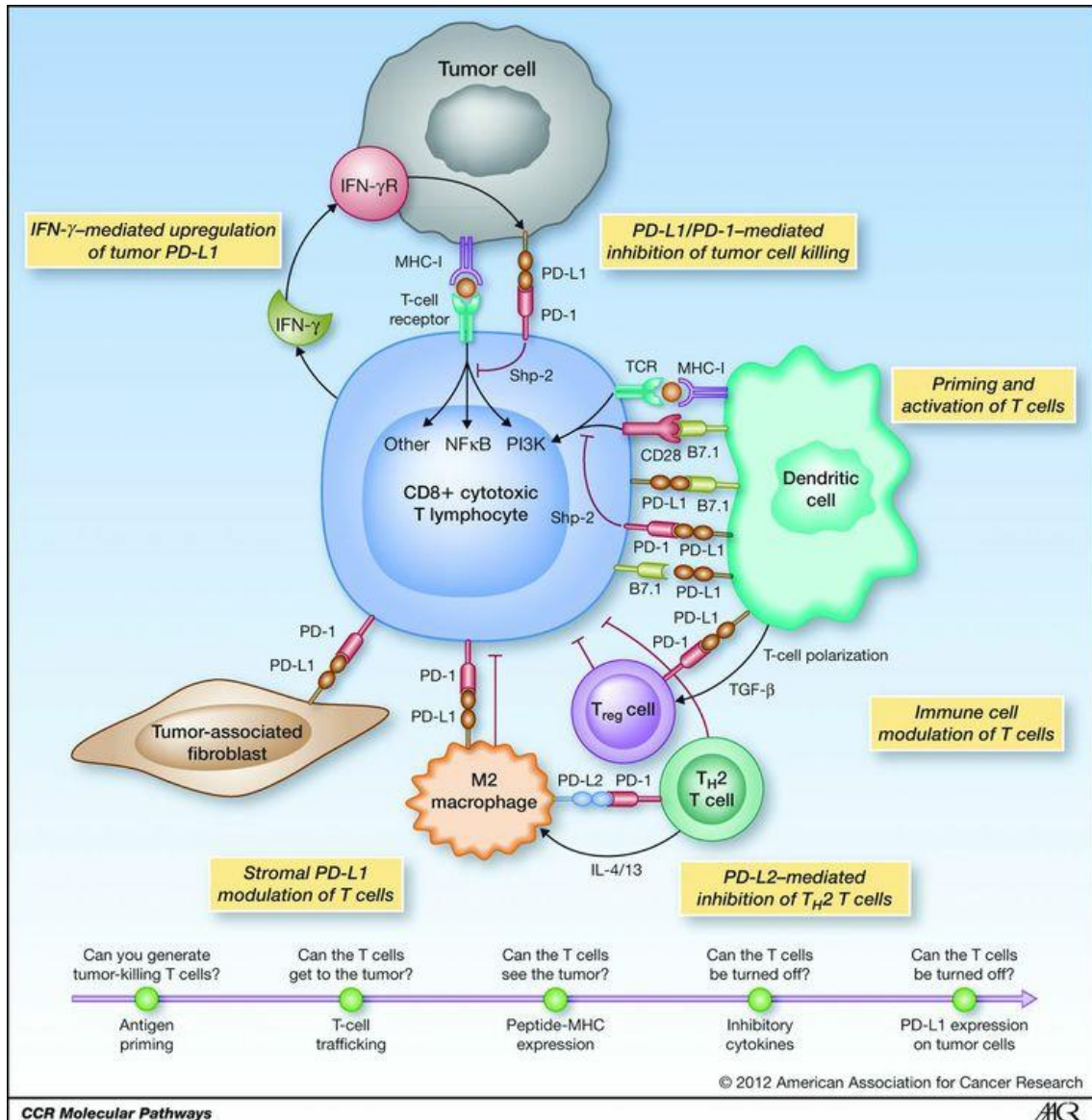


Figura 2.- Interacción de las células inmunitarias y tumorales con la célula T citotóxica a través del ligando PD-L1. Se observa la respuesta inmune adaptativa generada por la secreción de Interferón Gamma. **Fuente:** (Research, 2012) citado en (Abyntek Biopharma, 2017)

Las investigaciones sobre este ligando lograron detectar que tiene una estrecha relación con los microambientes tumorales. Se ha encontrado esta amplia expresión de PD-L1 en diversos tejidos cancerosos humanos. Estudios previos han correlacionado este ligando en un 60% con la formación de tumores primarios y en un 45% con diferentes cánceres en etapas avanzadas. Las células cancerígenas con el fin de evadir al sistema

inmune expresan o sobre expresan PDL1, y las células T las reconocen como células propias del organismo, permitiendo su reproducción celular y la posterior creación de ambientes tumorales (He, Hu, Hu, & Li, 2015). Esto se ha encontrado en el cáncer de diferentes orígenes como las células pulmonares, cáncer de estómago, cáncer de ovario, entre otros.

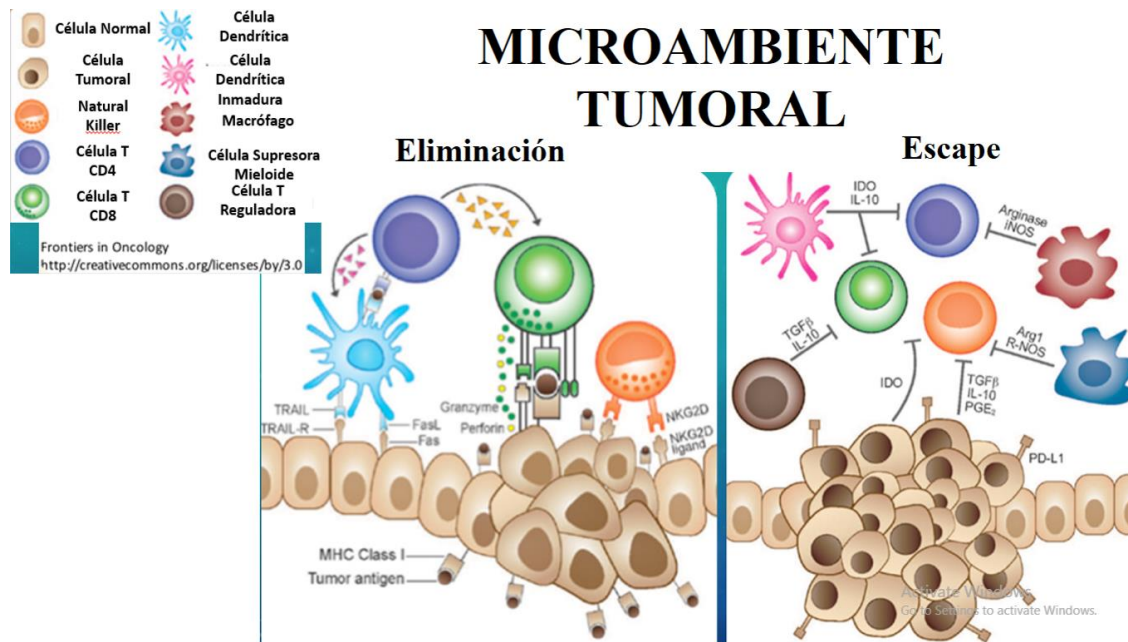


Figura 3.- Mecanismo de evasión de la célula tumoral de la respuesta inmunitaria usando PD-L1. **Fuente:** (Triplett et al., 2018)

La sobre expresión de PDL1 en estas células se genera por dos factores: el primero es la respuesta inmunitaria adaptativa, en la cual las mismas células T al segregar interferón gamma, promueven la generación de factores de transcripción que promoverán la expresión del ligando (Figura 2) (Garcia-Diaz et al., 2017), y el segundo es la sobreexpresión que es impulsada por los oncogenes, a través de factores de transcripción, que promueve que PDL1 esté de forma constitutiva en las células cancerígenas (Lee et al., 2006)(Hsu et al., 2018).

PDL1 en la actualidad es uno de los objetivos para la generación naciente de herramientas contra el cáncer como lo es la inmunoterapia ya que la inhibición del promotor PD-L1 podría hacer más eficiente la identificación por parte del sistema inmune antitumoral (Prosser, Brown, Shami, Forman, & Jensen, 2012).

1.2.2.3 Mutaciones en el Gen y el Promotor PD-L1

El tumor tiene una inestabilidad genética que lo hace ser más propenso a mutaciones, que les permiten desarrollar múltiples formas de evitar el sistema inmune o de desarrollar el microambiente tumoral. Una de ellas es la respuesta inmune adaptativa que poseen ciertas células cancerígenas en varios tipos de cáncer y que las llevan a expresar o a sobre expresar PD-L1. Esta respuesta inmune adaptativa (RIA) permite que cuando empieza la respuesta por parte de células inmunitarias contra las células tumorales se genere interferón gamma para que mande las señales a las células T citotóxicas. Sin embargo, esta señal no sólo beneficia al sistema inmune, sino que las células con esta adaptación, empiezan a expresar la proteína del ligando de la muerte programada tipo I, y así evitar ser destruidas (He et al., 2015). La sobreexpresión de PD-L1 no tiene sólo como objetivo evitar ser destruidas, sino también lo utilizan para agotar al sistema inmune e inducir a la muerte a las células T.

En el ORF del gen hasta la actualidad se han encontrado 78 mutaciones según las bases sobre estudios de cáncer COSMIS. Es por eso por lo que la investigación actual apunta hacia los factores de Transcripción de esta sobreexpresión y hacia la inhibición del promotor.

1.2.2.4 Inmunoterapia: Dirigida a PDL1

Las investigaciones se han direccionado a descubrir compuestos que bloqueen al receptor PD1 o al ligando PDL1 para evitar su interacción, los cuales han tenido éxito disminuyendo los microambientes tumorales, pero en muchos casos teniendo una variedad de efectos secundarios. Se ha comprobado que bloquear PD1 permite que PD-L1 siga interactuando con el receptor B7.1, pero bloquear a PD-L1 impide que las células tumorales interactúen con las células T (Kythreotou, Siddique, Mauri, Bower, & Pinato, 2018). Por eso los fármacos que bloquean a PD1 tienen efectos diferentes a los que bloquean a PDL1.

En la actualidad, existen ya fármacos aprobados por la FDA como la Atezolizumab, que es un anti-PD-L1 e Pembrolizumab, Nivolumab, que son anti-PD-1. Estos compuestos son anticuerpos monoclonales que bloquean la interacción del receptor con su ligando (Abyntek Biopharma, 2017) (Hamanishi et al., 2016). Otro compuesto que está en investigación es la Fluradabina de fosfato que inhibe a PD-L1 a nivel de promotor.

1.2.3 Compuestos Bioactivos

1.2.3.1 Cáncer y Compuestos Bioactivos Marinos

Recientemente se han logrado varios avances en cuanto a los procedimientos quirúrgicos, radioterapia y ciertos agentes quimioterapéuticos. E Incluido el caso de la combinación de terapia hormonal con inmunoterapia.

Lo que debemos tomar en cuenta en el tratamiento del cáncer es que un tumor primario es denominado como una población pequeña heterogénea de células múltiples. Otro punto importante que hay tener en cuenta es el desarrollo de genotipos resistentes que incluyen resistencia citotóxica a compuestos anticancerosos y/o resistencia a estímulos pro-apoptóticos; es decir que primero esta población aparece como un conjunto de individuos iguales debido a que parten de una célula madre cancerosa pero a medida que avanza el tiempo este grupo de células que van apareciendo en el microambiente tumoral empiezan a no ser iguales genéticamente debido a los cambios que ocurren para poder sobrevivir a ese microambiente. Los individuos son seleccionados dependiendo de la presión para subsistir, en este caso hablando de las células cancerígenas está en una lucha ardua con el sistema inmune por lo que los clones de su descendencia son seleccionados por mutaciones conductoras (driver mutations) que va adquiriendo para que se puedan mantener su microambiente y así es como se logra formar un tumor primario, células que parten de una misma célula madre cancerosa pero su descendencia es completamente diferente, fenotipos similares pero genéticamente son diferentes; por aquello los agentes quimioterapéuticos no son tan efectivos, gracias a este fenómeno conocido como selección clonal (Khoo et al., 2015).

Hay que recalcar en los esfuerzos ha habido una creciente estrategias para maximizar el control tumoral, prolongar la supervivencia, minimizar los efectos secundarios de la quimioterapia y mejorar la calidad de vida de los pacientes. De los millones de moléculas que son descubiertas solo una de 5000-10000 de las moléculas que son sintetizadas en el desarrollo se convierte en un fármaco comercial (Newman & Cragg, n.d.).

Todos los organismos como resultado de reacciones intrínsecas inducidas que se han en el cuerpo por estímulos o sustancias exógenas son las que permiten la producción de metabolitos. Estos metabolitos pueden ser productos intermedios o finales de toda la cascada enzimática que sucede al momento del metabolismo. Es Metaboloma es la ciencia encargada del estudio de todas las moléculas pequeñas (metabolitos) que se producen en la señalización como las hormonas y productos metabólicos intermedios. Estas moléculas biológicas se han clasificado según (Pietra, 1997) en dos tipos; las moléculas que están participando a nivel celular y son fundamentales para subsistir

(desarrollo y reproducción, división celular, proliferación y embriogénesis) que se los llaman metabolitos primarios; las moléculas que son importante tanto en homeostasis como defensa en los organismos se los denominan secundarios. La farmacología a base compuestos marinos es una disciplina naciente que se está dando mediante la exploración del ecosistema marino.

En las últimas décadas, una gran selección de compuestos marinos ha sido llevado a cabo, y una amplia gama de actividades, tales como anti-viral (Dang, Benkendorff, Green, & Speck, 2015), anti-bacteriano (Desbois, Mearns-Spragg, & Smith, 2009), anti-fúngico (Plaza, Bifulco, Keffer, Lloyd, & Baker, 2009), anti-parasitario (Wei, Nieves, & Neopetrosiamine, 2010), anti-tumoral (Nuijen et al., 2000) y anti-inflamatorio (Asolkar et al., 2009), se han reportado.

Los andamios moleculares derivados de organismos marinos exhiben más novedad que los agentes terrestres. Un análisis comparativo informó que el 71,02% de los andamios moleculares en el Diccionario de MNPs fue utilizado solo por organismos marinos (Kong et al., 2010)

Se ha publicado un número creciente de documentos sobre compuestos marinos con respecto a la salud humana en los últimos veinte años principalmente en el cáncer y otras enfermedades (Figura 4).

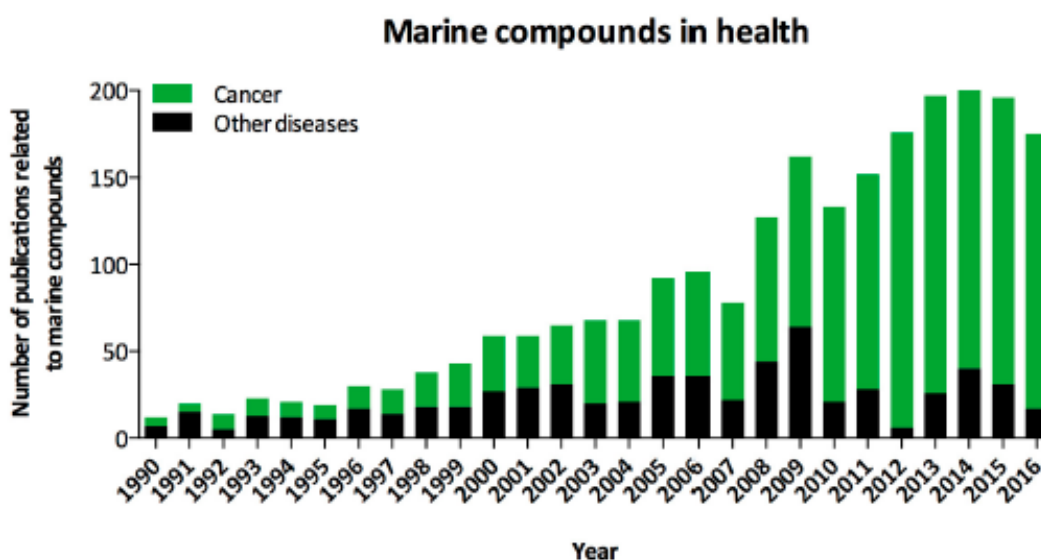


Figura 4.- Número de publicaciones en relación con los compuestos marinos en los últimos 20 años en donde se observan el aumento de publicaciones de cáncer con respecto con otras enfermedades. **Fuente:**(Ruiz-Torres et al., 2017)

Además, cinco de estos compuestos se obtienen de invertebrados marinos y han sido aprobados para su uso como fármacos en el tratamiento del cáncer. Estos compuestos se resumen en la Tabla 1.

Organización y año	Nombre del compuesto	Organismo Marino	Clase Química	área designada	Modo de acción	Compañía o Institución	Referencias
FDA 1969	Cytarabina (Ara-C)	Espónja	Nucleósido	Anti-cáncer	Inhibidor de la DNA polimerasa	Bedford, Enzon	(Mayer, y otros, 2010)
FDA 2004	Ziconotida	Caracol cónico	Péptido	Dolor	Modulador de canales neurales de calcio	Neurex Corp	(Olivera, y otros, 1987)
EMEA 2007	Trabectedina (E7389)	tunicado	Alcaloide	Anti-cáncer	Inhibidor del crecimiento celular cancerigeno y afecta el microambiente tumoral	PharmaMar	(D'Incalci, Badri, Galmarini, & Allavena, 2014)
FDA 2010	Eribulina de mesylato (E7389)	Espónja	Macrólido	Anti-cáncer de mama	Agente de interferencia de microtúbulos	Eisai Inc.	(Jordan, y otros, 2005)
FDA 2011	Brentuximab vedotina (SGN-35)	Molusco	Anticuerpo -droga conjugada	Linfoma	CD30 - anticuerpo dirigido - conjugado de drogas citotóxicas	Seattle Genetic Inc.	(Newland, Wasco, Li, Aziz, & Lowe, 2013)

Tabla 1.- Lista de medicamentos anticancerosos marinos aprobados por la FDA y la EMEA de una fuente de invertebrados. **Fuente:** Autores.

1.2.3.2 Clasificación química de compuestos bioactivos marinos

Aunque se han realizado varias clasificaciones (Y.-J. Hu et al., 2011), teniendo en cuentas la estructura del producto químico, las clases químicas más comunes de MNP son alcaloides, polipéptidos, terpenos, péptidos, y carbohidratos. Esta sección ofrece una breve descripción de las principales características de las diferentes clases de compuestos de origen marino (Leal, Madeira, Brandão, Puga, & Calado, 2012).

- ❖ **Alcaloides.**– los alcaloides son un grupo muy diverso y ampliamente distribuido y son definidos como compuestos orgánicos cíclicos que contienen nitrógeno en un estado de oxidación negativo que es de distribución limitada entre los organismos vivos ([6] citado en (Ruiz-Torres et al., 2017)). Los alcaloides se han aislado de organismos marinos como esponjas, tunicados, anémonas y moluscos, todos los cuales se caracterizan por colores y patrones brillantes, que a menudo están relacionados con los alcaloides (Molinski, 1993). Los alcaloides se atribuyen a una amplia gama de actividades biológicas como citotóxicos (Vik et al., 2006), anti-leucémicos (Bringmann, Seupel, Feineis, Zhang, & Xu, 2016).
- ❖ **Policétidos.** – Los policétidos son metabolitos naturales que comprenden una clase muy diversa de estructuras químicas. Estos compuestos en esta clase incluyen macrólidos, poliéteres, polioles y compuestos aromáticos (Rocha-Santos & Duarte, 2014). Esta clase a menudo está altamente oxigenada que contienen grupos

funcionales múltiples beta – hidroxí cetónicos como beta - hidroxí aldehídos, además son similares a los ácidos grasos. En segundo lugar, los policétidos y los ácidos grasos están asociados con una amplia variedad de funciones celulares esenciales; sin embargo, los policétidos son más complejos en sus rutas biosintéticas (Hopwood, 2009). Estos metabolitos están aislados de esponjas, ascidias, corales blandos y briozoos (Blunt, Copp, Keyzers, Munro, & Prinsep, 2015) y pueden ser producidos por bacterias comensales o simbióticas (Hochmuth & Piel, 2009). Los policétidos poseen una amplia gama de actividades biológicas, incluidos los efectos antibióticos, anticancerígenos, antifúngicos, antiparasitarios y neurotóxicos (Rocha-Santos & Duarte, 2014).

- ❖ **Terpenos.** - Los terpenos son los productos finales de las biosíntesis que implican una estructura de isopreno de cinco carbonos. Según el número de unidades, se pueden clasificar como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos (esteroides) y tetraterpenos (carotenoides) (Tsukada et al., 2011). Varios grupos de organismos marinos producen terpenos, que exhiben actividades biológicas tales como efectos citotóxicos, antiproliferativos, antimicóticos y antimicrobianos (Rocha-Santos & Duarte, 2014).
- ❖ **Péptidos.** - Los péptidos son fuentes de nitrógeno y aminoácidos que varían en tamaño de 2 a 20 residuos de aminoácidos y están relacionados con numerosas funciones fisiológicas potenciales. Los péptidos bioactivos pueden ser fragmentos de proteínas que adquieren funcionalidad cuando se liberan de la proteína original (Kim, Lee, & Kwon, 2010). La primera actividad asignada a un péptido fue neurotoxicidad; sin embargo, en la actualidad, están asociados a otras funciones, como la actividad cardiotónica, antiviral y antitumoral, cardiotóxica y antimicrobiana (Cheung et al., 2015). Estas funciones, además de sus excelentes propiedades de unión, baja toxicidad fuera del objetivo y alta estabilidad, hacen que los péptidos sean moléculas prometedoras para el desarrollo de nuevas terapias (Agrawal, Adholeya, & Deshmukh, 2016). Aproximadamente el 60% de los productos naturales descritos pertenecen a la familia de los péptidos (Mehbub, Lei, Franco, & Zhang, 2014). Los péptidos están presentes en muchas especies marinas, y la extensa investigación que se ha realizado sobre ellos ha demostrado que con mayor frecuencia se encuentran en las esponjas (Cheung et al., 2015), como ocurrió con los policétidos, los péptidos también pueden ser producidos por bacterias comensales o simbióticas u hongos.

1.2.3.3 MNPs en investigación o en etapas preclínicas clasificadas por objetivos moleculares de cáncer

Los compuestos bajo investigación activa o en fases preclínicas se resumen de acuerdo con la capacidad de estos productos naturales para modular uno o más características distintivas del cáncer y convertirse en candidatos prometedores a fármacos contra el cáncer. Los compuestos más relevantes de 2010 a 2017.

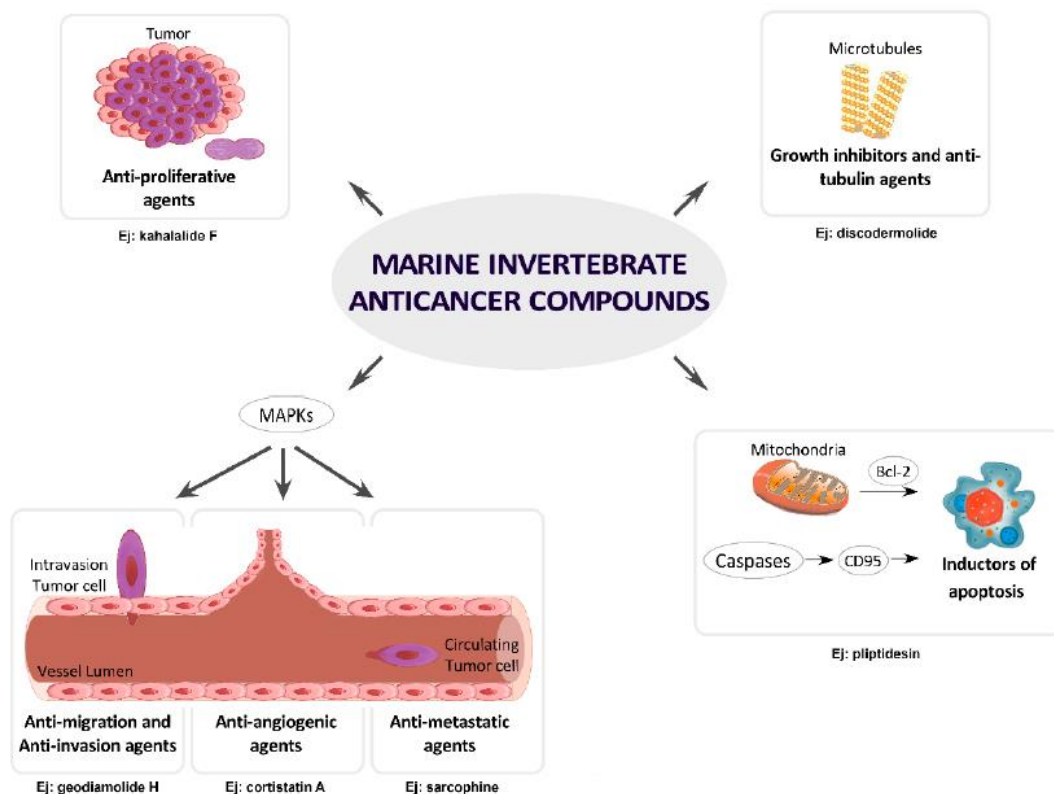


Figura 5.- Principales objetivos moleculares de compuestos marinos que se sabe modulan diferentes características o sellos distintivos del cáncer. **Fuente:** (Zonder et al., 2001)

Antes de comenzar, debe considerarse que las células normales se convierten en células cancerosas a través de una amplia gama de cambios genéticos, y este proceso genera muchos tipos diferentes de cáncer (Nowell et al., 1976). Sin embargo, la mayoría de los tipos de cáncer comparten características similares, y estos deben ser estudiados para progresar en el descubrimiento de fármacos contra el cáncer y el tratamiento del cáncer. Hanahan y Weinberg identificaron seis objetivos principales en tumores humanos: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión tisular y metástasis

(Hanahan & Weinberg, 2000). Esta parte de la revisión se centra en los compuestos marinos que desempeñan un papel en algunas de las características descritas por Hanahan y Weinberg. Luego, hemos clasificado los MNP como inhibidores del crecimiento y agentes anti-tubulina, inductores de apoptosis y autofagia, y agentes anti angiogénicos, anti-migración, anti-invasión y anti metastásicos. Además, debido a su relevancia en las vías de transducción de señales, también se incluye una familia complementaria que incluye inhibidores de la proliferación y de proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Todas estas categorías se muestran en la Figura 3.

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGIA

El presente trabajo tiene como objetivo el diseño y construcción de un sistema reportero con GFP para el promotor del gen asociado al cáncer PD-L1, para su posterior utilización en el tamizaje de compuestos bioactivos extraídos de la biodiversidad ecuatoriana.

2.1 Materiales y Métodos

2.1.1 Recursos Bioinformáticos

Para obtener información, se empleó los conjuntos de datos de The Cancer Genome Atlas (TCGA) y se analizó exhaustivamente 22 tipos principales de cáncer para PD-L1 (CD274, B7-H1). Además, OncoKB, el Catálogo de Mutaciones Somáticas en Cáncer (COSMIC), Mi Genómica del Cáncer, Centro Nacional de Investigaciones Biotecnológicas (NCBI).

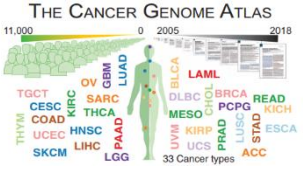
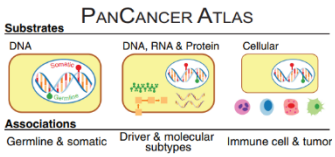



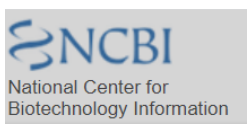
	
 http://oncokb.org	 https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic
 https://www.mycancergenome.org	 https://www.ncbi.nlm.nih.gov

Tabla 2.- Plataformas de Información y secuencias de Oncogenes. **Fuente:** Steven Merchán.

El análisis de secuencias se lo hizo mediante el programa GENEIOUS v8.1.1 donde se realizó el alineamiento de las secuencias y la construcción de los plásmidos utilizar para clonación. También el diseño de los primers junto con el programa PRIMER3 y luego para la evaluación se utilizó OLIGOANALIZER. Finalmente, para la digestión de mi plásmido con mi gen promotor PD-L1 se usó NEBCUTTER y WEBCUTTER.


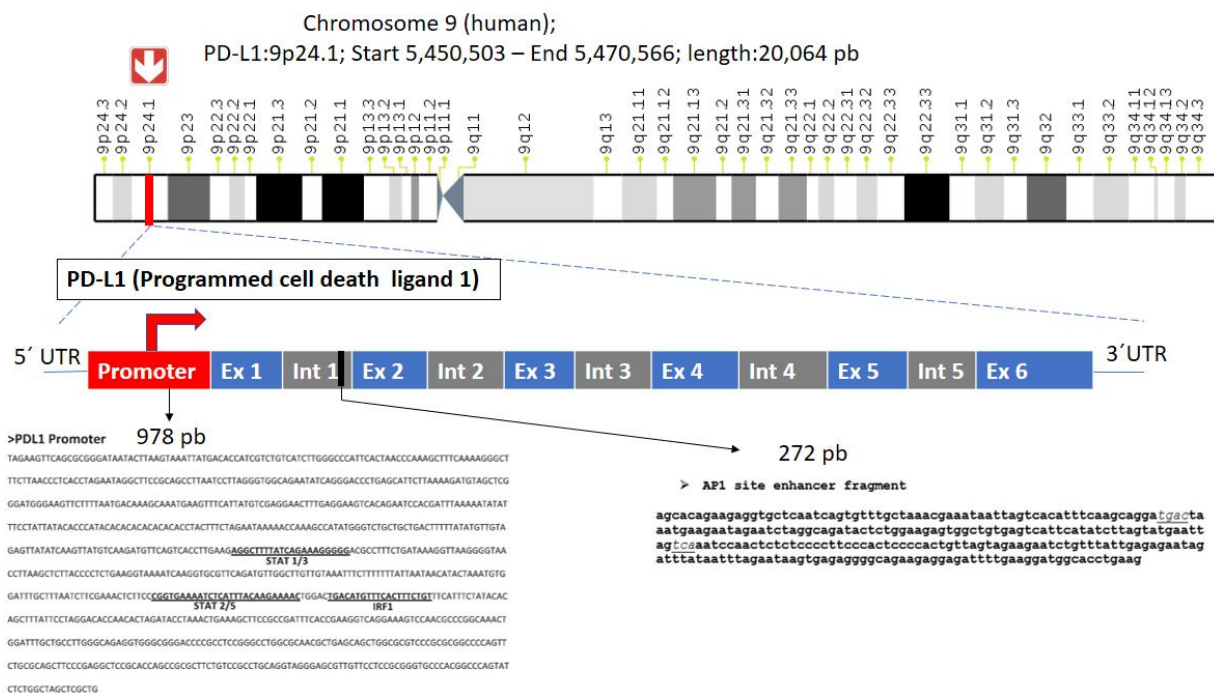
 Geneious Trial 8.1.8	Primer3web version 4.1.0
OligoAnalyzer 3.1	NEBcutter V2.0

Tabla 3.- Programas Bioinformáticos utilizados. **Fuente:** Steven Merchán.

2.1.2 Identificación Y Descripción Del Gen PD-L1

El ligando de muerte programada 1 (PD-L1) o también es conocido como grupo de diferenciación CD274 o el homólogo de B7-H1 que es una proteína que en humanos esta codificada por el gen CD274. En donde se clonó la región promotora y el fragmento de activador de proteína tipo 1.



CD274, B7-H, PD-L1, PDCD1L1, PDCD1LG1, PDL1, CD274 molecule, Programmed cell death 1 ligand 1

Figura 6.- PD-L1 se encuentra en el locus 9p24.1 del cromosoma 9 humano; consta de 6 exones y 5 intrones; Empieza en la posición 5,450,503 y Termina 5,470,566. Y posee un tamaño de 20,064 pb. **Fuente:** Steven Merchán.

2.1.3 Primer: Diseño Y Evaluación

Los primers o iniciadores son cadenas de nucleótidos que le ayuda a la *Thermofilus aquaticus* (Taq) polimerasa a que empiece la síntesis de ADN de interés. Por consiguiente, se realizó un alineamiento usando el programa Geneius v8.1 para encontrar secuencias en común, luego se insertan los iniciadores que se encontraron

en publicaciones como muestra la tabla 3 y se seleccionan los que mejor que se alineen con las secuencias para su respectiva edición.

Publicaciones	Autores(año)	Secuencias Primers
Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression	García (2017)	SacI PDL1 Prom F GGGGTTGAGCTCTAGAAGTTCAGCGCGGGATA BglII PDL1 Prom R GGGGTTAGATCTCAGCGAGCTAGCCAGAGATACT PDL1 Prom EcoR1 F GGGGTTGAATTCTAGAAGTTCAGCGCGGGATA PDL1 Prom EcoR1 R GGGGTTGAATTCAGCGAGCTAGCCAGAGATACT
Construction of the PD-L1 Promoter-Luciferase Reporter Expressing Vector for Small Molecule Inhibitors Screening	Jiang (2018)	PF:GGGGTACCTAGAAGTTCAGCGCGGGATAATAC PR:CCGCTCGAGCTGCAGGCGGACAGAAGCGCGGCTG
Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity	Chia-Wei Li(2016)	5-TCACTTGGTAATTCTGGGAGC-3 (PD-L1 forward), 5CTTTGAGTTTGTATCTTGATGCC-30 (PD-L1 reverse)
A polymorphism in the promoter region of PD-L1 serves as a binding-site for SP1 and is associated with PD-L1 overexpression and increased occurrence of gastric cancer	Tao(2016)	PF:GGCTAGGGTACCCGTTTCAGATGTTGGCTTGTG PR:GGCTAGCTCGAGGGAAGCTGCGCAGAAGTGGGG

Tabla 4.- Lista de iniciadores de publicaciones que fueron examinadas entre 2016 – 2018 **Fuente:** Steven Merchán((García-Díaz et al., 2017)(Jiang et al., 2018) (Tao et al., 2017)(Li et al., 2016))

2.1.4 PCR

El ADN total se extrajo de los leucocitos de muestras de sangre humana durante 48 h mediante el uso de Fenol-Cloroformo-isoamil y se purificó mediante columna, según el protocolo del fabricante (High Pure PCR Product Purification Kit - Sigma-Aldrich). El promotor de PD-L1 (PD-L1p) fue amplificado por PCR usando primers específicos (primer forward: 5'- TTGTCGACTAGAAAGTTCAGCGCGGGATAATAC -3', primer reverse: 5'- AACGTCTCTCAGCGAGCTAGCCAGAGATACT -3 ') y el Fragmento AP1 (primer forward: 5'-TGCTGCAGAGCACAGAAGAGGTGCTCAATC-3', primer reverse: 5'- ACAAGCTTCTTCAGGTGCCATCCTTCAAATC-3'). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa.

2.5 Clonación

Una vez obtenidos los amplicones deseados. y se hace la clonación en el plásmido pGEM-T (Figura 7). Luego se procedió a la ligación con ligasas. Y después se hizo transformación de Plásmidos en Bacterias Competentes. Luego, se hace un screening de colonias mediante PCR de la extracción de ADN plasmídico para su verificación,

según el Protocolo de Clonación de laboratorio de Investigaciones Biomédicas (“ESPOL, L. I. . PROTOCOLOS PARA CLONACION DE GENES DE INFLUENZA.,” 2012).

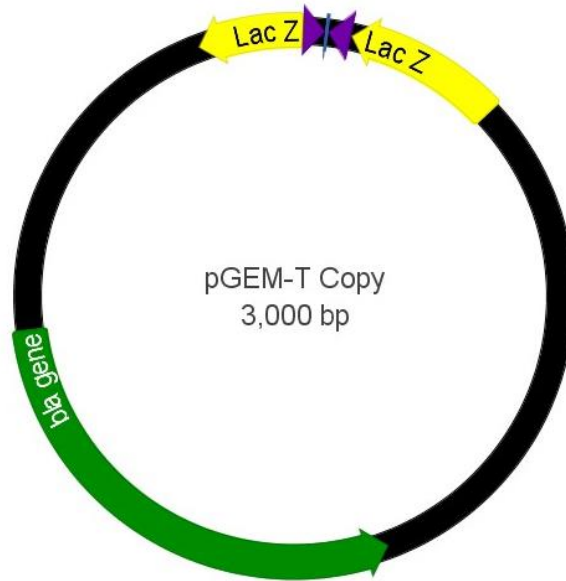


Figura 7.- pGEM-T es un plásmido de transporte utilizado para la clonación de productos de PCR, posee 3000 PB. **Fuente:** Geneious 8.7

2.1.6 Construcción De Sistema Reportero Fluorescente

La construcción se tomó como base pCAGGs-eGFP como se observa en la Figura 8. Se realizó varias digestiones y ligaciones mediante dos estrategias; Primero se empezó con abrir el plásmido con los sitios HindIII y PstI para la inserción de Activador de Proteína de tipo 1(AP1), seguido de la inserción del fragmento PD-L1p dentro del plásmido con sitios de restricción como Sall y Apal terminando la construcción pCAGGs-eGFP-AP1-PD-L1p (Figura 9). Finalmente, para la evaluación de la construcción mediante la observación de coloración verde debido al gen fluorescente eGFP se transfectarán en el cultivo de células.

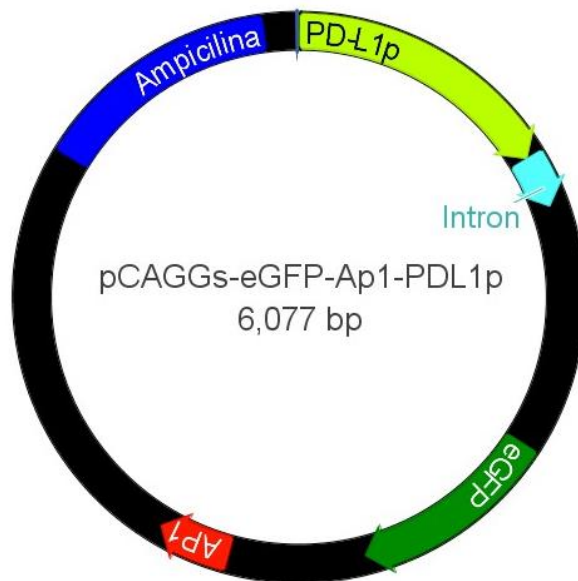


Figura 8.- pCAGGs-eGFP presenta 5 486 pb que es un plásmido de expresión constitutiva. Creado en el Laboratorio de Investigaciones Biomédicas y secuenciado expresa eGFP (gen fluorescente). **Fuente:** Geneious 8.7

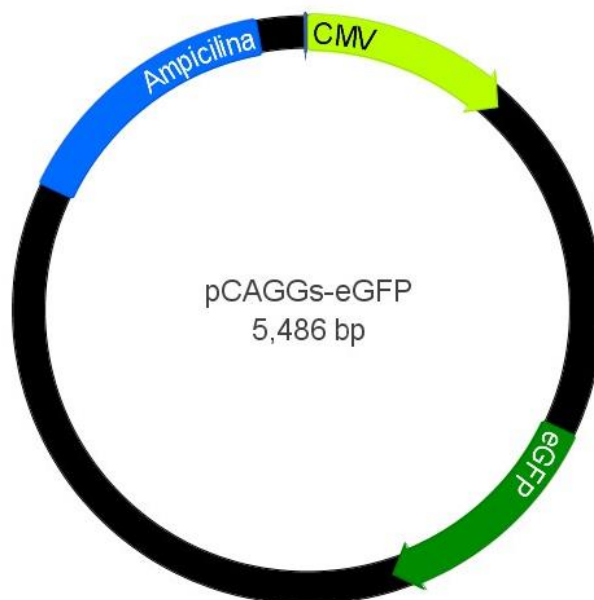


Figura 9.- pCAGGs-eGFP-AP1-PD-L1p presenta 6077 pb que es la construcción final en el plásmido de expresión constitutiva que expresa eGFP (gen fluorescente). **Fuente:** Geneious 8.7

2.1.7 Digestión

2.1.7.1 Primera Digestión

El plásmido fue ingresado en el programa NebCutter para hacer un análisis de restricción; las enzimas seleccionadas que son PstI y HindIII realizan los cortes en la región de interés.

Componentes	Vol r* _u (ul)	conc. Final
NebCutter 2	2,5	1x
Enzima 1(PstI)	1	10u
Enzima 2(HindIII)	1	20u
DNA Plásmido (100 ng/ml)	4	2000 ng/ul
H2O	8	
	25 ul	

Tabla 5.- Materiales para la realización de la Digestión del Plásmido pCAGGs-eGFP

Una vez comprobado se utilizaron este set de enzimas que realizaban 1 solo corte cada una que son la enzima PstI y HindIII se procedió a calcular los volúmenes y concentraciones finales (Tabla 5). Y se dejó digiriendo durante toda la noche a 37°C.

Después se colocó 0,5 uL de Fosfatasa Alcalina Intestinal (CIP) para eliminar los grupos fosfatos y se incubaron a 37°C.

2.1.7.2 Segunda Digestión

El Análisis de restricción en NebCutter para extraer el promotor del Plásmido pCAGGs-eGFP-AP1 e insertar el PD-L1p + la parte reconstituida del intrón, con las enzimas Sall y Apal; además que no corte ninguna otra sección del plásmido y se hizo los respectivos cálculos de volúmenes y concentración como vemos en la tabla 6.

Componentes	Vol r* _u (ul)	Conc. Final
NebCutter 4	2,5	1x
enzima 1(Apal)	1	10u
enzima 2(Sall)	1	20u
DNA Plásmido (252 ng/ml)	5	
H2O	10.5	
	25 ul	

Tabla 6.- Materiales para la realización de la Digestión del Plásmido pCAGGs-eGFP-AP1

2.1.8 LIGACIÓN

Se hizo ligaciones con ratios de 1:3 y las concentraciones fueron calculadas en el programa "Ligation Calculator", Los cálculos de volúmenes son los siguientes que se encuentran en la tabla 7.

Componentes	Conc. inicial	Vol r* _u (ul) 1:3
2X Rapid Buffer	2X	12,5
pCAGGs plásmido	126 ng/ul	1
Enzima (T4 DNA ligasa)	3 u/ul	1
Fragmento AP1	7 ng/ul	9
H2O		1.5
		25 ul

Tabla 7.- Materiales para la realización de la Ligación de los Fragmentos de PD-L1, con el intrón y pCAGGS-eGFP-AP1.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS

3.1.- PCR-ESTÁNDAR

El producto de PCR de la región no codificante flanqueante 5' del promotor PD-L1 fue amplificado y separado por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, el resultado mostró que el tamaño del fragmento de ADN amplificado de PD-L1p es consistente con la expectativa que era 978 pb que fue sometido a diferentes temperaturas 57 °C y 59 °C (Figura 10a).

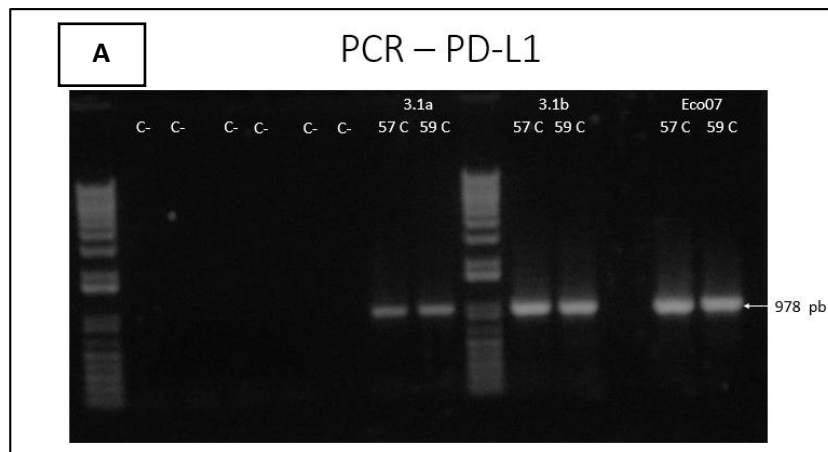


Figura 10a.- La región del promotor PD-L1 fue amplificado por PCR, el marcador es de 1 kb Ladder, a la izquierda se encuentran los controles (C-) y las muestras que eran 3.1a, 3.1b y Eco07 bajo dos temperaturas 57 °C y 59 °C.

En cuanto, al producto de PCR del fragmento de AP1 site y la reconstitución del intrón del plásmido pCAGGs-eGFP fueron amplificados y separados por electroforesis en el gel de agarosa al 2%, el resultado mostró que los tamaños de los fragmentos de ADN amplificados eran de 272 pb AP1 que fue sometido a temperaturas de 57 °C y 59 °C; 213 pb el intrón que fueron sometidos a temperaturas de 61 °C, 63 °C, 65 °C (Figura 11 a y B).

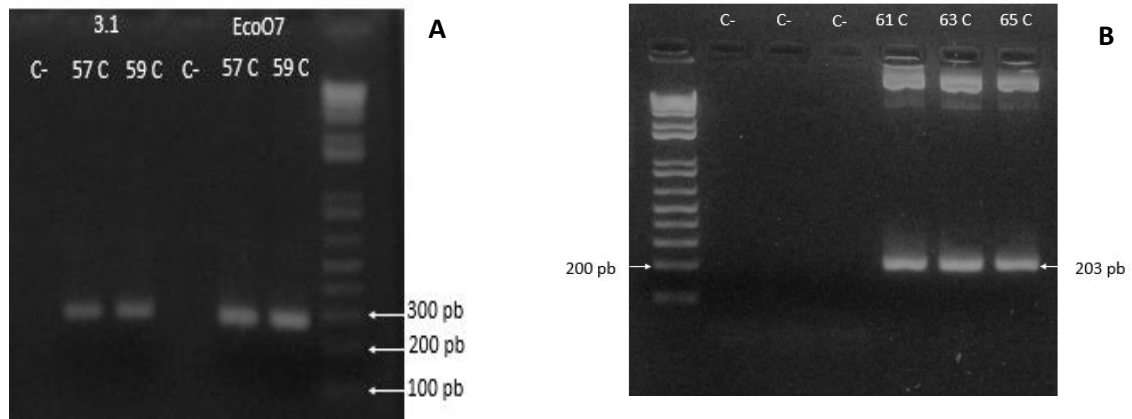


Figura 11.- **a)** Fragmento AP1 fue amplificado por PCR, el marcador es de 1 kb Ladder, el control (C-) y las muestras que eran 3.1b y Eco07 bajo dos temperaturas 57 °C y 59 °C. **b)** Intrón Fragmento reconstituido fue amplificado por PCR, el marcado es de 1 Kb Ladder, los controles se encuentran a la izquierda y las muestras eran de pCAGGs-eGFP bajo tres temperaturas de 61 °C, 63°C, 65°C.

3.2.- Clonación en pGEM-T

Se clonó en pGEMT para obtener mayores concentraciones de los fragmentos de amplificados: PD-L1p; Intrón; AP1, se hizo una ligación y se hizo una respectiva verificación de colonias para observar cuales tenían el inserto como observamos en la figura 12.

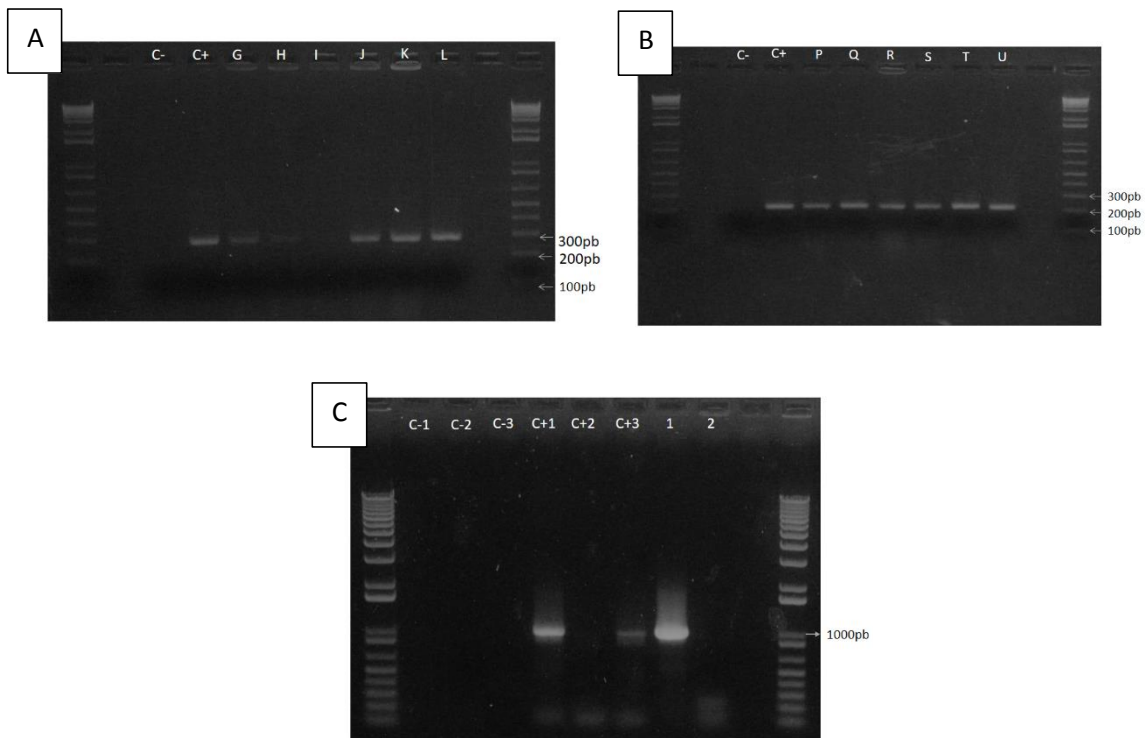


Figura 12.- **a)** Fragmento AP1 fue amplificado por PCR en la comprobación de la colonia G, H, I, J, K, L; el marcador es de 1 kb Ladder, control negativo (C-), control positivo(C+), donde se observa que las colonias J, K, L son las que poseían el inserto. **b)** Fragmento

Intrón fue amplificado por PCR en la comprobación de la colonia P, Q, R, S, T, U; el marcador es de 1 kb Ladder, control negativo (C-), control positivo(C+), donde todas poseían el inserto.; **c)** Fragmento PD-L1p fue amplificado por PCR en la comprobación de la colonia 1,2; el marcador es de 1 kb Ladder, controles negativos (C-), controle positivos(C+), donde el inserto solo la colonia 1.

3.3.- Ensamblaje pCAGGs-eGFP-PD-L1p-AP1

3.3.1.- Ensamblaje pCAGGs-eGFP-AP1

El ensamblaje se realizó mediante ligaciones y digestiones del plásmido pCAGGs-eGFP. Primero se procedió abrir el plásmido con enzimas de restricción PstI y HindIII para inserción del Fragmento potenciador de Activador de proteína tipo 1(AP1 fragment enhancer) y una ligación, después se clonó en las bacterias competentes y se hizo una verificación escogiendo colonias al azar de la caja Petri como se muestra la Figura 13 y hacer ampliaciones para comprobar cuál de las colonias contenían el inserto.

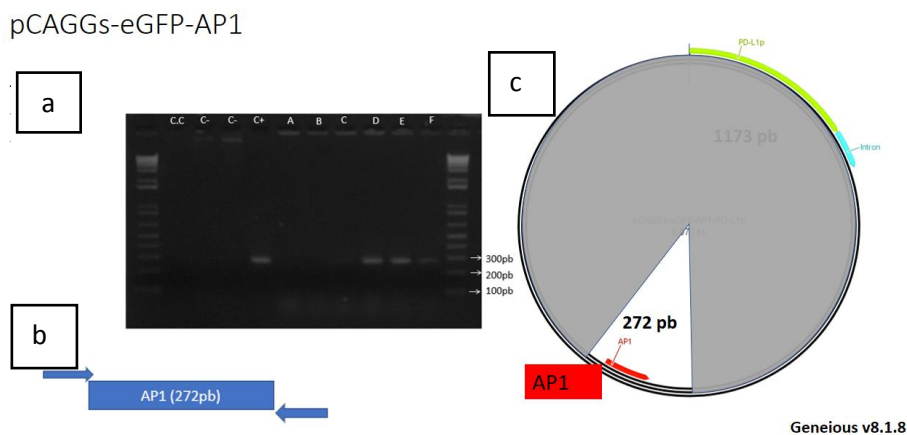


Figura 13.- a) Fragmento AP1 fue amplificado por PCR en la comprobación de la colonia A, B, C, D, E, F; el marcador es de 1 kb Ladder, dos controles negativos (C-), Control de extracción (C.C), control positivo(C+), donde se observa que las colonias D, E, F son las que poseían el inserto. b) El tamaño del fragmento AP1 es de 272 pb; c) inserción del fragmento en el plásmido. **Fuente:** Geneious v8.1.8.

3.3.2.- Ensamblaje pCAGGs-eGFP-PD-L1p-AP1

Después haber sido digerido el plásmido pCAGGs-eGFP-AP1 con las enzimas de restricción Sall y Apal se procedió hacer una triple ligación del plásmido abierto, y los fragmentos PD-L1pe Intrón, luego se hizo la clonación en bacterias competentes y se hizo una verificación de colonias escogidas, pero con el de PD-L1pf(primer forward) y Intrónr (primer reverse) como vemos en la figura 14 y el fragmento amplificado era la de 1173 pb que es la suma de PD-L1p+ Intrón.

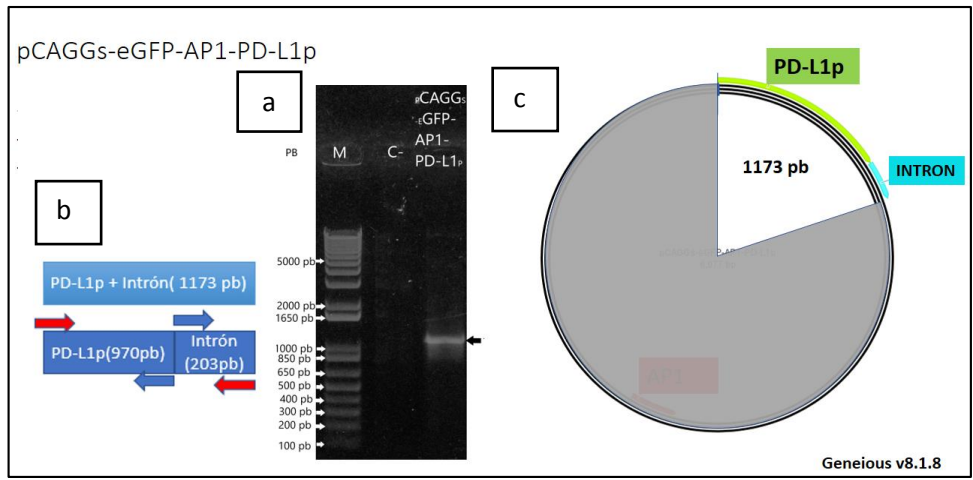


Figura 14.- a) Fragmento PD-L1p+Intrón fue amplificado por PCR en la comprobación de la colonia; el marcador es de 1 kb Ladder, dos controles negativos (C-), donde se observa una banda 1170 pb que se aproxima que tiene el inserto. b) El tamaño del fragmento PD-L1p + Intrón es de 1173 pb; c) Inserción del fragmento en el plásmido, **Fuente:** Geneious v8.1.8.

CAPÍTULO 4

4.1 Conclusiones y Recomendaciones

Los inhibidores inmunitarios son pilares de control, la vía PD-1/PD-L1, hacen que el tumor evada el sistema de control de las células inmunitarias, lo cual se ha convertido en una nueva característica distintiva del cáncer por ende se ha demostrado que mediante esta vía de señalización permite inhibir la actividad de la célula T.

Lo que nos da una visión que *“Program Death Ligand 1”* representa un papel crucial durante la génesis del tumor y a su vez un gen blanco para la detección de drogas para terapias contra el cáncer. En ensayo clínico, anticuerpo anti-PD-L1 (mAb anti-PD-L1) han logrado demostrar prometedores resultados en tratamiento de diferentes tipos de cáncer incurables, pero al mismo tiempo parece que las reacciones adversas asociadas con la activación excesiva de las células T y el daño autoinmune clínicamente son observables, generando una alta cantidad de efectos secundarios en pacientes tratados (Silva, Gullo, & Carneiro, 2016).

En la publicación de (Jiang et al., 2018) crea sistemas reporteros con plásmidos que expresan luciferasa con la región promotora PD-L1 obteniendo excelentes resultados con el tamizaje de compuestos sintéticos como fluradabina de fosfato. En esta tesis hemos logrado construir con sistema reportero innovador que exprese fluorescencia con la región promotora PD-L1 *“Program Death Ligand 1”*, lo que nos va a permitir la evaluación de compuestos bioactivos visualizando la disminución o inhibición de la actividad transcripcional de este promotor asociado al cáncer.

Quizás a un futuro en el país que posee una alta diversidad de compuestos naturales marinos que puedan ser tamizados y de alguna manera encontrar compuestos bioactivos que generen menos toxicidad de los sintéticos. Y También para futuros proyectos, que plantean la evaluación de los compuestos y el generar una metodología de tamizaje usando el reportero creado como modelo.

Como recomendación para validar la viabilidad del plásmido, se recomienda transfectar en líneas celulares y estimular con interferón gamma. Luego de verificar la fluorescencia de las células, se recomienda evaluar el tiempo que permanece activa como control para cuando se evalúen los compuestos bioactivos. Otra forma de verificar si el reportero está correctamente ensamblado, es la secuenciación del plásmido.

Para finalizar, el plásmido reportero pCAGGS-eGFP-AP1-PDL1 está diseñado principalmente para evaluar compuestos que inhiban al promotor del gen PDL1, sin

embargo, siguiendo los mismos procedimientos que se realizaron, se puede extraer este promotor y reemplazarlo por otro promotor de otro gen de interés para el cáncer. La misma metodología aplicada puede servir para el diseño de reporteros a nivel de expresión, con los que se pueda evaluar otro mecanismo de acción de los compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abyntek Biopharma. (2017). Anticuerpos anti PD-1 y PD-L1 e Inmunoterapia. Retrieved July 27, 2018, from <http://www.abynetek.com/anticuerpos-anti-pd-1-y-pd-l1-e-inmunoterapia/>
2. Agrawal, S., Adholeya, A., & Deshmukh, S. K. (2016). The Pharmacological Potential of Non-ribosomal Peptides from Marine Sponge and Tunicates: *Frontiers in Pharmacology*, 7. Retrieved from <http://europepmc.org/articles/PMC5078478/> LK - link%7Chttp://europepmc.org/articles/PMC5078478/ SRC - BaiduScholar FG - 0
3. American Cancer Society. (n.d.). Efectos secundarios del trasplante de células madre. Retrieved August 20, 2018, from <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/trasplante-de-celulas-madre/efectos-secundarios-del-trasplante.html>
4. American Cancer Society. (2017). Cómo sobrellevar los efectos de la radioterapia. Retrieved August 20, 2018, from <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/radioterapia/como-sobrellevar.html>
5. American Society of Clinical Oncology (ASCO). (2018). Qué es la quimioterapia. Retrieved June 20, 2018, from <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atención-del-cáncer/cómo-se-trata-el-cáncer/quimioterapia/qué-es-la-quimioterapia>
6. Antoni, S., Soerjomataram, I., Møller, B., Bray, F., & Ferlay, J. (2016). An assessment of GLOBOCAN methods for deriving national estimates of cancer incidence. *Bulletin of the World Health Organization*, 94(3), 174–184. <https://doi.org/10.2471/BLT.15.164384>
7. ASCO. (2016). Efectos secundarios de la radioterapia. Retrieved June 20, 2018, from <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atención-del-cáncer/cómo-se-trata-el-cáncer/radioterapia/efectos-secundarios-de-la-radioterapia>
8. ASCO. (2017a). Efectos secundarios de la quimioterapia. Retrieved June 20, 2018, from <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atención-del-cáncer/cómo-se-trata-el-cáncer/quimioterapia/efectos-secundarios-de-la-quimioterapia>
9. ASCO. (2017b). Qué es la inmunoterapia. Retrieved June 20, 2018, from <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atención-del-cáncer/cómo-se-trata-el-cáncer/inmunoterapia/qué-es-la-inmunoterapia>
10. Asolkar, R. N., Freel, K. C., Jensen, P. R., Fenical, W., Kondratyuk, T. P., Park, E.-J., & Pezzuto, J. M. (2009). Arenamides A-C, cytotoxic NFκB inhibitors from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *Journal of Natural Products*, 72(3), 396–402. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=19117399&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
11. Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. G., & Prinsep, M. R. (2015). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 32(2), 116–211. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=25620233&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
12. Bravo, D. (2017, November). El Comercio. *El Cáncer Afectó 5117 Niños En El 2016*, p. 1. Retrieved from <https://www.elcomercio.com/tendencias/cancer-ninos-ecuador-cifras-acuerdocontraelcancer.html>
13. Bringmann, G., Seupel, R., Feineis, D., Zhang, G., & Xu, M. (2016). Ancistectorine D, a naphthylisoquinoline alkaloid with antiprotozoal and antileukemic activities, and further 5,8- and 7,1-linked metabolites from the Ch... *Fitoterapia*, 115, 1–8.

- Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X16303835> LK - link%7Chttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X16303835 SRC - BaiduScholar FG - 0
14. Catherine Sánchez, N. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553–562. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70659-X](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70659-X)
 15. CENAIM. (2017). LEVANTAMIENTO DE LA BIODIVERSIDAD A DISTINTOS NIVELES DE LA RESERVA MARINA EL PELADO (REMAPE). Retrieved July 1, 2018, from <http://www.cenaim.espol.edu.ec/es/biodiversidad>
 16. Cheung, P. K., Yuen, K. L., Li, P. F., Lau, W. H., Chiu, C. M., Yuen, S. W., & Baker, D. M. (2015). To swim or not to swim? A disagreement between microbial indicators on beach water quality assessment in Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*, 101(1), 53–60. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=26608502&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
 17. Dang, V. T., Benkendorff, K., Green, T., & Speck, P. (2015). Marine Snails and Slugs: a Great Place To Look for Antiviral Drugs. *Journal of Virology*, 89(16), 8114–8118. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=26063420&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
 18. Desbois, A. P., Mearns-Spragg, A., & Smith, V. J. (2009). A fatty acid from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* is antibacterial against diverse bacteria including multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, 11(1), 45–52. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=18575935&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
 19. Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., ... Chen, L. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine*, 8(8), 793–800. <https://doi.org/10.1038/nm730>
 20. Dr. Javier Puente, & Dr. Guillermo de Velasco. (2017). ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? Retrieved July 19, 2018, from <https://www.seom.org/es/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla?showall=1>
 21. ESPOL, L. I. . PROTOCOLOS PARA CLONACION DE GENES DE INFLUENZA. (2012). *Guayaquil ANEXO 10*.
 22. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359-86. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
 23. Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Moreno, B. H., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G. A., ... Ribas, A. (2017). Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Reports*, 19(6), 1189–1201. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.031>
 24. Ginsburg, O. M., Hanna, T. P., Vandenberg, T., Joy, A. A., Clemons, M., Game, M., ... Gospodarowicz, M. (2012). The global cancer epidemic: Opportunities for Canada in low- and middle-income countries. *Cmaj*, 184(15), 1699–1704.

- <https://doi.org/10.1503/cmaj.111131>
25. Globocan. (2012). 10 gráficos para entender el grave impacto del cáncer en el mundo - BBC News Mundo. Retrieved August 13, 2018, from https://www.bbc.com/mundo/noticias/2016/02/160203_cancer_graficos_impacto_m_en
 26. Hamanishi, J., Mandai, M., Matsumura, N., Abiko, K., Baba, T., & Konishi, I. (2016). PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. *International Journal of Clinical Oncology*, 21(3), 462–473. <https://doi.org/10.1007/s10147-016-0959-z>
 27. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=10647931&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
 28. He, J., Hu, Y., Hu, M., & Li, B. (2015). Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Scientific Reports*, 5(August), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep13110>
 29. Hochmuth, T., & Piel, J. (2009). Polyketide synthases of bacterial symbionts in sponges - evolution-based applications in natural products research. *Phytochemistry*, 70(15–16), 1841–1849. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=19443000&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
 30. Hopwood, D. A. (2009). Complex enzymes in microbial natural product biosynthesis, part B: polyketides, aminocoumarins and carbohydrates. Preface. *Methods in Enzymology*, 459, xvii–xix. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=19362632&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
 31. Hsu, P., Miao, J., Zhang, Y. W. W., Wang, Y. Y. C., Zhen, C. Y., Joanna, H., ... You, L. (2018). Inhibition of yes-associated protein down-regulates PD-L1 (CD274) expression in human malignant pleural mesothelioma, (February), 3139–3148. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13593>
 32. Hu, G. P., Yuan, J., Sun, L., She, Z. G., Wu, J. H., Lan, X. J., ... Chen, S. P. (2011). Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine Drugs*, 9(4), 514–525. <https://doi.org/10.3390/md9040514>
 33. Hu, Y.-J., Shen, X.-L., Lu, H.-L., Zhang, Y.-H., Huang, X.-A., Fu, L.-C., & Fong, W.-F. (2011). Tenacigenin B derivatives reverse P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in HepG2/Dox cells. *Journal of Natural Products*, 71(6), 1049–1051. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=18512984&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
 34. Jiang, B., Shi, Z., Wang, A., Li, Y., Zhang, Q., Jing, L., & Diao, A. (2018). Construction of the PD-L1 promoter-luciferase reporter expressing vector for small molecule inhibitors screening. *Lecture Notes in Electrical Engineering*, 444, 705–712. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4801-2_72
 35. Khoo, B. L., Chaudhuri, P. K., Ramalingam, N., Tan, D. S. W., Lim, C. T., & Warkiani, M. E. (2015). Single-cell profiling approaches to probing tumor heterogeneity. *International Journal of Cancer*, 139(2), 243–255. Retrieved from

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=26789729&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
36. Kim, H.-H., Lee, B.-J., & Kwon, A.-R. (2010). Expression, crystallization, and preliminary X-ray crystallographic analysis of putative SpoVG from *Staphylococcus aureus*. *Archives of Pharmacal Research*, 33(8), 1285–1288. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=20803133&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
 37. Kohler, B. A., Sherman, R. L., Howlander, N., Jemal, A., Ryerson, A. B., Henry, K. A., ... Penberthy, L. (2015). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2011, Featuring Incidence of Breast Cancer Subtypes by Race/Ethnicity, Poverty, and State. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 107(6). <https://doi.org/10.1093/jnci/djv048>
 38. Kong, P., Tyler, B. M., Richardson, P. A., Lee, B. W. K., Zhou, Z. S., & Hong, C. (2010). Zoospore interspecific signaling promotes plant infection by *Phytophthora*. *BMC Microbiology*, 10, 313. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=21138563&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
 39. Kythreotou, A., Siddique, A., Mauri, F. A., Bower, M., & Pinato, D. J. (2018). Pd-L1. *Journal of Clinical Pathology*, 71(3), 189–194. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204853>
 40. Laura Porter-ASCO. (2018). Lo que necesita saber de los efectos secundarios de la inmunoterapia. Retrieved June 20, 2018, from <https://www.cancer.net/es/blog/2018-03/lo-que-necesita-saber-de-los-efectos-secundarios-de-la-inmunoterapia>
 41. Leal, M. C., Madeira, C., Brandão, C. A., Puga, J., & Calado, R. (2012). Bioprospecting of marine invertebrates for new natural products - a chemical and zoogeographical perspective. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(8), 9842–9854. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=22898739&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
 42. Lee, S. J. S. W., Jang, B. C., Lee, S. J. S. W., Yang, Y. Il, Suh, S. Il, Park, Y. M., ... Choi, I. H. (2006). Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN- γ -induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS Letters*, 580(3), 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.093>
 43. Leukemia & Lymphoma Society. (2015). *Información sobre la inmunoterapia*. Retrieved from www.LLS.org/espanol
 44. Li, C. W., Lim, S. O., Xia, W., Lee, H. H., Chan, L. C., Kuo, C. W., ... Hung, M. C. (2016). Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nature Communications*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms12632>
 45. M. Ángeles Gómez del Rio y Benedí, J. (2006). Fármacos antineoplásicos (I). *Farmacia Profesional*, 20(II), 5. Retrieved from www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-pdf-13086156-S300%0A
 46. Mehubub, M. F., Lei, J., Franco, C., & Zhang, W. (2014). Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. *Marine Drugs*, 12(8), 4539–4577. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=Related

- Articles&IdsFromResult=25196730&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
47. Merlo, L. M. F., Pepper, J. W., Reid, B. J., & Maley, C. C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews Cancer*, 6(12), 924–935. <https://doi.org/10.1038/nrc2013>
 48. Ministerio de Turismo. (2014). Ecuador megadiverso y único en el centro del mundo – Ministerio de Turismo. Retrieved June 17, 2018, from <https://www.turismo.gob.ec/ecuador-megadiverso-y-unico-en-el-centro-del-mundo/>
 49. Mitrus I, Bryndza E, Sochanik A, S. S. (2012). Evolving models of tumor origin and progression. *Tumour Biol*, 33, 911–917.
 50. Molinski, T. F. (1993). Developments in marine natural products. Receptor-specific bioactive compounds. *Journal of Natural Products*, 56(1), 1–8. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=8450313&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
 51. National Cancer Institute. (n.d.). Diccionario de cáncer. Retrieved July 19, 2018, from <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/microambiente-tumoral>
 52. National Cancer Institute. (2013). Trasplantes de células madre formadoras de sangre. Retrieved June 20, 2018, from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/trasplante-de-celulas-madre/hoja-informativa-medula-osea-trasplante>
 53. National Cancer Institute. (2014). Medicina de precisión y terapia dirigida. Retrieved June 20, 2018, from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-dirigida>
 54. National Cancer Institute. (2015). Tipos de tratamiento del cáncer: Terapia hormonal. Retrieved June 20, 2018, from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-hormonal>
 55. National Cancer Institute. (2017a). Tipos de tratamiento. Retrieved June 20, 2018, from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>
 56. National Cancer Institute. (2017b). Tipos de tratamiento del Cáncer. Retrieved June 6, 2018, from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>
 57. Newman, D. J., & Cragg, G. M. (n.d.). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70(3), 461–477. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=17309302&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
 58. Nowell, P., Jensen, J., Gardner, F., Murphy, S., Chaganti, R. S., & German, J. (1976). Chromosome studies in “preleukemia”. III. Myelofibrosis. *Cancer*, 38(5), 1873–1881. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=991102&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
 59. Nuijen, B., Bouma, M., Manada, C., Jimeno, J. M., Schellens, J. H., Bult, A., & Beijnen, J. H. (2000). Pharmaceutical development of anticancer agents derived from marine sources. *Anti-Cancer Drugs*, 11(10), 793–811. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=11142687&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubm

- ed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
60. OMS-Tratamiento del cáncer. (2012). Retrieved August 13, 2018, from <http://www.who.int/cancer/treatment/es/>
 61. Organización Mundial de la Salud. (2014). Principales causas de muerte. Retrieved June 12, 2018, from <http://www.paho.org/data/index.php/es/mnu-mortalidad/principales-causas-de-muerte.html?showall=&start=2>
 62. Pacheco Ojeda, L. A. (2017). Epidemiología del Cáncer en el Ecuador | Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Quito). *Epidemiología Del Cáncer En El Ecuador*, 2. Retrieved from http://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/CIENCIAS_MEDICAS/article/view/622
 63. Paolo Boffetta, D., Pearce, N., Boffetta Manolis Kogevinas, P., Boffetta, P., Saracci, R., Kogevinas, M., ... de origen ambiental Bruce Armstrong Paolo Boffetta, C. K. (2000). *CANCER EL CUERPO HUMANO Cancerígenos profesionales*. Retrieved from https://www.cso.go.cr/tematicas/higiene/enciclopedia/07_cancer.pdf
 64. Pietra, F. (1997). Secondary metabolites from marine microorganisms: Bacteria, protozoa, algae and fungi. Achievements and prospects. *Natural Product Reports*, 14(5), 453–464. <https://doi.org/10.1039/np9971400453>
 65. Plaza, A., Bifulco, G., Keffer, J. L., Lloyd, J. R., & Baker, H. L. (2009). Celebesides A-C and Theopapuamides B-D, Depsipeptides from an Indonesian Sponge that Inhibit HIV-1 Entry. *Journal of Organic Chemistry*, 74(2). Retrieved from <http://pubmedcentralcanada.ca/pmcc/articles/PMC2656767/> LK - link%7Chttp://pubmedcentralcanada.ca/pmcc/articles/PMC2656767/ SRC - BaiduScholar FG - 0
 66. Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet Global Health*, 4(9), e609–e616. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30143-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30143-7)
 67. Prosser, M. E., Brown, C. E., Shami, A. F., Forman, S. J., & Jensen, M. C. (2012). Tumor PD-L1 co-stimulates primary human CD8 + cytotoxic T cells modified to express a PD1 : CD28 chimeric receptor. *Molecular Immunology*, 51(3–4), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.03.023>
 68. Redaccion Médica. (2016). Abierta primera sala de terapia biológica en Ecuador. Retrieved June 21, 2018, from <https://www.redaccionmedica.ec/secciones/salud-publica/abierta-primera-sala-de-terapia-biol-gica-en-ecuador-88215>
 69. Research, A. A. for C. (2012). Molecular Pathways PD-L1.
 70. Rocha-Santos, T., & Duarte, A. (2014). Introduction to the analysis of bioactive compounds in marine samples. *Elsevier*, 0–1.
 71. Ruiz-Torres, V., Encinar, J. A., Herranz-López, M., Pérez-Sánchez, A., Galiano, V., Barrajón-Catalán, E., & Micol, V. (2017). An updated review on marine anticancer compounds: The use of virtual screening for the discovery of small-molecule cancer drugs. *Molecules*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/molecules22071037>
 72. Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2017). Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21387>
 73. Silva, R., Gullo, I., & Carneiro, F. (2016). The PD-1:PD-L1 immune inhibitory checkpoint in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: a comprehensive review and future perspectives. *Porto Biomed. J. Porto Biomedical Journal*, 1(1), 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.pbj.2016.03.004>
 74. Sociedad Española de Oncología Médica(SEOM). (2018). ¿Qué es la Medicina de Precisión? Retrieved June 20, 2018, from <https://www.seom.org/es/informacion-sobre-el-cancer/i-que-es-la-medicina-de-precision>
 75. SOLCA. (2017, September). No Title. *Incidencia de Cáncer En Quito 2011-2013*, 26. Retrieved from <http://www.solcaquito.org.ec/index.php/publicaciones/epidemiologia/cancer-en->

- quito-2010-2013
76. Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719–724. <https://doi.org/10.1038/nature07943>
 77. Tao, L. H., Zhou, X. R., Li, F. C., Chen, Q., Meng, F. Y., Mao, Y., ... Chen, W. C. (2017). A polymorphism in the promoter region of PD-L1 serves as a binding-site for SP1 and is associated with PD-L1 overexpression and increased occurrence of gastric cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(3), 309–318. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1936-0>
 78. The Wistar Institute. (2006). Does Natural Selection Drive The Evolution Of Cancer? -- ScienceDaily. Retrieved July 19, 2018, from <https://www.sciencedaily.com/releases/2006/11/061117114616.htm>
 79. Triplett, T. A., Garrison, K. C., Marshall, N., Donkor, M., Blazeck, J., Lamb, C., ... Georgiou, G. (2018). Reversal of indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated cancer immune suppression by systemic kynurenine depletion with a therapeutic enzyme. *Nature Biotechnology*, 36(8), 758. <https://doi.org/10.1038/nbt.4180>
 80. Triviño, Miguel; Cardenas, M. (2014). Caracterización bioecológica de siete sitios de buceo situados alrededor del islote el Pelado en Ayangue. *Bioelite S.A*, 108.
 81. Tsukada, M., Fukai, M., Miki, K., Shiraishi, T., Suzuki, T., Nishio, K., ... Koyama, K. (2011). Chemical constituents of a marine fungus, *Arthrinium sacchari*. *Journal of Natural Products*, 74(7), 1645–1649. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=21718054&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
 82. Valeria Perasso. (2016). 10 gráficos para entender el grave impacto del cáncer en el mundo. Retrieved June 20, 2018, from https://www.bbc.com/mundo/noticias/2016/02/160203_cancer_graficos_impacto_m_en
 83. Vik, A., Hedner, E., Charnock, C., Samuelson, O., Larsson, R., Gundersen, L.-L., & Bohlin, L. (2006). (+)-agelasine D: improved synthesis and evaluation of antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Natural Products*, 69(3), 381–386. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=16562840&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum
 84. Wei, X., Nieves, K., & Neopetrosiamine, A. (2010). Rodríguez, A. . biologically active bis-piperidine alkaloid from the caribbean sea sponge neopetrosia proxima. *Bioorg Med Chem Lett*, 5905–5908.
 85. Worldcancerday.org. (2012). 10 gráficos para entender el grave impacto del cáncer en el mundo - BBC News Mundo. Retrieved June 17, 2018, from https://www.bbc.com/mundo/noticias/2016/02/160203_cancer_graficos_impacto_m_en
 86. Zonder, J. A., Shields, A. F., Zalupski, M., Chaplen, R., Heilbrun, L. K., Arlauskas, P., & Philip, P. A. (2001). A phase II trial of bryostatin 1 in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 7(1), 38–42. Retrieved from www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11205915

ANEXOS

Se presenta como material adicional 2 tablas:

1.- Tabla de las principales mutaciones que se han descubierto en el gen PD-L1.

Hugo Symbol	Entrez Gene Id	Ncbi Build	Chr	Transcripción de anotación
CD274	29126	37	9	ENST00000381577.3

2.- Fase de evaluación clínica de varios Compuestos Bioactivos

Principales Mutaciones del Gen PD-L1/CD274

Código de barras de la muestra tumoral	Posición de salida	Posición final	Clasificación de variantes	Tipo de variante	Alelo de referencia	Tumor Seq alelo	Cambio de proteína
AMO1_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	5462893	5462893	Nonsense_Mutation	SNP	G	T	p.E152*
CI1_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	5456116	5456116	Start_Codon_SNP	SNP	G	T	p.M1I
DMS454_LUNG	5463102	5463102	Silent	SNP	A	T	p.T221T
HEC108_ENDOMETRIUM	5457184	5457184	Missense_Mutation	SNP	T	C	p.L53P
SNU520_STOMACH	5456164	5456164	Splice_Site	SNP	C	T	p.N17N
TOV21G_OVARY	5457316	5457316	Missense_Mutation	SNP	C	T	p.A97V
NCIH2171_LUNG	5466801	5466801	Silent	SNP	C	T	p.I274I
HCC1569_BREAST	5457370	5457370	Missense_Mutation	SNP	T	C	p.M115T
JHH7_LIVER	5457282	5457282	Missense_Mutation	SNP	C	T	p.R86W
MFE319_ENDOMETRIUM	5465606	5465606	Splice_Site	SNP	G	T	p.G264W
SCABER_URINARY_TRACT	5465498	5465498	Splice_Site	SNP	G	C	
D542MG_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	5462908	5462908	Missense_Mutation	SNP	G	A	p.A157T
HEC1_ENDOMETRIUM	5462999	5462999	Missense_Mutation	SNP	A	T	p.E187V

KYSE270_OESOPHAGUS	5462878	5462878	Missense_Mutation	SNP	G	T	p.V147F
MCC13_SKIN	5467856	5467856	Silent	SNP	G	A	p.E289E
OC314_OVARY	5457306	5457306	Missense_Mutation	SNP	C	A	p.L94M
OMC1_CERVIX	5467854	5467854	Missense_Mutation	SNP	G	A	p.E289K
SNU1040_LARGE_INTESTINE	5457230	5457230	Silent	SNP	G	A	p.V68V
HMEL_BREAST	5465572	5465572	Silent	SNP	T	C	p.G252G
HS739T_BREAST	5463099	5463099	Silent	SNP	T	C	p.H220H
NCIH2347_LUNG	5465590	5465590	Silent	SNP	C	T	p.I258I

Fase de evaluación clínica de Varios Compuestos Bioactivos

Estado Clínico	Nombre del compuesto	Organismo Marino	Clase Química	área designada	Modo de acción	Compañía o Institución	Referencia
fase III	Plitidepsina	Tunicado	Depsipeptido	Anti-cáncer	Induce la detención o apoptosis del ciclo celular	PharmaMar	(Munoz-Alonso, y otros, 2009)
	Gemcitabina (GEM) (GENMA)	Eponja	Nucleósido	Anti-cáncer	Inhibidor del ribonucleótido reductasa Reemplaza a la citidina durante la replicación del ADN	Eli Lilly and Company	(Krege, y otros, 2014)
fase II	Glembatumumab vedotina	Molusco	Anticuerpo-droga conjugada	Cáncer de mama y melanoma	Se dirige a la glicoproteína NMB (una proteína sobreexpresada por múltiples tipos de tumores)	Celldex Therapeutics	(Bendell, y otros, 2014)
	Elisidepsina	Molusco	Depsipeptido	Anti-cáncer	Agente antineoplásico, modificando los lípidos de la membrana celular	PharmaMar	(Molina-Guijarro, y otros, 2015)
	PM1004	Nudibranquio	Alcaloide	Anti-cáncer	ADN-uniión	PharmaMar	(Mandin & Gottesman, 2009)
	Pseudopterosinas	Coral blando	Diterpeno glucósido	Cicatrización de la herida	Metabolismo eicosanoide	La Universidad de California	(Look, Fenical, Jacobs, & Clardy, 1986)
	IPL576,092 (derivado de Contignasterol)	Eponja	Diversas	Antiinflamatorio	Inhibición de infiltración de leucocitos e hipersensibilidad durante la alergia	Aventis Pharma	(Liu, Huang, & Zhu, 2013)

Fase I/II	PM-10450 (Zalypsis)	Esponja	Alcaloide	Medicamento contra el cáncer	Inhibidor de la transcripción	PharmaMar	(Petek & Jones, 2014)
	Discodermolida	Esponja	Policétidos	Medicamento contra el cáncer	Agente interferente de microtúbulos	Novartis	(Bhatnagar & Kim, 2010)
Fase I	Bryostatina-1	Bryozoa	Policétidos	Medicamento contra el cáncer	Proteína quinasa C	Instituto Nacional Contra el Cáncer	(Diaz, y otros, 2015)
	Pinotuzumab vedotina	Molusco	Anticuerpo-droga conjugada	Linfoma no Hodgkin, leucemia	Estimulante de apoptosis; inhibidor de mitosis e inhibidor de tubulina	Genentech, Inc.	(Forero-Torres, y otros, 2016)
	Tisotumab Vedotina (HuMax®-TF-ADC)	Molusco	Anticuerpo-droga conjugada	Cáncer de ovario, endometrio, cuello uterino y próstata	Antineoplásico, conjugado de drogas, inmunotoxina y anticuerpos monoclonales	Genmab and Seattle Genetics	(Kim, y otros, 2007)
	HT1286 (derivado de Hemiasterlina)	Esponja	Anticuerpo-droga conjugada	Medicamento contra el cáncer	Agente interferente de microtúbulos	Wyeth	(Bhatnagar & Kim, 2010)
	LAF389 (derivado de bengamida B)	Esponja	Tripéptido	Medicamento contra el cáncer	Inhibidor de metionina aminopeptidasa	Novartis	(Bhatnagar & Kim, 2010)
	Hemiasterlina (E7974)	Esponja	Péptido	Medicamento contra el cáncer	Agente interferente de microtúbulos	Eisai Inc.	(Bhatnagar & Kim, 2010)
	PM-060184	Esponja	Policétidos	Medicamento contra el cáncer	Agente interferente de microtúbulos	PharmaMar	(Newman & Cragg, 2014)

	NVP-LAQ824 (Derivado de Psammaplin, Dacinostat)	Esponja	Diverso	Medicamento contra el cáncer	Inhibidores de histona deacetilasa (HDAC) o inhibidores de ADN metiltransferasas (DNMT)	Novartis Pharma	(Sleiman, y otros, 2014)
--	--	---------	---------	---------------------------------	--	--------------------	-----------------------------