



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE  
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO  
POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**“Cristalización de la Ornitina descarboxilasa  
humana unida a ligandos análogos a la lisina”**

**TESIS**

Que presenta:

**MicroBiol. Luis Janiel Navarro González**

Para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

En la especialidad de:

**BIOQUÍMICA**

**Directores de la Tesis:**

Dr. Edgar Morales Ríos

Dra. María Viridiana Olin Sandoval

**Ciudad de México**

**Agosto, 2023**

El presente proyecto de tesis se desarrolló en el Laboratorio No. 2 “Estudios estructurales de motores moleculares” del Departamento de Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), bajo la dirección del Dr. Edgar Morales Ríos y la Dra. María Viridiana Olin Sandoval, y el asesoramiento del Dr. Ricardo Mondragón Flores y el Dr. José Víctor Calderón Salinas. Se contó con el financiamiento de una beca académica asignada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) con el No. CVU 1145094, a quien le expreso mis más sinceros agradecimientos. También se agradece a la Dra. Adela Rodríguez Romero, responsable del Laboratorio de Estructura de Proteínas del Laboratorio Nacional de Estructura de Biomacromoléculas (LANEM), al Dr. Armando Luján Montelongo y al M. en C. Marco Antonio Leyva Ramírez del Laboratorio No. 18 de Difracción de rayos X del Departamento de Química del Cinvestav, por las facilidades en el uso de sus difractómetros.

**Al Cinvestav, y en especial al Departamento de Bioquímica y a su Colegio de Profesores,** por haberme aceptado en su prestigioso programa de Maestría y ofrecerme la oportunidad de crecer profesionalmente bajo su tutela. Desde el primer momento, me he sentido apoyado y acompañado por todo su equipo, lo cual ha sido fundamental para afrontar los desafíos académicos y personales que se han presentado en esta etapa de mi formación. El compromiso y la excelencia de los profesores han sido fuentes inagotables de inspiración. Su dedicación a la enseñanza y la investigación han enriquecido mi experiencia y han ampliado mis horizontes en el campo de la bioquímica.

**A mis directores de tesis: el Dr. Edgar Morales Ríos y la Dra. María Viridiana Olin Sandoval,** por su inestimable guía, apoyo y dedicación durante el desarrollo de mi tesis de maestría. Su experiencia, paciencia y aliento fueron fundamentales para que pudiera llevar a cabo este proyecto con éxito. Su compromiso con mi desarrollo profesional ha dejado una huella duradera en mi vida y en mi formación como investigador. Me siento afortunado de haber contado con su mentoría y liderazgo durante este importante capítulo de mi carrera. Sin duda, sus enseñanzas perdurarán y seguirán inspirándome en futuros desafíos.

**A mis asesores de tesis: el Dr. José Víctor Calderón Salinas y el Dr. Ricardo Mondragón Flores,** por su apoyo y orientación durante todo el proceso de mi tesis. Su guía constante y sus valiosas sugerencias me permitieron perfeccionar el trabajo desarrollado y cumplir con éxito los objetivos trazados. Su paciencia y disposición para responder mis preguntas y brindarme asesoramiento han sido ejemplares, y han enriquecido mi formación académica.

**A toda mi familia, en especial a mis padres, a mi hermano Jasiel, a mi prima Norma y a mis tíos Dalia y Luisito,** porque sin su apoyo incondicional no habría podido llegar hasta este punto tan importante de mi carrera. No encuentro palabras suficientes para expresar lo afortunado que me siento de tenerlos en mi vida y de contar con su ayuda en cada paso que doy. Sin ustedes, mi camino habría sido mucho más difícil. Su amor, aliento y confianza han sido un faro que me ha guiado en los momentos de incertidumbre y desafíos, y me han impulsado a luchar por mis metas con pasión y determinación. Gracias por estar siempre a mi lado, sosteniendo mis sueños y celebrando cada uno de mis logros como si fueran propios. Su respaldo inquebrantable me ha dado la fortaleza para enfrentar los obstáculos y superar las adversidades con valentía. Gracias, de

corazón, por ser mi familia y mi mayor apoyo. Este logro es también suyo, y cada día agradezco a la vida por haberme bendecido con el amor y la protección de cada uno de ustedes.

**A una de las personas más valiosas que México me ha permitido conocer: Andy**, por estar a mi lado en cada momento, por escucharme con paciencia y comprensión, y por ser mi confidente y mejor amigo. Gracias por apoyarme incondicionalmente y brindarme tu amor y protección. Cada día a tu lado se convierte en una aventura única. Gracias por enseñarme a ser cada día mejor persona, y por compartir tus consejos y experiencias. Saber que cuento contigo en cada paso del camino me da la fortaleza para seguir adelante, sin importar lo que nos depare el futuro. Gracias por aceptar ser mi compañero de vida, por compartir tus sueños y aspiraciones conmigo, y por hacerme sentir amado y valorado en todo momento. Gracias por ser la luz de mi camino. Te amo.

**A mis compañeritos de Maestría: Jessica (Chichi), Daniel (Buffalobill), Daniel Ignacio (Nachito), Jorge (Jorch) y Karim**, por su apoyo invaluable durante este largo camino recorrido. Sin lugar a duda, se han ganado un lugar especial en mi corazón pues han sido un pilar fundamental durante todo mi crecimiento académico y personal. Han sido muchos los desafíos que superamos juntos. Aunque nuestras vidas tomen rumbos diferentes, siempre recordaré con cariño y gratitud el tiempo que compartimos en el salón de clases, en nuestros proyectos de investigación y en las largas horas de estudio. Cada uno de ustedes ha aportado algo único y valioso a nuestra dinámica de grupo, y estoy convencido de que nuestras interacciones han dejado una huella duradera en cada uno de nosotros. Espero que sigamos manteniendo esta hermosa conexión y que nuestra amistad continúe creciendo con el paso del tiempo. Gracias por ser parte de mi vida durante esta etapa tan significativa, y les deseo lo mejor en todos sus proyectos futuros.

**A mis compañeros del lab de Bioquímica: Jess, Niky, Sergio, Caro, Quique y Alejandro, y del lab de Biotecnología: Betty, Zully, Richy, Zuriel, Gaby, Oscar, Gus, Abel y Fany**, por hacer del laboratorio un lugar excepcional para trabajar y aprender juntos. Su amistad, colaboración y compañerismo han hecho que cada día sea significativo y enriquecedor. Compartir este tiempo con ustedes ha sido una experiencia inolvidable, y no puedo evitar sentirme afortunado de tener compañeros como ustedes en este comprometido camino de la ciencia. Gracias por las discusiones intelectualmente estimulantes, por el apoyo mutuo en los momentos difíciles y por celebrar juntos los éxitos alcanzados. Cada uno de ustedes ha dejado una huella positiva en mi vida y en mi formación como científico. Aprecio enormemente el esfuerzo y la dedicación que ponen en cada

proyecto y la disposición para compartir sus conocimientos y habilidades. Espero que podamos mantener esta conexión especial incluso más allá de nuestros días de laboratorio.

**Al colectivo de trabajadores y al resto de estudiantes del Departamento de Bioquímica, en especial a Angie, a Priss, a Leti, a Brenda y al coordinador el Dr. Ávila,** por hacer de este lugar un ambiente excepcional de aprendizaje y crecimiento. Su apoyo, colaboración y compañerismo han sido fundamentales para hacer frente a los desafíos académicos y para fomentar un ambiente de trabajo enriquecedor.

**A César,** por todo su apoyo al inicio de este proceso, sin el cual no hubiese sido posible cumplir este sueño. Mis saludos desde la distancia y los mejores deseos para ti y para tu familia.

**A mi querida comunidad de cubanos en México que tanto quiero, en especial a mi hermanito Chuchín, a Mai, Mama, Miki, Yani, Laury, Pupi, Normita (mi compañera de viaje) y el Lachy,** por la increíble familia que hemos formado aquí, lejos de nuestra tierra natal y de nuestros seres queridos. Hemos construido un lazo de amistad y hermandad inquebrantable que perdurará a través del tiempo y la distancia. Cada encuentro, cada celebración y cada conversación compartida han sido tesoros invaluable que han enriquecido mi vida de formas indescriptibles. El apoyo y la solidaridad que hemos demostrado entre nosotros en los momentos de alegría y también en los desafíos que hemos enfrentado han sido la muestra más sincera de la unión y el amor que nos caracteriza. Juntos, hemos creado un espacio donde podemos sentirnos en casa y valorados, donde nuestras tradiciones y costumbres se mantienen vivas y nos permiten mantener intacto el espíritu de nuestra querida Cuba. En cada paso de este camino, sé que puedo contar con su respaldo y su compañía, y eso es algo que valoro más de lo que las palabras pueden expresar. Les agradezco de corazón por ser mi segunda familia y por hacer de este país un lugar aún más especial. Sean que siempre tendrán un lugar en mi corazón y en mi vida.

ÍNDICE

<b>LISTADO DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>XIII</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
1.1. Poliaminas .....	3
1.1.1. Estructura química y distribución .....	3
1.1.2. Funciones de las PAs en la célula .....	5
1.1.3. Metabolismo de las PAs en mamíferos.....	10
1.1.4. Rol de las PAs en cáncer.....	12
1.2. Ornitina descarboxilasa humana (HsODC) .....	14
1.2.1. Generalidades.....	14
1.2.2. Regulación de la ODC .....	17
1.2.3. ODC y cáncer.....	22
1.2.4. Inhibidores de la ODC .....	26
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>31</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>36</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>36</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
5.1. Objetivo general .....	36
5.2. Objetivos particulares .....	36
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
6.1. Cepas bacterianas y medios para su cultivo .....	37
6.2. Enzimas .....	37
6.3. Vector de expresión .....	37
6.4. Preparación de células de <i>E. coli</i> SoluBL21 competentes por el método químico .....	38
6.5. Transformación de células <i>E. coli</i> TOP10 y SoluBL21 quimiocompetentes.....	39
6.6. Purificación de ADN plasmídico a pequeña escala.....	39
6.7. Digestión del ADN plasmídico con enzimas de restricción .....	40

6.8. Electroforesis en gel de agarosa .....	41
6.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	41
6.10. Sobreexpresión de la HsODC recombinante en células SoluBL21 .....	42
6.11. Purificación y cuantificación de la HsODC .....	42
6.12. Análisis de la HsODC purificada por SDS-PAGE y Western blot .....	45
6.12.1. Tinción con AgNO <sub>3</sub> .....	45
6.12.2. Detección de la HsODC mediante Western blot.....	46
6.13. Cristalización de la HsODC .....	46
6.13.1. Preparación del licor madre .....	46
6.13.2. Técnica de difusión de vapor en gota sentada .....	47
6.13.3. Optimización de las condiciones de cristalización .....	48
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
7.1. Purificación de ADN plasmídico y digestión con enzimas de restricción .....	49
7.2. Purificación y cuantificación de la HsODC recombinante.....	50
7.3. Análisis de la pureza de la HsODC purificada .....	54
7.4. Cristalización de la HsODC .....	55
7.4.1. Optimización de las condiciones de cristalización .....	57
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>61</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>74</b>
<b>11. REFERENCIAS .....</b>	<b>75</b>

## LISTADO DE ABREVIATURAS

1,3-DAP	1,3- diaminopropano
ACA	Ácido $\epsilon$ -aminocaproico
ADC	Arginina descarboxilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AdoMetDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
AGMAT	Agmatinasa
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPA	Receptor-canal ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
APA	1-amino-oxi-3-aminopropano
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNpi	ARN pequeño de interferencia
ARNt	ARN de transferencia
ATP	Trifosfato de adenosina
AUF1	Factor 1 de unión a elementos ricos en AU (del inglés <i>AU-rich binding factor 1</i> )
AZ	Antizima
AZI	Inhibidor de la antizima
BCA	Ácido bicinconínico (del inglés <i>Bicinchoninic acid</i> )
BSA	Albúmina de suero bovino (del inglés <i>Bovine serum albumin</i> )
Cad	Cadaverina
Cct2	Chaperonina que contiene polipéptido 1 del complejo T, subunidad beta
CDK2	Cinasa dependiente de ciclina 2 (del inglés <i>Cyclin-dependent kinase 2</i> )
CDK4	Cinasa dependiente de ciclina 4 (del inglés <i>Cyclin-dependent kinase 4</i> )
CKS1	Subunidad 1 de la cinasa dependiente de ciclina
COX4	Subunidad 4 de la citocromo c oxidasa
CRE	Elemento de respuesta al AMP cíclico
CREB	Proteína de unión a CRE (del inglés <i>cAMP response element-binding</i> )
CUL1	Culina 1
DFMO	$\alpha$ -Difluorometilornitina
DHS	Desoxihipusina sintasa



DL-HAVA	Ácido DL- $\alpha$ -hidrazino-delta-aminovalérico
DOHH	Desoxihipusina hidroxilasa
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eIF1A	Factor de iniciación de la traducción eucariota 1A
eIF4E	Factor de iniciación de la traducción eucariota 4E
eIF4E-BP1	Proteína de unión 1 a eIF4E (del inglés <i>eIF4E Binding Protein 1</i> )
eIF5A	Factor de iniciación de la traducción eucariota 5A
EP300	Proteína de unión a E1A p300 (del inglés <i>E1A-binding protein p300</i> )
Fc	Fragmento cristalizable (del inglés <i>Fragment crystallizable</i> )
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas (del inglés <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> )
Glc-1	Glipicano-1
Hnrpl	Riboproteína L nuclear heterogénea (del inglés <i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L</i> )
HsODC	Ornitina descarboxilasa humana
HuR	Antígeno humano R (del inglés <i>Human antigen R</i> )
IMAC	Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (del inglés <i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i> )
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma (del inglés <i>Internal Ribosome Entry Site</i> )
ITP	Inhibidores del transporte de poliaminas
$K_d$	Constante de disociación aparente
$K_i$	Constante de inhibición
$K_{ir}$	Canales de $K^+$ de rectificación interna
$K_m$	Constante de afinidad
LDC	Lisina descarboxilasa
LM	Licor madre
MAP	(2R,5R)-6-heptino-2,5-diamina
MAT	Metionina adenosil transferasa
NCAO	N- $\omega$ -cloroacetil-L-ornitina

NMDA	Receptor-canal N-metil-D-aspartato
NQO1	NAD(P)H quinona oxidoreductasa
ODC	Ornitina descarboxilasa
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxilo
ORF	Marco abierto de lectura (del inglés <i>Open Reading Frame</i> )
p16	Inhibidor 2A de cinasa dependiente de ciclina
p21Cip1 <sup>WAF1</sup>	Inhibidor 1 de cinasa dependiente de ciclina (del inglés <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i> )
p27 <sup>Kip1</sup>	Inhibidor 1B de cinasa dependiente de ciclina (del inglés <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i> )
p53	Antígeno tumoral celular p53
PAO	Poliamina oxidasa
PAs	Poliaminas
PDB	Banco de Datos de Proteínas (del inglés <i>Protein Data Bank</i> )
PDVF	Difluoruro de polivinilideno (del inglés <i>Polyvinylidene difluoride</i> )
PEG	Polietilenglicol
Pgam1	Fosfoglicerato mutasa 1 (del inglés <i>Phosphoglycerate mutase 1</i> )
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PLP	Piridoxal 5'-fosfato
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Put	Putrescina
RBS	Sitio de unión a ribosoma (del inglés <i>Ribosome binding site</i> )
RBX1	Proteína <i>Ring-box 1</i>
ROS	Especies reactivas del oxígeno (del inglés <i>Reactive oxygen species</i> )
SCF <sup>Skp2</sup> E3	Complejo de ligasa de ubiquitina
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SEC	Cromatografía de exclusión molecular (del inglés <i>Size Exclusion Chromatography</i> )
SKP1	Proteína 1 asociada a la cinasa de la fase S
SKP2	Proteína 2 asociada a la cinasa de la fase S o p45

SLC	Transportadores de solutos (del inglés <i>Solute carriers</i> )
SMO	Espermina oxidasa
Sp1	Proteína de especificidad 1 (del inglés <i>Specificity protein 1</i> )
Spd	Espermidina
Spm	Espermina
SSAT	Espermina/espermidina N <sup>1</sup> -acetiltransferasa
Sulf	Sulfadiazina
TA	Temperatura ambiente
TbODC	Ornitina descarboxilasa de <i>Trypanosoma brucei</i>
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TEV	Virus del grabado del tabaco (del inglés <i>Tobacco Etch Virus</i> )
TIM	Triosa-fosfato isomerasa
UTR	Región no traducida (del inglés <i>Unstranlated region</i> )
WT1	Supresor tumoral WT1 (del inglés <i>Wilms' tumor-1</i> )

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Contenido intracelular de PAs en células de tres organismos diferentes: <i>E. coli</i> , <i>N. crassa</i> y células de riñón de hámster .....	<b>4</b>
<b>Tabla 2.</b> Algunos compuestos desarrollados que inhiben directamente a la ODC.....	<b>27</b>
<b>Tabla 3.</b> Estructuras de la HsODC obtenidas por cristalografía de rayos X y registradas en la Base de Datos de Proteínas .....	<b>31</b>
<b>Tabla 4.</b> Valores de constantes de afinidad (Km) de la L-ornitina y la L-lisina reportados para las ODCs de <i>R. norvegicus</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....	<b>34</b>
<b>Tabla 5.</b> Composición de la mezcla de reacción utilizada para el ensayo de restricción.....	<b>41</b>
<b>Tabla 6.</b> Composición de las mezclas para preparar los geles de poliacrilamida .....	<b>42</b>
<b>Tabla 7.</b> Composición de la muestra utilizada en las diferentes placas controles.....	<b>48</b>

ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Estructura química de las PAs más comunes y biológicamente relevantes.....3

**Figura 2.** Procesos celulares en los que intervienen las PAs.....5

**Figura 3.** Mecanismos principales por los que las PAs modulan la síntesis de proteínas en células eucariotas.....7

**Figura 4.** Vías de síntesis, degradación y transporte de PAs en una célula de mamífero .....10

**Figura 5.** Estructura tridimensional de un homodímero de HsODC y su cofactor PLP .....15

**Figura 6.** Regulación transcripcional del gen *odc1* por c-Myc .....18

**Figura 7.** Mecanismos de degradación de la ODC por los proteosomas 26S y 20S .....20

**Figura 8.** Vías efectoras de c-Myc y Ras que contribuyen a la sobreexpresión de la ODC y el desarrollo de cáncer.....24

**Figura 9.** Estructura 3D de un homodímero de la TbODC + PLP + DFMO .....28

**Figura 10.** Estructura 3D de un homodímero de la HsODC + PLP + APA + Cad .....34

**Figura 11.** Representación esquemática del vector de expresión pRSET-HsODC.....38

**Figura 12.** Protocolo para la extracción y purificación de ADN plasmídico por el *FastGene® Plasmid Mini Kit* .....40

**Figura 13.** Inducción de la expresión de la HsODC por IPTG en *E. coli* SoluBL21.....43

**Figura 14.** Representación esquemática de la composición inicial de la caja de licor madre utilizada para la cristalización de la HsODC .....47

**Figura 15.** Preparación de las placas MRC para la cristalización de la HsODC por la técnica de difusión de vapor en gota sentada .....47

**Figura 16.** Digestión enzimática del pRSET-HsODC purificado .....49

**Figura 17.** Purificación de la HsODC-6His por IMAC (primera etapa) .....50

**Figura 18.** Primer paso de purificación de la HsODC-6His por IMAC.....51

**Figura 19.** Digestión de la HsODC-6His con la proteasa TEV.....51

**Figura 20.** Purificación de la HsODC sin etiqueta de His (segunda etapa) por IMAC.....52

**Figura 21.** Purificación de la HsODC sin etiqueta de His por SEC (tercera etapa).....53

**Figura 22.** Tercer paso de purificación de la HsODC por SEC .....53

**Figura 23.** Verificación de la pureza de la HsODC .....54

**Figura 24.** Identificación de la HsODC purificada por Western blot .....55

**Figura 25.** Efecto de la adición de Sulf (10 mM y 1 mM) en la cristalización de la HsODC .....56

**Figura 26-1.** Optimización de las condiciones de cristalización de la HsODC en presencia de Sulf (1 mM).....57

**Figura 26-2.** Optimización de las condiciones de cristalización de la HsODC en presencia de Sulf (1 mM).....58

**Figura 27.** Cristales de la HsODC en presencia de ACA (1 mM) .....59

**Figura 28.** Ensayo de difracción de rayos X de uno de los cristales de la HsODC obtenidos en presencia de Sulf (1 mM) .....59

**RESUMEN**

La ornitina descarboxilasa (ODC) participa en el primer paso de la síntesis de las poliaminas (PAs), las cuales están involucradas en una amplia variedad de procesos celulares. Esta enzima descarboxila a la L-ornitina para formar putrescina. Se ha encontrado que algunas ODC, incluyendo a la humana (HsODC), también utilizan a la L-lisina como sustrato para producir cadaverina. En ese mismo sentido, la estructura tridimensional (3D) de la HsODC que ha sido resuelta, muestra que la cadaverina, producto de este sustrato alternativo, se une a la enzima, pero interesantemente, en un sitio alostérico. El metabolismo de PAs se encuentra involucrado en el desarrollo de cáncer, de ahí que se considere a la HsODC como un blanco terapéutico para el tratamiento de esta enfermedad. Los inhibidores que han sido desarrollados contra esta enzima producen efectos tóxicos a altas dosis, lo cual exige el descubrimiento de inhibidores novedosos y biológicamente seguros con efectos anti-proliferativos. Teniendo en cuenta lo anterior, en nuestro grupo se determinó que la sulfadiazina y al ácido aminocaproico se unen a la enzima y, por tanto, estabilizan su conformación nativa. La estructura 3D de la HsODC unida a nuevos inhibidores en el sitio catalítico o el alostérico, permitirá comprender el mecanismo de inhibición involucrado. Por ello, el objetivo de este proyecto consistió en determinar las condiciones óptimas de cristalización de la HsODC en complejo con ligandos análogos a la lisina, lo cual contribuirá a la obtención de su estructura 3D mediante cristalografía de rayos X.

La HsODC se sobreexpresó en células de *Escherichia coli* con el uso del vector de expresión pRSET-HsODC, que codifica para la proteína de interés. La estrategia de purificación de la HsODC consistió en tres etapas consecutivas de cromatografía, que permitieron obtener un rendimiento de aproximadamente 4 mg totales de proteína por litro de cultivo. Se corroboró la identidad de la proteína mediante Western blot con el empleo de anticuerpos policlonales específicos anti-HsODC producidos en nuestro laboratorio, y se determinó su pureza por medio de SDS-PAGE teñido con plata. La cristalización de la HsODC en presencia de los ligandos seleccionados se realizó por el método de difusión de vapor en gota sentada. Se optimizaron las condiciones de cristalización de forma tal que se obtuvo un gradiente de precipitante y de sal en el cual, los cristales se repetían en todas las preparaciones de proteína. Aunque los cristales obtenidos presentaron un tamaño apropiado (80 - 140  $\mu\text{m}$  de largo y 30 - 40  $\mu\text{m}$  de grosor), los ensayos de difracción de rayos X realizados no han ofrecido la cantidad y calidad de puntos de difracción suficientes para poder determinar los parámetros de celda unitaria.

**ABSTRACT**

Ornithine decarboxylase (ODC) participates in the first step of polyamine (PAs) biosynthesis, which are involved in a wide variety of cellular processes. This enzyme decarboxylates L-ornithine to form putrescine. It has been found that some ODCs, including human ODC (HsODC), also use L-lysine as a substrate to produce cadaverine. Furthermore, the resolved three-dimensional (3D) structure of HsODC shows that cadaverine, the product of this alternative substrate, binds to the enzyme, interestingly, at an allosteric site. The metabolism of PAs is implicated in cancer development, thus making HsODC a therapeutic target for the treatment of this disease. Inhibitors developed against this enzyme have shown toxic effects at high doses, which demands the discovery of novel and biologically safe inhibitors with anti-proliferative effects. Considering this, our group determined that sulfadiazine and aminocaproic acid bind to the enzyme and thereby stabilize its native conformation. The 3D structure of HsODC bound to new inhibitors at the catalytic or allosteric site will allow us to understand the inhibition mechanism involved. Therefore, the aim of this project was to determine the optimal crystallization conditions of HsODC in complex with lysine analog ligands, which will contribute to obtaining its 3D structure using X-ray crystallography.

HsODC was overexpressed in *Escherichia coli* cells using the pRSET-HsODC expression vector encoding the target protein. The purification strategy for HsODC involved three consecutive chromatography steps, resulting in a yield of approximately 4 mg of total protein per liter of culture. The protein identity was confirmed through Western blot analysis using specific polyclonal anti-HsODC antibodies produced in our laboratory, and its purity was determined by silver-stained SDS-PAGE. Crystallization of HsODC in the presence of the selected ligands was performed using the vapor diffusion sitting-drop method. Crystallization conditions were optimized to establish a precipitant and salt gradient in which crystals were consistently formed in all protein preparations. Although the obtained crystals had an appropriate size (80 - 140  $\mu\text{m}$  in length and 30 - 40  $\mu\text{m}$  in thickness), X-ray diffraction experiments did not yield a sufficient quantity and quality of diffraction spots to determine the unit cell parameters.

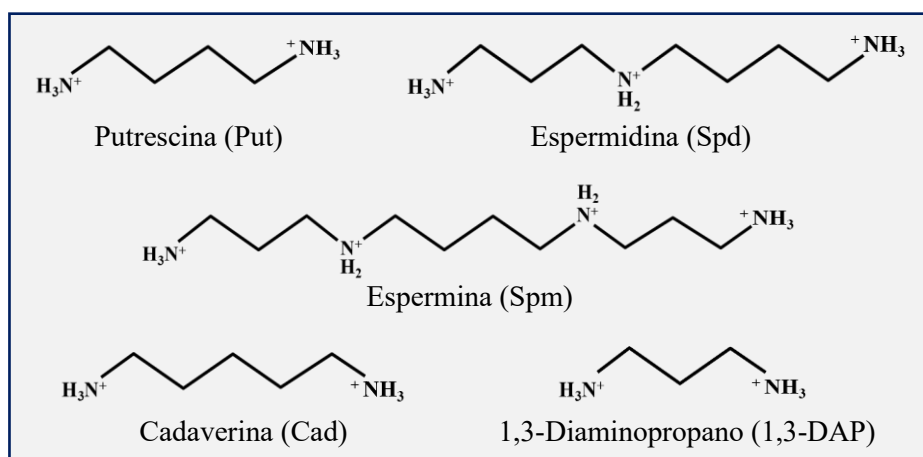


## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Poliaminas

#### 1.1.1. Estructura química y distribución

Las poliaminas (PAs) son pequeñas alquilaminas policatiónicas que están presentes en los tres grandes dominios de la vida: *Bacteria*, *Archaea* y *Eukarya* (Michael, 2016a). Se identificaron por primera vez en 1678 por Antonie van Leeuwenhoek como estructuras cristalinas en una muestra de fluido seminal humano (Tabor y Tabor, 1976; Bachrach, 2010). Desde el punto de vista estructural, la mayoría de estas moléculas están formadas por una cadena alifática lineal y flexible que contiene dos o más grupos amino. Entre las más comunes se encuentran la putrescina (Put), la espermidina (Spd), la espermina (Spm), la cadaverina (Cad) y el 1,3-diaminopropano (1,3-DAP) (Figura 1) (Miller-Fleming *et al.*, 2015; Michael, 2016a; Michael, 2016b; Lenis *et al.*, 2017).



**Figura 1. Estructura química de las PAs más comunes y biológicamente relevantes.** La Put, la Spd y la Spm son las más comunes, seguidas de la Cad y el 1,3-DAP (todos sus grupos amino se encuentran protonados a pH fisiológico) (Modificada de Michael, 2016a).

Las PAs comparten dos características distintivas: se derivan de aminoácidos y presentan todos sus grupos amino ( $^+\text{NH}_3$ ) protonados a pH fisiológico, lo que les permite interactuar con macromoléculas cargadas negativamente como los ácidos nucleicos, ciertas proteínas y los fosfolípidos (Miller-Fleming *et al.*, 2015; Michael, 2016a). La propiedad que tienen las PAs para asociarse con los aniones en la célula se basa principalmente en la cantidad de cargas positivas que cada una posee. En este sentido, la Spm es la más activa en generar interacciones aniónicas debido a su mayor número de cargas positivas, mientras que la Put, al tener menor cantidad, es menos activa (Yuan *et al.*, 2001; Moinard *et al.*, 2005).

A diferencia de los cationes inorgánicos como el  $Mg^{2+}$  o el  $Ca^{2+}$ , las PAs presentan cargas positivas distribuidas a distancias definidas a lo largo de cadenas de metileno flexibles que pueden participar en interacciones hidrofóbicas. En consecuencia, las PAs establecen interacciones más fuertes y específicas con ácidos nucleicos y macromoléculas ácidas en comparación con los cationes inorgánicos (Igarashi y Kashiwagi, 2000; Thomas y Thomas, 2001; Bachrach, 2005).

Es necesario mencionar que las concentraciones y la composición de dichas moléculas varían entre especies de organismos, incluso entre células y tejidos de un mismo organismo (Tabor y Tabor, 1976; Davis *et al.*, 1992). En la Tabla 1 se aprecia que *E. coli* presenta una mayor concentración de Put, mientras que *Neurospora crassa* y las células de riñón de hámster muestran mayor concentración de Spd y Spm.

**Tabla 1. Contenido intracelular de PAs en células de tres organismos diferentes: *E. coli*, *N. crassa* y células de riñón de hámster** (Tomada de Davis *et al.*, 1992).

Organismo	Contenido de PAs (mM)		
	Putrescina	Espermidina	Espermina
Células DR112 de <i>E. coli</i>	28.4	4.2	0
<i>Neurospora crassa</i> (fase exponencial)	0.32	7.2	0.16
Células BHK21/C13 (riñón de hámster)	0.13	2.07	1.09

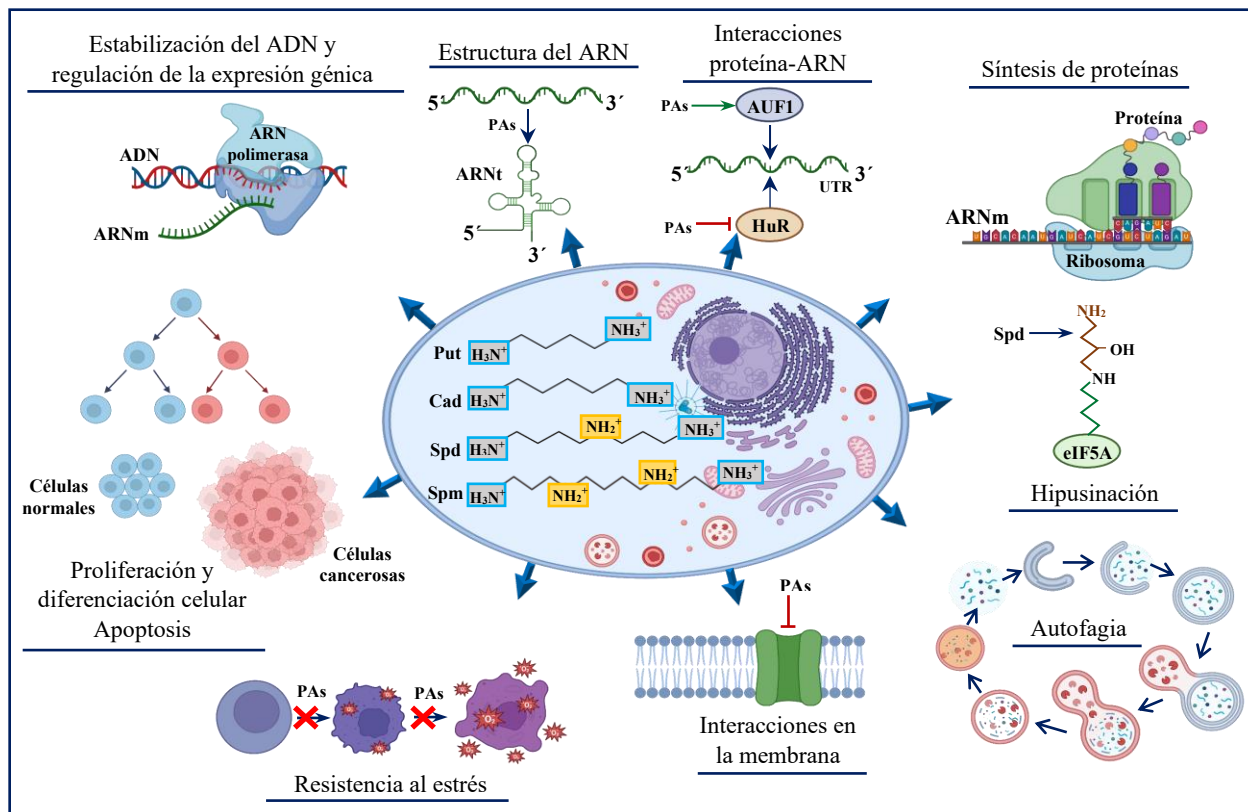
Igarashi y Kashiwagi en 2010 evaluaron la distribución de las PAs en linfocitos bovinos, hígado de ratas y *E. coli* a partir de sus constantes de unión con macromoléculas (ADN, ARN y fosfolípidos) y nucleótidos trifosfatados, así como de sus concentraciones celulares (Watanabe *et al.*, 1991). En términos generales, los procariontes presentan una mayor concentración de Put, mientras que los eucariontes suelen tener mayor concentración de Spd y Spm (Tabor y Tabor, 1976; Miller-Fleming *et al.*, 2015). Aunque las concentraciones intracelulares de PAs en eucariontes suelen estar en valores milimolares (Pegg, 2016), la mayoría de estas se encuentran compartimentadas y/o unidas a ácidos nucleicos y otras moléculas con carga negativa. Como resultado, las concentraciones de PAs libres son considerablemente más bajas en comparación con la concentración celular total (Igarashi y Kashiwagi, 2010; Park y Igarashi, 2013).

En los mamíferos, las PAs pueden provenir a partir de distintas fuentes. Por un lado, se originan internamente mediante la biosíntesis *de novo* y las interconversiones entre ellas mismas. Estas

moléculas también son abundantes en el entorno extracelular, particularmente en el tracto gastrointestinal, donde la mayoría se derivan de la dieta, la microbiota, las secreciones digestivas (especialmente en el intestino y el páncreas) y el desprendimiento de células epiteliales. Las PAs luminales están presentes en concentraciones milimolares y se ha demostrado que las células de todo el cuerpo las utilizan para apoyar el crecimiento, dejando concentraciones de PAs micromolares en la circulación sistémica (Holbert *et al.*, 2022). En función de esto, su contenido intracelular se encuentra estrictamente regulado por los procesos de biosíntesis, degradación, absorción y excreción (Igarashi y Kashiwagi, 2000; Minois *et al.*, 2011).

### 1.1.2. Funciones de las PAs en la célula

La capacidad de las PAs de interactuar con macromoléculas cargadas negativamente hace posible que intervengan en una gran variedad de procesos celulares, incluida la estabilización del ADN, el plegamiento y flexión del ARN, las interacciones entre proteínas y ARN, la síntesis de proteínas, la hipusinación, la autofagia, las interacciones en la membrana, la resistencia al estrés, la apoptosis y la diferenciación y proliferación celular (Figura 2) (Mounce *et al.*, 2017).



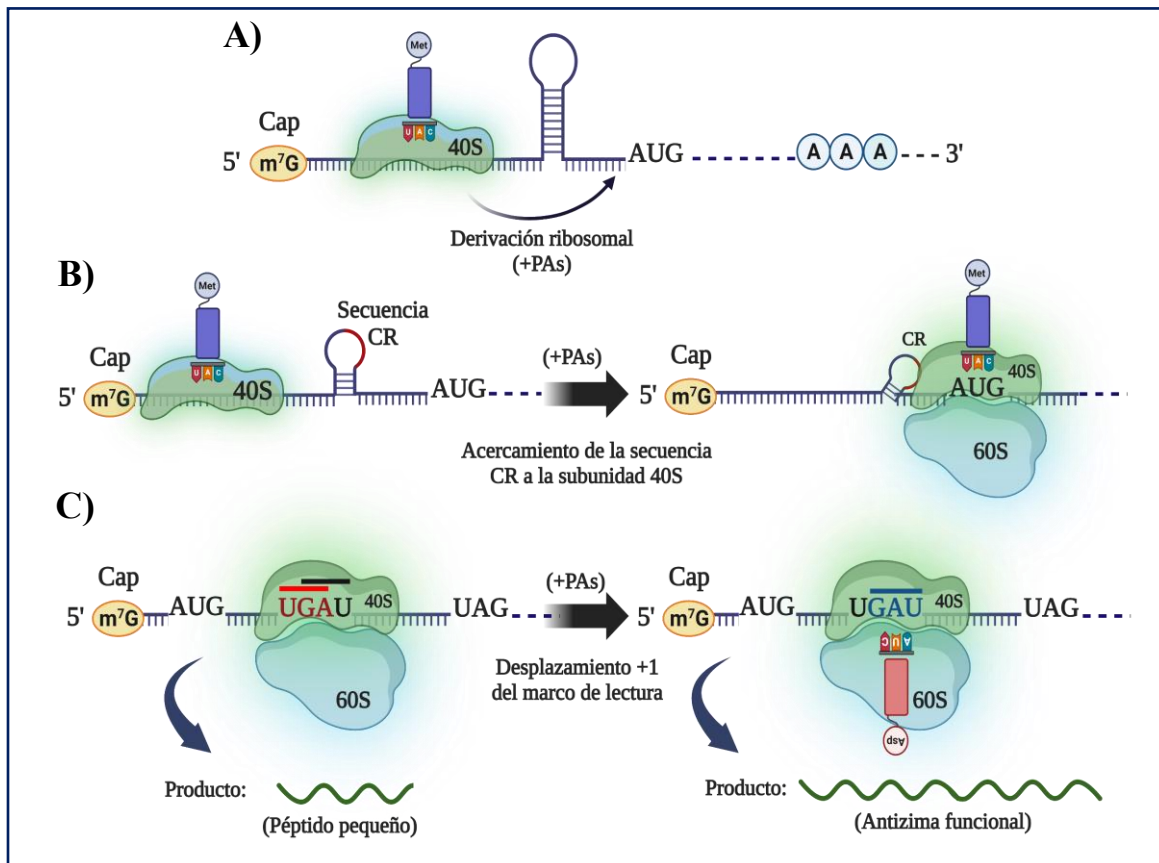
**Figura 2. Procesos celulares en los que intervienen las PAs.** Las cargas positivas presentes en su estructura a pH fisiológico les permite interactuar con macromoléculas cargadas negativamente como ácidos

nucleicos, proteínas y fosfolípidos. La figura se confeccionó en BioRender (Modificada de **Mounce et al., 2017**).

Las PAs pueden unirse tanto al ADN como al ARN, lo que modifica la conformación y función de los ácidos nucleicos. En el caso del ADN, las PAs pueden alterar su estructura al promover la transición de la forma B a la forma Z o causar su flexión; de ahí que contribuyan a la estabilización y remodelación de la cromatina y, por tanto, a la regulación de la expresión génica. Además, las PAs facilitan la interacción de factores de transcripción con el ADN, por lo que desempeñan un rol primordial en este proceso (**Ouameur y Tajmir-Riahi, 2004; Miller-Fleming et al., 2015; Mounce et al., 2017**). En células y tejidos de mamíferos, la mayor parte de la Spd y la Spm (57 – 85 %) están directamente asociadas al ARN, mientras que las PAs libres y las que se unen a otros componentes (como ADN, ATP o fosfolípidos) son proporcionalmente pequeñas (**Igarashi y Kashiwagi, 2000; Igarashi y Kashiwagi, 2010**). Se ha descubierto que la Spm juega un papel importante en la estabilización de la estructura de los ARNt y, además, estimula la interacción de estos con su sitio de unión en los ribosomas, aumentando la eficiencia y la fidelidad de la traducción (**Shimogori et al., 1996; Igarashi y Kashiwagi, 2000; Ouameur et al., 2010**). También se pueden asociar con proteínas de unión a los ARNm, favoreciendo o disminuyendo su interacción con estas moléculas. Por ejemplo, la asociación de PAs con el factor 1 de unión a elementos ricos en AU (AUF1 del inglés *AU-rich binding factor 1*), ayuda a que se una a ciertos ARNm, lo cual promueve la degradación de estos y disminuye su tiempo de vida media. De manera similar ocurre con el antígeno humano R (HuR del inglés *Human antigen R*), quien se encarga de regular la estabilidad y la traducción de ciertos ARNm que también presentan elementos ricos en AU en su secuencia 3'-UTR. El incremento de las PAs intracelulares disminuye la concentración citoplasmática de HuR, lo que desfavorece su unión a los ARNm y permite que la velocidad de degradación de estos sea mayor (**Zou et al., 2010; Rao et al., 2020**).

Por otro lado, las PAs intervienen en la síntesis de proteínas al potenciar la traducción de determinados ARNm. Algunas proteínas cuya síntesis es estimulada por las PAs a nivel de la traducción incluyen COX4 (una subunidad del citocromo C) en levadura, Cct2 (proteína del complejo T, subunidad  $\beta$ ), Hnrpl (riboproteína L nuclear heterogénea), Pgam1 (fosfoglicerato mutasa 1), eEF1A (factor de elongación 1A) y p16 (un factor de transcripción) en células FM3A de carcinoma mamario de ratón. Se han descrito tres mecanismos principales a través de los cuales

estos policones potencian dicho proceso en células eucariotas (**Figura 3**) (Uemura *et al.*, 2009; Nishimura *et al.*, 2009; Terui *et al.*, 2015; Igarashi y Kashiwagi, 2015).



**Figura 3. Mecanismos principales por los que las PAs modulan la síntesis de proteínas en células eucariotas.** (A) Derivación de la subunidad ribosomal 40S en la región 5'-UTR del ARNm; (B) Aproximación de la secuencia CR a la subunidad ribosomal 40S; y (C) Desplazamiento + 1 del marco de lectura en un codón de terminación temprano. La figura se confeccionó en BioRender (Modificada de Igarashi y Kashiwagi, 2015).

Uno de ellos está relacionado con el desplazamiento de los ribosomas a través de estructuras de horquilla que se forman en la región 5'-UTR de diferentes ARNm (COX4 y Cct2), y que entorpecen el escaneo de ésta, donde las PAs facilitan la movilidad de los ribosomas (**Figura 3A**) (Uemura *et al.*, 2009). Por otro lado, existe una secuencia CR en el extremo 5'-UTR de ciertos ARNm eucarióticos (eIF1A y p16), que consta de más de 5 nucleótidos y es complementaria a otra presente en el extremo 3'-UTR del ARNr 18S, y resulta importante para la accesibilidad al codón de inicio de la traducción (AUG). En este caso, las PAs favorecen la interacción de los ribosomas con las secuencias CR, permitiendo su acceso al codón AUG (**Figura 3B**) (Nishimura *et al.*, 2009; Terui

*et al.*, 2015). El tercer mecanismo tiene que ver con el desplazamiento +1 en el marco de lectura durante la síntesis de una proteína denominada antizima (AZ) (**Figura 3C**) que contribuye a regular los niveles de PAs intracelulares y que será descrito más adelante (**Matsufuji *et al.*, 1995**).

La Spd juega un papel esencial en la hipusinación, que es una modificación postraduccional altamente conservada en eucariotas y algunas arqueas, donde dicha PA dona un grupo 4-aminobutilo que es incorporado al residuo de Lys50 presente en el factor de iniciación de la traducción eIF5A. La formación de la hipusina requiere de dos reacciones consecutivas mediadas por las enzimas desoxihipusina sintasa (DHS) y desoxihipusina hidroxilasa (DOHH) (**Park *et al.* 1982; Michael, 2016b; Mounce *et al.*, 2017**). Esta modificación es requerida para que dicho factor sea funcional. Se ha planteado que eIF5A hipusinado es indispensable para que tenga lugar el inicio de la síntesis de proteínas, al participar directamente en la formación del primer enlace peptídico (**Igarashi y Kashiwagi, 2015**). También se ha propuesto que este factor favorece el transporte nucleocitoplasmático del ARNm y contribuye a su estabilidad (**Park *et al.*, 2010**).

La Spd promueve además la autofagia al inhibir de manera competitiva a la histona acetiltransferasa EP300 (del inglés *E1A-binding protein p300*) y, por consiguiente, reducir los niveles globales de proteínas acetiladas en la célula, lo cual modula negativamente dicho proceso (**Sacitharan *et al.*, 2018; Proietti *et al.*, 2020**). Aunque las PAs intracelulares se encuentran predominantemente asociadas a moléculas no proteicas, se han documentado interacciones específicas con ciertos tipos de proteínas presentes en la membrana plasmática (**Pegg, 2016**). Específicamente, la Spm puede bloquear y modular diversos tipos de canales iónicos cuando su concentración intracelular se incrementa. La Spm intracelular participa en la regulación intrínseca de los canales de K<sup>+</sup> de rectificación interna (K<sub>ir</sub>) al obstruir directamente el poro del canal. Estos canales están involucrados en la actividad eléctrica cardíaca y neuronal, y en el equilibrio de electrolitos (**Kurata *et al.*, 2006; Kurata *et al.*, 2013**). Por otra parte, existen tres grupos de receptores-canal controlados por compuertas, que responden a la unión de ligandos como el glutamato y desempeñan un papel crucial en la transmisión y la plasticidad sináptica asociada al aprendizaje y la memoria. Estos incluyen a los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), los receptores del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y los receptores de kainato (**Pegg, 2009; Sagar *et al.*, 2021**). Las PAs (en especial la Spm) pueden influir en la actividad de ciertos miembros de estos grupos de receptores. El bloqueo de los canales por las PAs tiene una alta dependencia de voltaje, lo cual concuerda con cambios significativos en la

excitabilidad de estos canales asociados a pequeñas variaciones en los niveles de PAs. La Spm, al ser más potente que la Spd, puede inducir alteraciones significativas en la actividad cuando se produce un cambio en la proporción de PAs (**Igarashi y Kashiwagi, 2000; Igarashi y Kashiwagi, 2010; Pegg, 2016; Sagar *et al.*, 2021**).

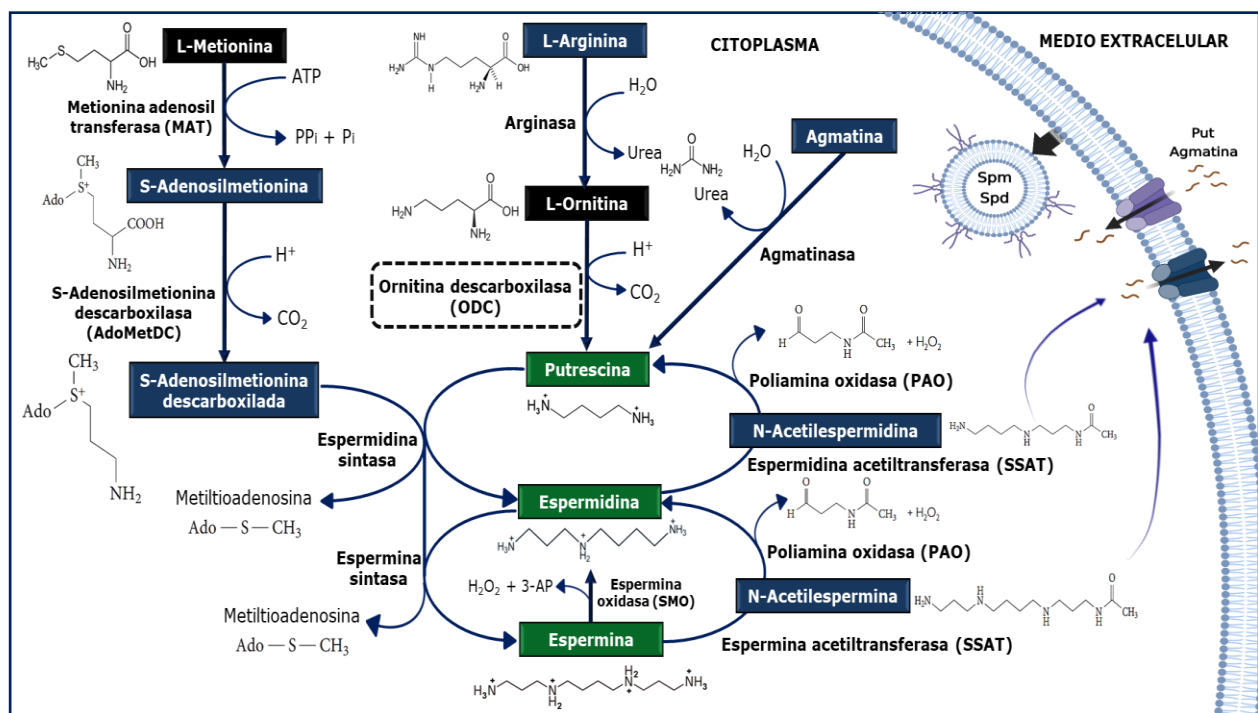
Las PAs participan también en la resistencia al estrés oxidante. Éstas exhiben una notable capacidad antioxidante y desempeñan un papel protector en las células, al controlar los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS del inglés *Reactive oxygen species*) generadas durante el metabolismo celular (**Minois *et al.*, 2012**). Asimismo, la propiedad de las PAs para neutralizar los radicales libres se dirige principalmente a los radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) (generados mediante reacciones tipo Fenton), a los oxígenos singulete, así como a los radicales peroxilo y superóxido. La interacción de las PAs con el ADN lo protege de la unión de radicales libres, previniendo así el daño estructural y funcional del mismo (**Das y Misra, 2004; Ha *et al.*, 1998; Fujisawa y Kadoma, 2005; Miller-Fleming *et al.*, 2015**). Además, las PAs ejercen un efecto inhibitorio sobre la peroxidación lipídica en las membranas celulares, lo cual es de gran importancia, ya que la fluidez y permeabilidad de la membrana celular están estrechamente relacionadas con la presencia de ácidos grasos insaturados (**Borrel *et al.*, 1997; Rider *et al.*, 2007; Rhee *et al.*, 2007**). A su vez, las PAs también regulan la expresión de genes asociados a los mecanismos de respuesta y defensa al estrés oxidante en la célula (**Tkachenko y Nesterova, 2003; Rhee *et al.*, 2007**).

Es preciso destacar que una de las funciones más connotadas de las PAs es su participación en la proliferación y diferenciación celular, así como en la apoptosis (**Schipper *et al.*, 2000; Miller-Fleming *et al.*, 2015; Pegg, 2016**). Éstas presentan una mayor concentración en tejidos de alto índice proliferativo, y su síntesis se activa por estímulos hormonales promotores del crecimiento y regenerativos. Se ha detectado un incremento de los niveles de PAs durante las fases del ciclo celular G1/S y G2. Por otra parte, su disminución se ha asociado con un retraso en la progresión del ciclo celular, lo que provoca que la mayoría de las células se detengan en la fase G1/S por un incremento del factor supresor tumoral p53 (**Kramer *et al.* 1999; Sagar *et al.*, 2021**). La estabilización y acumulación de p53 en respuesta al agotamiento de PAs ejerce una influencia predominante sobre los puntos de control del ciclo celular. Esta influencia se logra mediante la regulación de la expresión de p27<sup>Kip1</sup> y p21Cip1<sup>WAF1</sup>, que son inhibidores de las cinasas dependientes de ciclinas CDK2 y CDK4, y a partir de la inhibición de la transcripción de los genes diana involucrados en la apoptosis. Esta deficiencia en el contenido de PAs trae consigo una

reducción en la tasa de síntesis de ADN (Ray *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2000). Algunas investigaciones han reportado que la inhibición de la síntesis de ADN debido a la reducción de los niveles de PAs es ligeramente mayor que la inhibición de la síntesis de proteínas (Igarashi *et al.*, 1984). Además, su deficiencia también ha demostrado que disminuye la actividad de enzimas como la ADN polimerasa  $\alpha$ , la timidina cinasa, la ligasa I de ADN y la endonucleasa Flap. Esta afectación en las actividades enzimáticas podría estar relacionada con una inhibición significativa de la síntesis de ADN. Estos procesos mencionados anteriormente son cruciales para determinar el recambio celular y, por lo tanto, juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer (Igarashi *et al.*, 1984; Ito y Igarashi, 1990; Igarashi y Kashiwagi, 2010).

### 1.1.3. Metabolismo de las PAs en mamíferos

En los mamíferos, las PAs se derivan de dos aminoácidos principalmente: la L-ornitina y la L-metionina (Figura 4). El primero se puede sintetizar en la célula a partir de la L-arginina, que es un intermediario del ciclo de la urea, mediante una reacción de hidrólisis catalizada por la arginasa; aunque también puede ser incorporado del medio extracelular a través de transportadores localizados en la membrana plasmática (Pegg, 2016; Alcázar y Tiburcio, 2018).



**Figura 4.** Vías de síntesis, degradación y transporte de PAs en una célula de mamífero. El contenido intracelular de las PAs se encuentra minuciosamente regulado por los procesos de biosíntesis, degradación, absorción y excreción. La figura se confeccionó en BioRender (Modificada de Casero Jr. *et al.*, 2018).



La L-ornitina sirve de sustrato para la síntesis de la primera PA, que es la Put, por medio de una reacción de descarboxilación catalizada por la enzima ODC. Del segundo aminoácido, la L-metionina, se obtiene S-adenosilmetionina descarboxilada, mediante dos reacciones consecutivas llevadas a cabo por las enzimas metionina adenosil transferasa (MAT) y S-adenosilmetionina descarboxilasa (AdoMetDC). A partir de la Put se sintetizan la Spd y la Spm por las enzimas espermidina y espermina sintetasas respectivamente, mediante la adición de grupos aminopropilo procedentes de la S-adenosilmetionina descarboxilada (**Heby y Persson, 1990; Casero Jr. y Marton, 2007; Alcázar y Tiburcio, 2018; Casero Jr. et al., 2018**).

La vía descrita anteriormente constituye la ruta de biosíntesis canónica de PAs en células de mamíferos. Sin embargo, se ha propuesto una ruta alternativa que ha sido caracterizada previamente en microorganismos y plantas, donde la L-arginina se descarboxila para producir agmatina por la arginina descarboxilasa (ADC), y a partir de la agmatina se obtiene Put mediante la enzima agmatinasa (AGMAT) (**Wang et al., 2014**). Zhu y colaboradores en 2004 identificaron un gen en humanos a cuyo producto proteico le atribuyeron la función de ADC. No obstante, se determinó con posterioridad en células humanas y de ratones que dicha proteína era catalíticamente inactiva, y que funcionaba en realidad como un inhibidor de la familia de AZs, que son proteínas que promueven la degradación de la ODC (**Kanerva et al., 2008**). Por otro lado, el gen que codifica para la AGMAT en humanos ya ha sido identificado y dicha enzima se localiza en las mitocondrias. Por lo tanto, la agmatina que es incorporada a partir de la dieta o los productos de secreción de la microbiota intestinal, puede ser utilizada por las células para la síntesis de PAs (**Wang et al., 2014**).

Existen otras enzimas en la célula que promueven el catabolismo de las PAs. Entre ellas se encuentra la espermina/espermidina N<sup>1</sup>-acetiltransferasa (SSAT), que desempeña un papel importante en la acetilación tanto de la Spm como de la Spd, lo cual constituye un mecanismo regulador para disminuir las interacciones de estas moléculas con diversos polianiones, al reducir la cantidad de cargas positivas que portan. Una vez acetiladas, estas PAs se transportan hacia el peroxisoma, donde sufren una reacción de oxidación por la poliamina oxidasa (PAO). Durante este proceso de oxidación, se generan subproductos como el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el 3-aminopropanal. La Spm también puede ser convertida nuevamente en Spd mediante la acción de la espermina oxidasa (SMO) en el citoplasma. A diferencia de la PAO, la SMO muestra una preferencia por la Spm en su forma no acetilada, en lugar de su derivado acetilado conocido como N-acetilespermina (**Casero Jr. y Marton, 2007; Alcázar y Tiburcio, 2018; Sagar et al., 2021**).

Las PAs también se pueden incorporar del medio extracelular a partir de diferentes mecanismos de transporte con los que cuentan las células, los cuales contribuyen a regular los niveles intracelulares de estas moléculas (Soulet *et al.*, 2004; Casero Jr. *et al.*, 2018). Uno de los mecanismos propuestos consiste en la endocitosis mediada por caveolinas o a través de los grupos de heparán sulfato presentes en una glicoproteína de la membrana plasmática denominada glicicano-1 (Glc-1) (Soulet *et al.*, 2002; Casero Jr. y Marton, 2007; Casero Jr. *et al.*, 2018). Aunque no hay evidencia de algún gen que codifique para un transportador específico de PAs, se han identificado diversas proteínas pertenecientes a las familias de transportadores de solutos (SLC) y ATPasa tipo P que pueden internalizar o exportar PAs (Sagar *et al.*, 2021). Entre ellos se destacan los miembros de la familia de transportadores de cationes orgánicos (OTC/SLC22A), como los SLC22A1-3, que se han asociado a la captación de Put y agmatina. Por su parte, el transportador SLC3A2 exporta Put y PAs acetiladas a través de la actividad de intercambio de diamina/arginina. Sin embargo, se ha comprobado que cuando la concentración de Put extracelular es superior a la intracelular, el gradiente de concentración puede hacer que SLC3A2 internalice Put (Sala-Rabanal *et al.*, 2013; Uemura *et al.*, 2010; Casero Jr. *et al.*, 2018). Se ha reportado, además, que SLC18B1 actúa como un transportador vesicular de Spd y Spm en neuronas y astrocitos (Moriyama *et al.*, 2020; Casero Jr. *et al.*, 2018). De manera reciente se ha revelado la participación de la ATP13A3, una P5B-ATPasa asociada a la hipertensión arterial pulmonar, en el transporte celular de PAs en células de carcinoma de conducto pancreático y células CHO (células de ovario de hámster chino) (Hamouda *et al.*, 2021). Asimismo, se ha implicado a la ATP13A2, miembro de la misma familia de transportadores, en la exportación lisosomal de PAs al citosol (Sagar *et al.*, 2021; Casero Jr. *et al.*, 2018).

Como se ha podido apreciar, el mantenimiento de la homeostasis de las PAs en la célula implica un gasto energético considerable, debido a los procesos de síntesis, degradación, importación y exportación. Estos mecanismos subrayan la importancia crítica de esta vía metabólica para el funcionamiento celular (Mounce *et al.*, 2017).

#### **1.1.4. Rol de las PAs en cáncer**

Como se describió anteriormente, las PAs desempeñan un papel esencial en la regulación de procesos celulares como la apoptosis y la proliferación, los cuales son determinantes en el recambio celular y, por ende, tienen una relevancia importante en el desarrollo del cáncer (Casero Jr. *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020; Sari *et al.*, 2021). Se ha observado que el metabolismo de estas moléculas se

encuentra frecuentemente alterado en células cancerosas, y se relaciona directamente con un incremento de sus concentraciones en comparación con las células normales (**Soda, 2011; Paz et al., 2011; Bae et al., 2018**). Aunque se había estudiado ampliamente su función en otras enfermedades no fue hasta 1968 que se estableció una asociación entre las PAs y el cáncer (**Russell y Snyder, 1968**).

En diversos sistemas celulares se ha evidenciado la necesidad de las PAs para un crecimiento óptimo. No obstante, en condiciones de enfermedades hiperplásicas se ha visto un aumento en la expresión y la actividad de la enzima ODC y en los niveles intracelulares de PAs en los tejidos afectados (**Damiani y Wallace, 2018; Sari et al., 2021**). Teniendo en cuenta esto, se ha establecido que la sobreexpresión de la ODC por encima de un umbral mínimo puede desencadenar la transformación celular y promover el desarrollo tumoral. Por ejemplo, en tejido de cáncer colorrectal, se ha observado un incremento significativo, de 3 a 4 veces, en el contenido de PAs, así como en las actividades de la ODC y de la AdoMetDC, en comparación con el tejido de colon normal correspondiente (**LoGiudice et al., 2018**). Aunque ciertos tejidos, como la médula ósea, el páncreas, la mucosa intestinal y la próstata, exhiben concentraciones elevadas de PAs, se ha reportado un incremento de éstas en los tejidos tumorales. Durante su proliferación, las células cancerosas de próstata mantienen la secreción de PAs, lo cual requiere un flujo metabólico incrementado de éstas. En un entorno con niveles altos de PAs, las células del sistema inmunológico experimentan una disminución en sus funciones inmunes antitumorales. Esto favorece la capacidad de las células cancerosas para invadir nuevos tejidos y metastatizar (**Soda, 2011**).

Para lograr una proliferación continua, las células cancerosas necesitan mantener estos niveles elevados y sostenidos de PAs en su interior, lo cual se logra mediante un aumento en la biosíntesis, un incremento en el transporte y una disminución en el catabolismo de estas moléculas (**Miller-Fleming et al., 2015; Casero Jr. et al., 2018; Sari et al., 2021**). Numerosos oncogenes, como *myc*, *jun*, *fos*, *kras* y *braf*, contribuyen a este proceso de mantenimiento (**Bello-Fernández et al., 1993; Shantz y Levin, 2007; Peters et al., 2018; Holbert et al., 2022**). En los últimos años, los avances en estudios metabólicos han permitido una detección más precisa y sensible de los cambios en la síntesis y el metabolismo de las PAs en el contexto del cáncer. Como resultado, estas moléculas y metabolitos asociados se consideran como biomarcadores relevantes en el campo del cáncer. Su presencia en muestras de orina y plasma se ha valorado como una herramienta indicadora de la aparición y progresión de diversos tipos de tumores, incluyendo el cáncer de mama, pulmón,

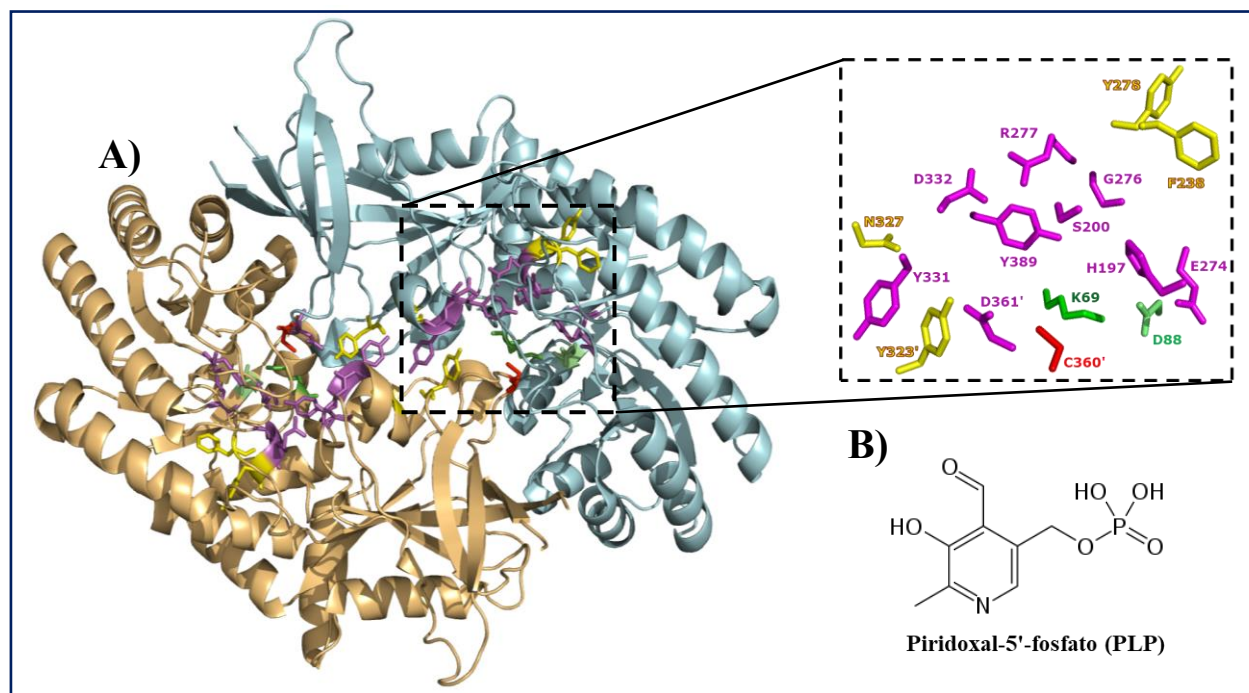
colorrectal, ovario, próstata y páncreas. La inhibición de la biosíntesis y el transporte de las PAs se considera una estrategia potencial en la quimioterapia del cáncer (**Gerner y Meyskens, 2004; Miller-Fleming *et al.*, 2015; Bachmann y Geerts, 2018; Sari *et al.*, 2021**).

La desregulación de los niveles de PAs en células cancerosas se correlaciona positivamente con una sobreexpresión de la ODC, y ambos fenómenos se han asociado de manera directa con la progresión tumoral, la resistencia a la quimioterapia y un mal pronóstico en varios tipos de cáncer. La inhibición farmacológica de la ODC ha demostrado ser efectiva para reducir la proliferación celular y promover la apoptosis en células tumorales, de ahí que se le considere a esta enzima como un blanco terapéutico para el tratamiento de dicha enfermedad (**Pegg *et al.*, 1995; Wallace y Fraser, 2004**).

## **1.2. Ornitina descarboxilasa humana (HsODC)**

### **1.2.1. Generalidades**

La HsODC es una enzima principalmente citosólica codificada por el gen *odc1*, el cual se localiza en la región cromosómica 2p25 (**Schipper *et al.*, 2004; Radford *et al.*, 1990**). El monómero tiene una longitud de secuencia de 461 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 51 kDa (**Heby y Persson, 1990**). Forma un homodímero obligado de 102 kDa y es dependiente de piridoxal 5'-fosfato (PLP), para el cual se ha descrito una  $K_d = 0.05 \mu\text{M}$ . En el dímero están presentes dos sitios activos que se ubican en la interfase entre el dominio N-terminal de un monómero, que contiene residuos implicados en las interacciones con el PLP (Lys69 y Asp88), y el dominio C-terminal del otro monómero, que aporta residuos previamente identificados como interactuantes con el sustrato (Cys360' y Asp361') (**Almud *et al.*, 2000; Dufe *et al.*, 2007**). La enzima se clasifica como una descarboxilasa de Grupo IV, al presentar homología estructural con las ADC presentes en bacterias y plantas, así como con la descarboxilasa del ácido diaminopimélico bacteriana y la alanina racemasa. Sin embargo, el análisis de secuencia indicó que no presenta relación evolutiva con las ODC procarióticas (**Sandmeier *et al.*, 1994; Kern *et al.*, 1999**). Participa en la primera reacción de la vía de síntesis canónica de las PAs, donde cataliza la descarboxilación de la L-ornitina para producir Put (**Jackson *et al.*, 2000; Pegg, 2006; Zhou *et al.*, 2021**). En la **Figura 5** se muestra la estructura 3D de la HsODC obtenida por cristalografía de rayos X con un acercamiento en los residuos que forman parte de uno de sus dos sitios catalíticos, así como la estructura química de su cofactor PLP (**Dufe *et al.*, 2007**).



**Figura 5. Estructura tridimensional de un homodímero de HsODC y su cofactor PLP.** (A) Los monómeros de la enzima aparecen de color naranja y azul celeste. Se muestra una imagen ampliada de los residuos que forman parte de uno de sus sitios catalíticos: los de color magenta pueden establecer enlaces de hidrógeno con el sustrato y los amarillos interacciones hidrofóbicas. El residuo de Cys360' (rojo) participa en la reprotonación del PLP, la Lys69 (verde) es el residuo al que se une el PLP, y el Asp88 (verde claro) estabiliza la unión del PLP con la Lys69 del monómero de HsODC. Esta figura se realizó en el programa PyMOL: código PDB 2000 (Dufe *et al.*, 2007); y (B) Estructura química de su cofactor enzimático PLP.

El monómero de HsODC consta de dos dominios estructurales: un barril  $\alpha/\beta$  similar a TIM (triosa-fosfato isomerasa) que abarca los residuos 46-280, y un dominio de lámina compuesto por dos láminas (S1 y S2) y dos hélices (H11 y H12), cuyos residuos se encuentran en las posiciones 7-45 y 281-427, respectivamente. Las láminas S1 y S2 están dispuestas de manera perpendicular, formando un núcleo hidrofóbico central. El monómero también presenta en su estructura un bucle sensible a proteasa que se extiende desde el núcleo del barril  $\alpha/\beta$  y se curva sobre la interfaz entre los monómeros, hacia el interior del dímero. En particular, el residuo de Lys169, ubicado en el extremo del bucle sensible a proteasa, está a distancia de puente salino (2.9 Å) con el residuo de Asp364' del otro monómero. Este puente salino establece una conexión entre ambos monómeros y posiciona de manera óptima el bucle que contiene los residuos Cys360' y Asp361', los cuales

son importantes para llevar a cabo la catálisis enzimática dentro del homodímero, en especial la Cys360' (Almrud *et al.*, 2000; Dufe *et al.*, 2007).

El cofactor enzimático PLP se une al residuo de Lys69 de manera covalente, mediante la formación de una base de Schiff interna (Jackson *et al.*, 2000). El ciclo catalítico de la enzima se inicia cuando el grupo  $\alpha$ -amino de la L-ornitina ( $K_m = 0.08$  mM) (Dufe *et al.*, 2007) desplaza al grupo  $\epsilon$ -amino de la Lys69 para formar una base de Schiff de aldimina externa con el PLP. Esto ocurre debido a que el grupo  $\alpha$ -amino de la L-ornitina tiene un pKa más bajo ( $\sim 9,0$ ) que el grupo  $\epsilon$ -amino ( $\sim 10,5$ ) de la Lys69, y, por lo tanto, es más reactivo. El nitrógeno altamente electrofílico de la base de Schiff promueve la descarboxilación de la L-ornitina, al funcionar como sumidero para el electrón libre del grupo carboxilato. Esto es seguido por una reprotonación a través del grupo -SH débilmente ácido de la Cys360' del otro monómero. La descarboxilación induce un aumento del pKa del nitrógeno de la base de Schiff, lo que permite la liberación del producto: la Put, mediante una transaminación a través de la Lys69, con lo cual se cierra el ciclo catalítico (Osterman *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2021).

Es necesario mencionar que, en la célula, los dímeros activos de HsODC se encuentran en un equilibrio dinámico con los monómeros inactivos. El desplazamiento del equilibrio hacia una forma u otra va a depender de dos factores importantes: la fuerza iónica y la concentración de sustrato, los cuales tienen un efecto opuesto. Un incremento de la fuerza iónica favorece la disociación del dímero mientras que un aumento en la concentración de L-ornitina contribuye a la dimerización (Solano *et al.*, 1985). La enzima muestra una alta tasa de renovación entre las enzimas de mamíferos, con una vida media biológica típicamente comprendida entre pocos minutos y una hora (Hayashi *et al.*, 1996; Persson *et al.*, 1998).

Cabe resaltar que la expresión de esta enzima resulta esencial para el correcto desarrollo, funcionamiento y supervivencia celular. En varios organismos eucariotas, como *Saccharomyces cerevisiae* y *Leishmania donovani*, se han generado mutaciones que producen la pérdida de función de la ODC, y también se ha identificado una mutación natural en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. La ausencia de ODC en levaduras haploides resulta en la detención del crecimiento, mientras que su eliminación en *L. donovani* y *C. elegans* es letal, a menos que se les suministre Put exógena en su dieta. Sin embargo, la causa subyacente de la letalidad asociada con la deficiencia de ODC en estos organismos inferiores aún no se ha esclarecido (Schwartz *et al.*, 1995; Macrae *et al.*, 1998; Jiang *et al.*, 1999). Un estudio desarrollado en ratones mostró que la eliminación de

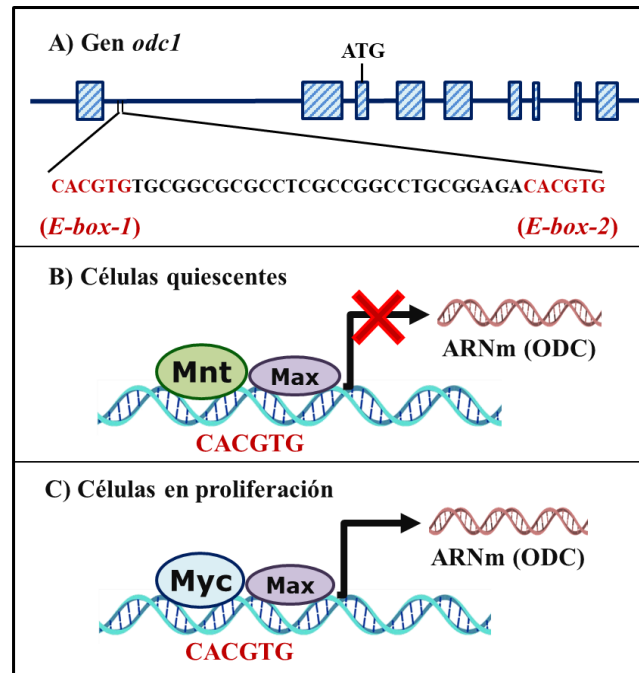
la función de la ODC mediante selección de genes comprometió su desarrollo embrionario temprano. Los ratones heterocigotos de ODC no presentaron patología visible, al menos al año de crecimiento. Por el contrario, los embriones que carecen de ODC se desarrollaron normalmente hasta la etapa de blastocisto y se implantaron, pero murieron poco después, antes del inicio de la gastrulación (**Pendeville *et al.*, 2001**). Los resultados anteriores fueron corroborados por Meehan y colaboradores en 2017, quienes demostraron que la pérdida del gen *odc1* en ratones homocigotos *knockout* es letal por penetrancia completa, mientras que los ratones heterocigotos tienen disminuciones significativas en la masa corporal y el contenido de grasa.

### 1.2.2. Regulación de la ODC

Al igual que ocurre con la mayoría de las proteínas fundamentales para el crecimiento celular, la concentración de ODC dentro de la célula está sujeta a un estricto control, y la regulación de su síntesis es altamente compleja. La ODC se encuentra regulada desde el nivel transcripcional hasta el postraduccional, y su actividad muestra variaciones en respuesta a múltiples estímulos. Estos cambios en la actividad se deben fundamentalmente a modificaciones en la concentración de la enzima, la cual experimenta un recambio rápido y constante, como se mencionó anteriormente (**Heby y Persson, 1990; Persson *et al.*, 1998; Pegg, 2006**).

La regulación de la transcripción del gen de la ODC ha sido objeto de estudio de numerosas investigaciones, y se ha comprobado que diversos factores aumentan la síntesis de los ARNm de la ODC. La región promotora del gen *odc1* es compleja y contiene múltiples secuencias que permiten responder a hormonas, factores de crecimiento y promotores tumorales, entre las que se encuentran un elemento de respuesta al AMP cíclico (CRE), motivos CAAT y LSF, sitios AP-1 y AP-2, sitios de unión a Sp1 ricos en GC, y una caja TATA (**Heby y Persson, 1990; Zhao y Butler, 2001; Qin *et al.*, 2004; Pegg, 2006**). Se ha establecido de manera sólida que el gen de la ODC es un objetivo transcripcional directo del oncogén *c-myc*, el cual se encuentra incrementado en cánceres de casi todos los tipos y se asocia positivamente con una mayor biosíntesis de PAs a través de la ODC (**Bello-Fernández *et al.*, 1993; Pena *et al.*, 1993; Bachmann y Geerts, 2018**). En la **Figura 6A** se observa una representación esquemática del gen *odc1*, donde aparece amplificadas una secuencia de la región promotora de dicho gen. En la misma están presentes dos elementos *E-box* (*E-box1* y *E-box2*) de secuencia CACGTG. En células quiescentes (**Figura 6B**), estos sitios se encuentran ocupados por el complejo inactivo Mnt/Max, el cual reprime la transcripción del gen de la ODC a través de sus asociaciones con los correpresores generales Sin3a y Sin3b y las histonas

deacetilasas asociadas. Por otro lado, en células en proliferación (**Figura 6C**), donde la concentración de c-Myc se encuentra elevada, se favorece la formación y activación del complejo c-Myc/Max, que desplaza a Mnt/Max, se une a estas secuencias E-box y potencia la transcripción del gen *odc1* (Packham y Cleveland, 1997; Nilsson *et al.*, 2004; Pegg, 2006).



**Figura 6. Regulación transcripcional del gen *odc1* por c-Myc.** (A) Representación esquemática del gen *odc1* y amplificación de una secuencia de la región promotora donde aparecen resaltados dos elementos E-box; (B) Bloqueo de la transcripción del gen *odc1* en células quiescentes por la unión del complejo inactivo Mnt/Max a las secuencias E-box; y (C) Aumento de la transcripción del gen *odc1* en células en proliferación por la unión del complejo activo c-Myc/Max a las secuencias E-box (Modificada de Pegg, 2006).

Cabe destacar que la ODC no solo está sujeta al control del oncogén *c-myc*, sino que también está regulada por otro oncogén de gran importancia: *ras*. La activación de la vía de Ras ejerce efectos estimulantes tanto en el contenido de ARNm de ODC como en su traducción (Shantz, 2004; Origanti y Shantz, 2007). El aumento de la transcripción de *odc1* ocurre a través de la activación de la vía Raf/MEK/ERK, mientras que la traducción de la ODC se ve favorecida por cambios en la fosforilación de eIF4E (factor de iniciación de la traducción eucariota 4E) y su proteína de unión eIF4E-BP1 (del inglés *eIF4E Binding Protein 1*) a través de vía de señalización de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) (Shantz, 2004; Origanti y Shantz, 2007; Li *et al.*, 2020; Sari *et al.*, 2021).

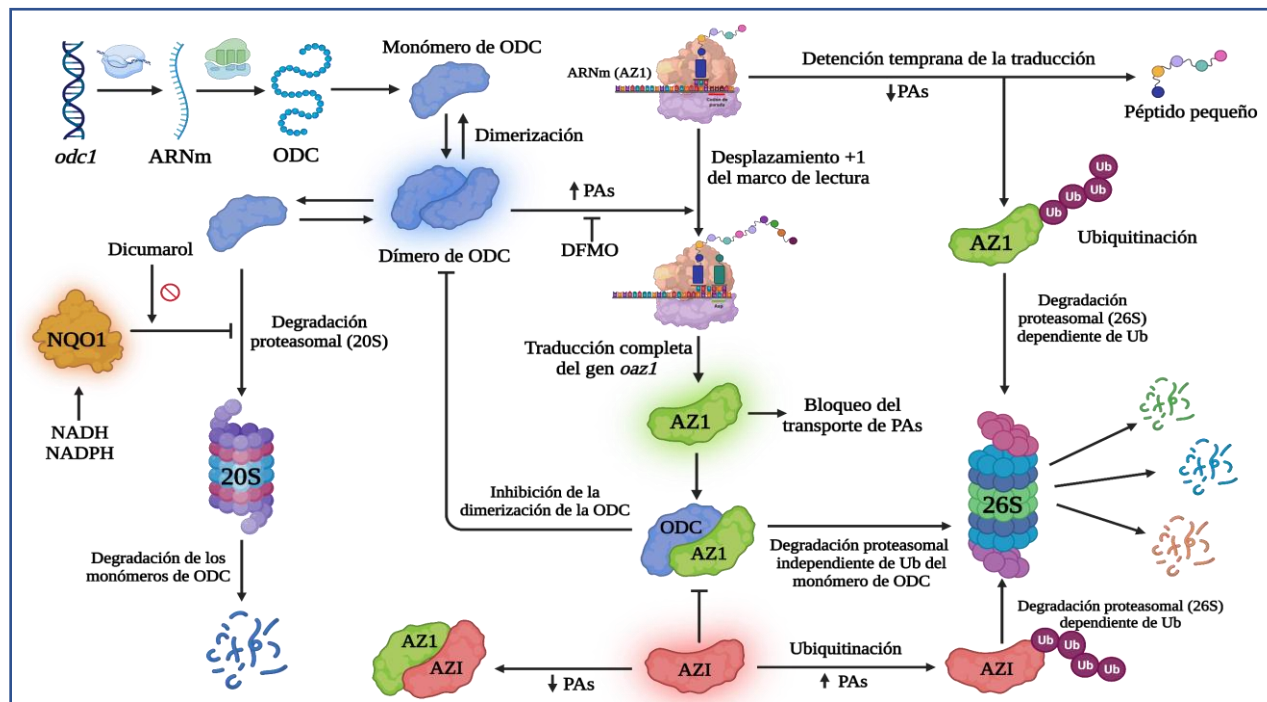


La transcripción del gen *odc1* también puede ser inducida por hormonas esteroideas como la testosterona, el estradiol y la progesterona, así como por factores de crecimiento neurotróficos y epidérmicos. Además, se ha observado un aumento de los transcritos de ODC a partir de la estimulación por el receptor de andrógenos y varios factores de transcripción pertenecientes a la familia Sp/Krüppel, así como por el supresor tumoral WT1 (del inglés *Wilms' tumor-1*) y la proteína de unión a CRE (CREB, del inglés *cAMP response element-binding*) (Zhao y Butler, 2001; Qin *et al.*, 2004; Pegg, 2006).

Como se mencionó, la ODC también está sujeta a regulación traduccional. La región 5'-UTR del ARNm de la ODC de mamíferos consiste en una secuencia larga de 275 a 313 nucleótidos, en la cual se forman estructuras secundarias que influyen en la traducción del ARNm (Shantz y Pegg, 1999; Pyronnet *et al.*, 2000; Pegg, 2006). Se ha observado que un nivel alto de eIF4E activo mejora ampliamente dicha traducción. En células que sobreexpresan este factor, se ha encontrado un aumento de la expresión de la ODC, lo cual puede contribuir a la aparición de un fenotipo transformado (Shantz y Pegg, 1999; Shantz *et al.*, 1996). Además, en la región 5'-UTR están presentes, un marco abierto de lectura (ORF, del inglés *Open Reading Frame*) interno corto (que se localiza a ~150 nucleótidos antes del codón de inicio), y una secuencia rica en GC (en los primeros 130 nucleótidos). Estas secuencias afectan de manera significativa la traducción de la ODC, lo cual pudiera ser contrarrestado parcialmente por el efecto de la región 3'-UTR de su ARNm. Aunque no se ha estudiado con precisión la influencia del extremo 3'-UTR (~300 nucleótidos), se ha demostrado que el aumento en la traducción del ARNm de la ODC en respuesta a un choque hipotónico requiere de la presencia de dicha región (Grens y Scheffler, 1990; Lövkvist-Wallström *et al.*, 2001). La traducción de la ODC puede desarrollarse también por un mecanismo independiente de la estructura de caperuza del extremo 5'-UTR, mediante el uso de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, del inglés *Internal Ribosome Entry Site*), que presenta una secuencia similar a la identificada en picornavirus (Pyronnet *et al.*, 2000). Diversas investigaciones han sugerido que el aumento de los niveles de PAs disminuyen la traducción del ARNm de ODC. A pesar de que se han descrito elementos sensibles a las PAs en la región 5'-UTR y las proteínas que se unen a ellos, estudios adicionales sugieren que el impacto de las PAs es independiente tanto de la región 5'-UTR como de la 3'-UTR (Shantz y Pegg, 1999; Lövkvist-Wallström *et al.*, 2001; Pegg, 2006). Como se describió anteriormente, tras una disminución de las concentraciones de PAs, se produce un incremento de los niveles citoplasmáticos de la proteína

de unión a ARNm: HuR, la cual puede unirse también a la región 3'-UTR de los transcritos de ODC, lo que promueve su estabilización y un aumento de su tiempo de vida media (Nowotarski y Shantz, 2010). Aunque aún se requiere una mayor investigación para confirmar la generalidad de estos hallazgos, dada la relevancia de mantener niveles adecuados de PAs para un crecimiento celular normal y la progresión a través del ciclo celular, es probable que tanto la traducción dependiente de caperuza del ARNm de ODC, como la traducción independiente de ésta, desempeñen un papel adicional en el control del contenido intracelular de PAs (Pegg, 2006).

La concentración citosólica de la ODC también se regula a través de su degradación por dos mecanismos diferentes: uno independiente de ubiquitinación mediado por AZ, que involucra al proteosoma 26S, y otro independiente tanto de ubiquitinación como de AZ, llevado a cabo por el proteosoma 20S (Figura 7) (Pegg, 2006).



**Figura 7. Mecanismos de degradación de la ODC por los proteosomas 26S y 20S.** La concentración de ODC citosólica se regula en función de los niveles intracelulares de PAs. Cuando se encuentran elevados, se promueve la degradación proteasomal de los monómeros de ODC. La figura se confeccionó en BioRender (Modificada de Kahana *et al.*, 2005 y Casero Jr. *et al.*, 2018).

En el primer caso, la degradación de la ODC se induce tras establecerse una asociación no covalente entre ésta y una proteína AZ, que la dirige hacia el proteosoma 26S sin necesidad de ser ubiquitinada (Hayashi y Murakami, 1995; Pegg, 2006; Kahana, 2016). La AZ se identificó

inicialmente como un inhibidor no competitivo de la ODC que se produce en respuesta al incremento en los niveles de PAs (Heller *et al.*, 1976). La inhibición ocurre debido a la fuerte unión de la AZ al monómero de la ODC, formando un heterodímero que bloquea su actividad enzimática. La AZ interactúa con la ODC en una región específica, que abarca los residuos 117-140. Estos se localizan en las hélices superficiales del dominio de barril  $\alpha/\beta$  similar a TIM, donde se une el cofactor PLP (Coffino, 2001a; Pegg, 2006). La rápida degradación de la ODC en mamíferos depende de una región localizada en el extremo C-terminal de la proteína, la cual se ha identificado como el punto de inicio de dicho proceso. Se cree que la unión de la AZ a la ODC induce cambios conformacionales en el monómero, lo que trae como consecuencia que este exponga su extremo C-terminal previamente ocluido para promover la proteólisis por el proteosoma 26S (Hayashi y Murakami, 1995; Murakami *et al.*, 2000). Estudios previos demostraron que la eliminación de los 37 residuos que conforman el extremo C-terminal, le confiere estabilidad a la proteína, incluso en presencia de AZ (Zhang *et al.*, 2003). Es posible que la asociación relativamente débil entre los monómeros de la ODC facilite la interacción con la AZ, debido a que presentan una mayor afinidad por ésta (Wu *et al.*, 2015).

La síntesis de la AZ está controlada por un evento de cambio de marco de lectura (*frameshifting*). El ARNm de la AZ está constituido por dos ORFs superpuestos, uno corto (ORF1) y otro largo (ORF2). El ORF2 se encuentra en el marco de lectura +1 en relación con el ORF1 y carece de un codón de inicio. La síntesis de la AZ a partir del ORF2 requiere que el ribosoma sufra un desplazamiento +1 en el marco de lectura y no finalice en el extremo de ORF1. Este cambio de marco de lectura se ve estimulado por la presencia de PAs, lo que provoca un aumento en la síntesis de AZ cuando los niveles de estas moléculas se incrementan en la célula (Mangold, 2005; Pegg, 2006). La degradación de la AZ se encuentra regulada por el proceso de ubiquitinación, el cual se inhibe por las PAs (Gandre *et al.*, 2002). Como resultado, cuando los niveles de PAs son altos, se produce un aumento en la cantidad de AZ al favorecerse la síntesis y reducirse la degradación (Coffino, 2001b; Pegg, 2006). Existe otra proteína que puede bloquear la formación del complejo AZ-ODC, conocida como inhibidor de la AZ (AZI), la cual comparte una gran similitud estructural con la ODC, pero carece de actividad enzimática. El AZI presenta una afinidad incluso mayor por la AZ en comparación con la ODC, lo que le permite liberar al monómero del complejo AZ-ODC. Cuando los niveles de PAs son altos se promueve su ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma 26S (Qiu *et al.*, 2017; Bercovich y Kahana, 2004; Kahana, 2016).

El segundo mecanismo propuesto para la degradación de la ODC se regula por la NAD(P)H quinona oxidoreductasa (NQO1) y no requiere del dominio C-terminal del monómero de ODC (**Kahana, 2016**). La NQO1 puede unirse al monómero de ODC y estabilizarlo. Esta interacción puede ser interrumpida en diversas condiciones fisiológicas, como el estrés oxidante o la exposición a dicumarol (un inhibidor competitivo de la NQO1), lo cual sensibiliza a los monómeros de la ODC a la degradación por el proteosoma 20S, de una manera independiente tanto de la AZ como de la ubiquitinación. Esta sensibilización de los monómeros está dada por la exposición de regiones no estructuradas en su superficie, ya que el proteosoma 20S solo degrada proteínas desplegadas. Dichas regiones no estructuradas normalmente se encuentran ocultas en el homodímero de ODC, el cual es resistente a la degradación por el proteosoma 20S (**Asher et al., 2005; Kahana et al., 2005**).

Se ha demostrado que la ODC puede sufrir pocas modificaciones postraduccionales, que incluyen la fosforilación en el residuo de Ser303 y la S-nitrosilación en cuatro residuos de cisteína. La primera modificación parece no tener ningún efecto en la actividad o vida media de la ODC, por lo que aún se desconoce su valor fisiológico; mientras que la segunda sí produce una inhibición total de la enzima, al involucrar al residuo de Cys360', que es indispensable para llevar a cabo la catálisis enzimática (**Pegg, 1986; Bauer et al., 2001**).

La actividad enzimática de la ODC también se puede regular por retroalimentación de los productos de la vía en la que está involucrada (**Heby y Persson, 1990; Persson et al., 1998**). Se ha observado que tanto la Put, la Spd y la Spm pueden inhibir de manera competitiva la actividad de la enzima, lo cual se corroboró en un estudio desarrollado en próstata de rata, donde se determinaron las  $K_i$  para estas tres moléculas, que resultaron ser de 1.2, 2.7 y 9.0 mM, respectivamente (**Pegg y Williams-Ashman, 1968**).

### 1.2.3. ODC y cáncer

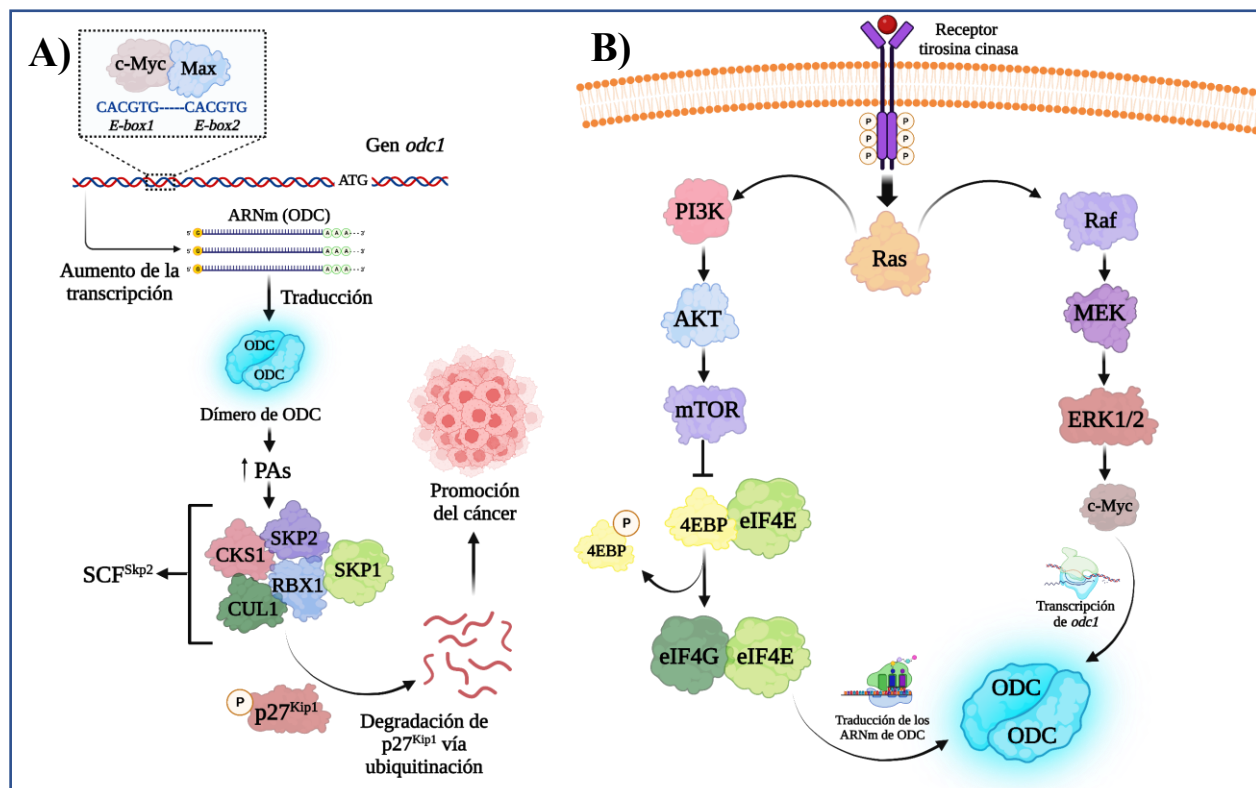
Diversos modelos de sobreexpresión de ODC, tanto *in vitro* como *in vivo*, han servido de evidencia para demostrar que esta enzima juega un papel clave en el desarrollo del cáncer (**Casero Jr. y Marton, 2007**). Múltiples estudios han reflejado que su sobreexpresión, ya sea de manera independiente o en combinación con otros oncogenes, tiene el potencial de transformar distintos tipos de células, lo cual respalda su implicación como un oncogén (**Moshier et al., 1993; Moshier et al., 1995; Auvinen et al., 1997**). La importancia de estos modelos celulares se ha visto reforzada tras la realización de experimentos en ratones transgénicos K6/ODC, en los cuales se ha logrado

limitar la sobreexpresión de la ODC únicamente en la piel mediante la utilización del promotor K6 (promotor del gen de la queratina K6 que se induce en respuesta a señales proliferativas e inflamatorias). Estos experimentos han evidenciado de manera concluyente que la actividad de la ODC es suficiente para promover la formación de tumores (**Megosh *et al.*, 1995; O'Brien *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000**). Por otra parte, los modelos de haploinsuficiencia de ODC han proporcionado evidencia de que, al disminuir la dosis del gen de la ODC a la mitad, reduce la susceptibilidad a desarrollar tumores de piel y linfomas en el modelo transgénico E $\mu$ -Myc (ratones cuyos linfocitos B sobreexpresan el oncogén *c-myc*). Estos modelos destacan la relevancia de la ODC y de las PAs en el proceso de formación de tumores, y subrayan la validez del metabolismo de las PAs como un objetivo viable para intervenciones antineoplásicas (**Guo *et al.*, 2005**).

La familia de factores de transcripción Myc constituye uno de los grupos de oncoproteínas más estudiados en el desarrollo del cáncer, las cuales se sobreexpresan en hasta el 70 % de los cánceres humanos. Se han identificado tres genes *myc* diferentes: *c-myc*, *n-myc* y *l-myc*. Estos se descubrieron por primera vez a fines de la década de 1970, y se ha demostrado que se encuentran alterados en la mayoría de los tipos de cáncer, realizando funciones oncogénicas que se correlacionan con el crecimiento agresivo del tumor y un pronóstico desfavorable para el paciente (**Rickman *et al.*, 2018; Bachmann y Geerts, 2018**). Como se mencionó anteriormente, el gen de la ODC constituye un objetivo transcripcional de *c-Myc*, lo que trae como consecuencia directa que las células que sobreexpresan a *c-Myc*, produzcan niveles elevados de PAs (**Bello-Fernández *et al.*, 1993; Packham y Cleveland, 1997; Nilsson *et al.*, 2005**). Se ha descubierto que un polimorfismo de un solo nucleótido en el intrón 1 del gen *odc1* está directamente relacionado con el cáncer humano. Este polimorfismo causa un aumento en la expresión de ODC en respuesta a *c-Myc* y ha sido identificado como un marcador genético para el riesgo de cáncer de colon (**Guo *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2003; O'Brien *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2015**). Ozfiliz y colaboradores en 2015 evaluaron el efecto del silenciamiento de determinados genes en la expresión de la proteína ODC en la línea celular HeLa (células de cáncer de cuello uterino), transfectadas con determinados ARNpi (ARN pequeños de interferencia). En este estudio se corroboró que el silenciamiento de *c-myc* produjo una disminución en la expresión de la ODC en dichas células. Bachmann y Geerts en 2018 consultaron datos públicos de cáncer humano en busca de mutaciones de codificación, variaciones del número de copias y desregulación del ARNm de los genes *c-myc* y *odc1*, y pudieron

concluir que en la mayoría de los casos existe una correlación positiva en los niveles de expresión de dichos genes.

Se ha propuesto un modelo en el que la ODC regulada por c-Myc contribuye a la oncogénesis, y que se basa en la propiedad que tiene c-Myc para acelerar el ciclo celular y promover la transformación carcinogénica, lo cual se logra, en parte, mediante la regulación negativa del inhibidor de las CDK: p27<sup>Kip1</sup> (Figura 8A) (Bello-Fernández *et al.*, 1993; Baudino *et al.*, 2003; Casero Jr. y Marton, 2007).



**Figura 8. Vías efectoras de c-Myc y Ras que contribuyen a la sobreexpresión de la ODC y el desarrollo de cáncer.** (A) Mecanismo por el que la ODC promueve la oncogénesis a partir de la regulación por c-Myc. La formación del complejo SCF<sup>Skp2</sup> se favorece por el incremento de los niveles de PAs intracelulares y propicia la degradación de p27<sup>Kip1</sup>, lo que posibilita el desarrollo de cáncer; y (B) Vías de señalización de los efectores de Ras implicadas en la sobreexpresión de la ODC y, por consiguiente, contribuyen a la aparición del fenotipo tumoral. La cascada de Raf/MEK/ERK influye en la transcripción del gen *odc1* y la cascada de la PI3K en la traducción de la ODC. La figura se confeccionó en BioRender (Modificadas de Casero Jr. y Marton, 2007 y de Shantz y Levin, 2007 respectivamente).

En condiciones normales, p27<sup>Kip1</sup> se une e inactiva a los complejos de CDK2 con las ciclinas E y A, que son responsables de dirigir la entrada y progresión de la fase S del ciclo celular. La

degradación de p27<sup>Kip1</sup> es llevada a cabo por el complejo de ligasa de ubiquitina SCF<sup>Skp2</sup> E3, que está compuesto por factores de unión y especificidad a p27<sup>Kip1</sup>, como SKP2 (proteína 2 asociada a la cinasa de la fase S o p45) y CKS1 (subunidad 1 de la CDK, también conocida como CKS1B), además de RBX1 (*ring-box 1*), SKP1 (proteína 1 asociada a la cinasa de la fase S) y CUL1 (culina 1) (Polyak *et al.*, 1994; Bartek y Lukas, 2001). c-Myc induce la expresión de CKS1 y SKP2, lo que promueve la degradación de p27<sup>Kip1</sup> por un mecanismo dependiente de ubiquitinación. De manera interesante, se ha comprobado que estos efectos de c-Myc en la expresión de CKS1 y SKP2, así como en la degradación de p27<sup>Kip1</sup>, requieren de la función de la ODC. Esto se evidenció al tratar las células con un inhibidor suicida de ODC, conocido como 2-difluorometilornitina (DFMO), o al presentar una condición de heterocigocidad de ODC, lo cual abolió los efectos de c-Myc sobre CKS1, SKP2 y p27<sup>Kip1</sup> (Nilsson *et al.*, 2005; Casero Jr. *et al.*, 2018). Estos hallazgos indican que las PAs desempeñan un papel crucial en la expresión de componentes clave del complejo SCF<sup>Skp2</sup>, proporcionando una conexión entre la función de la ODC, c-Myc y la regulación del ciclo celular en la transformación carcinogénica (Casero Jr. *et al.*, 2018; Sari *et al.*, 2021).

Se ha resaltado con anterioridad que la expresión de la ODC también puede ser regulada a través de las vías de los efectores de Ras (Figura 8B). Este otro oncogén es un componente esencial de múltiples vías de transducción de señales mediadas por receptores que desempeñan un papel crucial en el crecimiento y la diferenciación celular normales (Shantz y Levin, 2007). Las mutaciones puntuales activadoras constitutivas de Ras se han asociado con al menos el 20% de todos los cánceres humanos (Downward, 2003). La actividad de la ODC se incrementa drásticamente en respuesta a la activación de Ras (Hölttä *et al.*, 1988; Shantz y Pegg, 1998). Mediante el uso de inhibidores específicos de los efectores de Ras, así como de mutantes de Ras con pérdida parcial de función, se pudo comprobar la contribución individual de cada una de las vías efectoras de Ras tanto en la transcripción como de la traducción de la ODC en células NIH/3T3 (fibroblastos embrionarios de ratón) transformadas por Ras (Shantz, 2004; Shantz y Levin, 2007).

Además, se ha observado que se requiere la activación de al menos dos vías descendientes de Ras para generar un nivel elevado de actividad de la ODC (Li *et al.*, 2020; Sari *et al.*, 2021). Específicamente, la cascada de Raf/MEK/ERK se encarga de mediar la transcripción de la ODC, mientras que la cascada de la PI3K se encarga de mediar la traducción de la ODC. La activación de estas vías conlleva a un aumento en la cantidad de ARNm y proteína de la ODC, lo que ocasiona una regulación significativa de la actividad de la ODC que se observa de manera llamativa durante

la transformación causada por Ras (Shantz, 2004; Origanti y Shantz, 2007; Shantz y Levin, 2007; Degirmenci *et al.*, 2020).

En función de lo anterior, se puede concluir que la ODC juega un papel clave en varias condiciones cancerosas, de ahí que se considere como un blanco terapéutico para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (Russell, 1980; McCann y Pegg, 1992; Pegg *et al.*, 1995).

#### 1.2.4. Inhibidores de la ODC

El reconocimiento de que las PAs son indispensables para la proliferación y diferenciación celular, y que su vía metabólica se encuentra comúnmente alterada en distintos tipos de células cancerosas, han permitido considerar a la ruta de biosíntesis de estas moléculas como un objetivo farmacológico, lo que ha impulsado el desarrollo de inhibidores específicos para cada etapa de la vía (Wallace, 1996; Seiler, 2003; Wallace y Fraser, 2004). En términos de intervención terapéutica, los principales blancos para su inhibición son precisamente las dos descarboxilasas requeridas en los primeros pasos de la biosíntesis, las cuales se encuentran altamente reguladas: ODC y AdoMetDC. La inhibición de estas dos enzimas, en principio, debe resultar en una disminución del contenido intracelular de PAs (Byers *et al.*, 1992; Wallace y Fraser, 2004).

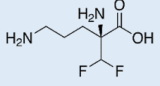
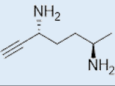
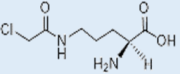
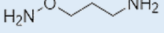
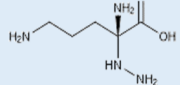
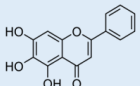
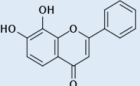
En el caso particular de la ODC, que es la responsable de catalizar la primera reacción de la vía de síntesis de PAs y que está sujeta a una compleja regulación a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional (Persson *et al.*, 1998; Pegg, 2006; Miller-Fleming *et al.*, 2015), se han desarrollado numerosos compuestos que inhiben a la enzima (Tabla 2) (Filisola-Villaseñor *et al.*, en preparación). El diseño de estas moléculas se ha basado esencialmente en la estructura del sustrato (L-ornitina) y del producto (Put), con el objetivo de dirigirlas hacia los sitios catalíticos presentes en la enzima y bloquear su actividad, aunque se han identificado otras sustancias de origen natural con capacidad antiproliferativa que también muestran un potente efecto inhibitor sobre la ODC (Wallace y Fraser, 2004; Liu *et al.* 2016a; Liu *et al.*, 2020).

La mayoría de estos inhibidores se han probado en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, donde se ha observado que pueden detener el crecimiento y prevenir la diferenciación en células tumorales. De todos, la DFMO es el compuesto más ampliamente utilizado (McCann y Pegg, 1992; Meyskens Jr. y Gerner, 1999; Alexiou *et al.*, 2017; LoGiudice *et al.*, 2018; Holbert *et al.*, 2022). Este es un inhibidor competitivo irreversible de la ODC, el cual se dirige a la interfase homodimérica que contiene al PLP, lo que significa que compite con la L-ornitina por la unión a los sitios activos. Después, la DFMO sufre una descarboxilación por parte de la ODC, generando



un intermediario altamente reactivo que bloquea la actividad de la enzima al formar enlaces covalentes con el PLP y con el residuo de Cys360' (Pegg *et al.*, 1987; Poulin *et al.*, 1992; LoGiudice *et al.*, 2018).

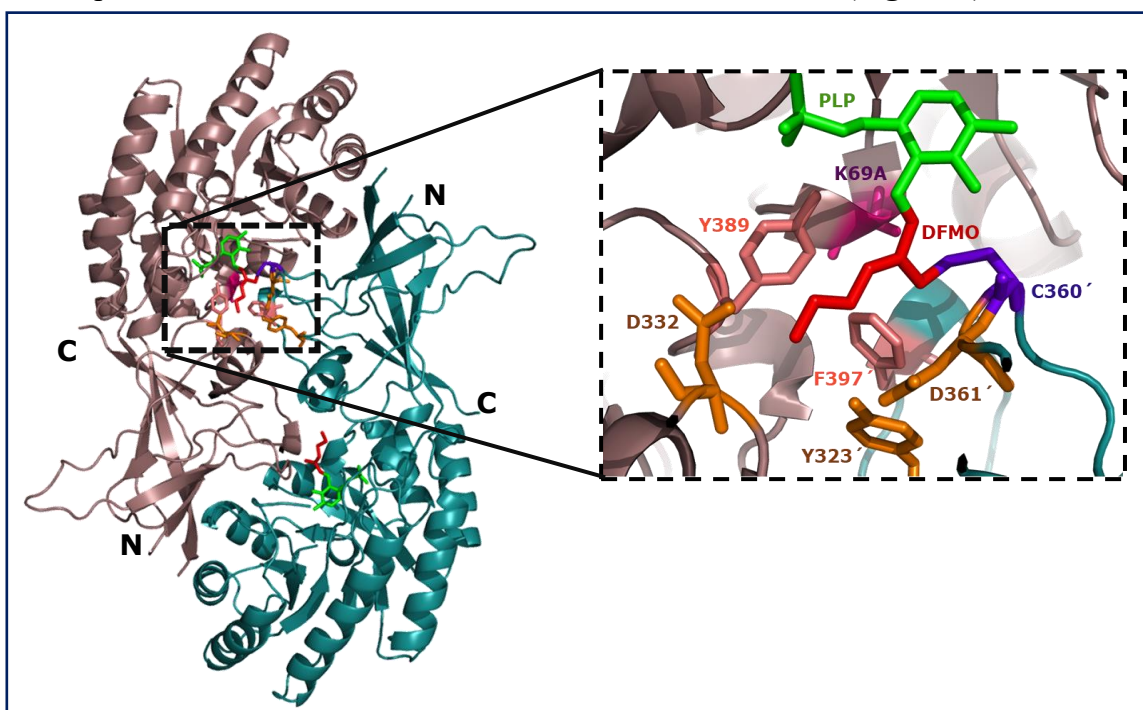
**Tabla 2. Algunos compuestos desarrollados que inhiben directamente a la ODC.**

Fármaco	Tipo de inhibición	K <sub>i</sub>	Estado actual	Referencias
<b>DFMO</b> 	Inhibidor competitivo irreversible	1-39 μM	Aprobado para el tratamiento de la tripanosomiasis africana humana y el hirsutismo; múltiples ensayos clínicos de cáncer en curso, incluidos ensayos de quimioprevención.	(Bachmann y Geerts, 2018) (LoGiudice <i>et al.</i> , 2018) (Sholler <i>et al.</i> , 2018) (Weicht <i>et al.</i> , 2018) (Lewis <i>et al.</i> , 2020)
<b>MAP</b> 	Inhibidor competitivo irreversible	3 μM	El ensayo de fase I se ha completado, pero no ha tenido más avances.	(Danzin <i>et al.</i> , 1983) (Bartholeyns <i>et al.</i> , 1984) (Combleet <i>et al.</i> , 1989) (Carmichael <i>et al.</i> , 1990)
<b>NCAO</b> 	Inhibidor competitivo reversible	59 μM	Sus efectos citotóxicos y antiproliferativos solo han sido evaluados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	(Correa-Basurto <i>et al.</i> , 2009) (Medina-Enríquez <i>et al.</i> , 2015) (Vargas-Ramírez <i>et al.</i> , 2016)
<b>APA</b> 	Inhibidor competitivo reversible	1.4-3.2 nM	Su efecto antiproliferativo solo ha sido evaluado <i>in vitro</i> .	(Khomutov <i>et al.</i> , 1985) (Dufe <i>et al.</i> , 2007) (Weisell <i>et al.</i> , 2014) (Zhou <i>et al.</i> , 2021)
<b>DL-HAVA</b> 	Inhibidor competitivo reversible	0.52 μM	Solo se ha probado en ensayos de actividad enzimática <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	(Inoue <i>et al.</i> , 1975) (Kato <i>et al.</i> , 1976) (Hölttä <i>et al.</i> , 1981) (Takano <i>et al.</i> , 1983) (Gohda <i>et al.</i> , 1983)
<b>Baicaleína</b> 	Inhibidor no competitivo	0.64 μM	Sus efectos citotóxicos y antiproliferativos solo se han evaluado <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	(Liu <i>et al.</i> , 2016a) (Liu <i>et al.</i> , 2020)
<b>Tropoflavina</b> 	Inhibidor no competitivo	1.4 μM	Sus efectos antitumorales solo han sido evaluados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	(Liu <i>et al.</i> , 2016b) (Liu <i>et al.</i> , 2020)

**DMFO:** α-difluorometilornitina; **MAP:** (2R,5R)-6-heptino-2,5-diamina; **NCAO:** N-ω-cloroacetyl-L-ornitina; **APA:** 1-amino-oxi-3-aminopropano; **DL-HAVA:** Ácido DL-α-hidrazino-delta-aminovalérico. Baicaleína y Tropoflavina son flavonoides de origen vegetal (Modificada de Filisola-Villaseñor *et al.*, en preparación).

Se ha comprobado que tanto los enantiómeros L como los D de la DFMO pueden inactivar de manera irreversible a la ODC, sin embargo, la forma L presenta una afinidad 20 veces en comparación con la forma D (Qu *et al.*, 2003). A pesar de que se han identificado y probado otros

inhibidores de la ODC más potentes, ninguno ha demostrado ventajas claras en comparación con la DFMO (Levin *et al.*, 1992; Casero Jr. y Marton, 2007; Alexiou *et al.*, 2017). Es importante destacar que este compuesto fue aprobado inicialmente por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) en 1990 como un agente eficaz para el tratamiento de la tripanosomiasis africana humana (ocasionada por el parásito *Trypanosoma brucei*) y, posteriormente, del hirsutismo (Priotto *et al.*, 2009; Chen y Luke, 2021). La inhibición de la ODC de *T. brucei* (TbODC) por la DFMO conduce a la pérdida de la biosíntesis de PAs, que es esencial para su replicación y supervivencia (LoGiudice *et al.*, 2018). En 1999, Grishin y colaboradores obtuvieron la estructura cristalina de la mutante K69A de la TbODC unida a la DFMO en presencia de su cofactor PLP, con una resolución de 2.9 Å (Figura 9).



**Figura 9. Estructura 3D de un homodímero de la TbODC + PLP + DFMO.** Se muestra una imagen ampliada de la interfase entre el dominio C-terminal de un monómero y el dominio N-terminal del otro, en unión a la DFMO y en presencia de PLP. Dentro de un único sitio activo, la DFMO forma un puente entre los dos monómeros formando una base de Schiff con el PLP en un monómero y un enlace covalente con la Cys360' del otro monómero. La mutación K69A aparece de color magenta. Los residuos de color naranja (D332, Y323' y D361') pueden formar enlaces de hidrógeno con la DFMO, ya sea de manera directa en el caso del primero o a través de una molécula de agua en el caso de los otros dos, mientras que los residuos de color rosa (Y389 y F397') establecen interacciones hidrofóbicas con éste. Esta figura se realizó en el programa PyMOL: código PDB 2TOD (Modificada de Grishin *et al.*, 1999).

Es interesante destacar que la DFMO muestra una afinidad similar tanto por la TbODC como por la HsODC, inactivando eficazmente ambas enzimas. Sin embargo, hay una diferencia importante: la enzima humana se renueva rápidamente, con una vida media inferior a una hora, mientras que la ODC del parásito tiene una vida media mucho más larga, superior a las 6 horas. Como resultado, la biosíntesis de PAs en los tripanosomas se ve afectada de manera selectiva por este inhibidor suicida en comparación con el hospedero humano (**Wang, 1991; LoGiudice et al., 2018**). El estudio anterior proporcionó las bases estructurales para comprender el mecanismo de inhibición que lleva a cabo la DFMO sobre la TbODC a nivel molecular, así como los residuos de la enzima con los que interactúa. También permitió comparar de forma detallada las estructuras de la ODC del hospedero (humano) y del parásito (*T. brucei*), lo que puede contribuir al diseño de inhibidores selectivos (**Grishin et al., 1999**).

En experimentos con cultivos de tejidos, la inhibición de la ODC por la DFMO resulta generalmente en una disminución casi total de la concentración intracelular de Put y Spd, pero su efecto sobre la concentración de Spm es variable y, en algunos casos, puede aumentar. La reducción de la Put y la Spd se acompaña comúnmente de una disminución significativa en la tasa de crecimiento celular que se puede revertir mediante la adición de Put exógena (**Gerner y Mamont, 1986; Monti et al., 1999; Li et al., 2002**), aunque la citotoxicidad evidente solo se observa en raros casos de células de mamíferos (**Mamont et al., 1978; Bey et al., 1978; Casero Jr. y Marton, 2007**). Si bien esto parece contradictorio, en realidad puede ser un resultado deseable, ya que la DFMO podría preservar a las células normales de los efectos más perjudiciales del agotamiento de las PAs, mientras que las células tumorales con alteraciones en el metabolismo de estas moléculas podrían verse más afectadas. Esta selectividad potencial entre tumores y células normales se ha observado en varios tipos de cáncer, lo que ha llevado a investigar la DFMO como agente único en ensayos clínicos (**Luk et al., 1981; Luk et al., 1982**). Su eficacia se ha evaluado clínicamente contra diversos modelos de tumores, como gliomas, melanomas, cáncer de mama, colon, próstata y cervical, tanto en monoterapia como en combinación con otros agentes (**Horn et al., 1987; Ganju et al., 1994; Levin et al., 2003; Casero Jr. y Marton, 2007**).

Cuando se combina con una dieta libre de PAs, la DFMO muestra efectos más pronunciados *in vivo*, lo que sugiere la utilidad de combinar su uso con inhibidores del transporte de PAs (ITP) como parte de una "terapia de bloqueo de PAs" (**Hessels et al., 1989; Leveque et al. 1998; Holbert et al., 2022**). Aunque los primeros ITPs eran altamente tóxicos o no lograban prevenir por completo

el transporte de PAs, los avances en la química de éstos han permitido desarrollar inhibidores efectivos con una toxicidad mínima (**Huber *et al.*, 1996; Weeks *et al.*, 2000; Burns *et al.*, 2009; Muth *et al.*, 2014**). Entre ellos, se destacan el AMXT 1501 y el Trimer44NMe, que son los ITPs más estudiados. Su combinación con la DFMO ha demostrado inhibir el crecimiento tumoral en modelos de ratones con cáncer de colon, melanoma, cáncer de mama, neuroblastoma, glioma y cáncer de páncreas resistentes a la quimioterapia (**Alexander *et al.*, 2017; Gitto *et al.*, 2018; Holbert *et al.*, 2022**).

En los últimos años, se ha descubierto un papel alternativo para la DFMO como agente quimiopreventivo, es decir, que puede ser usado para prevenir el desarrollo de cáncer y, potencialmente, causar la regresión de tumores existentes (**Love *et al.*, 1998**). Actualmente está siendo sometida a rigurosas pruebas clínicas en varios tipos de cánceres epiteliales, como el cáncer de próstata y el cáncer de colon (**Bailey *et al.*, 2010; Corral y Wallace, 2020**). Es importante destacar que las dosis de DFMO utilizadas en los ensayos de quimiopreención son significativamente más bajas que las dosis utilizadas en los ensayos terapéuticos (**Casero Jr. y Marton, 2007**). Según el estudio realizado por Meyskens y colaboradores en 1994, se ha observado que la administración regular de dosis bajas de DFMO puede mantener niveles suprimidos de PAs en el colon a largo plazo, lo cual puede tener un efecto limitante en el crecimiento de tumores. Aunque aún se necesita establecer evidencia sobre las posibles toxicidades a largo plazo asociadas con estas dosis más bajas (**Wallace y Fraser, 2004**).

## 2. ANTECEDENTES

El modo de acción de cualquier proteína depende estrechamente de la disposición espacial de sus cadenas de aminoácidos. Su configuración molecular, junto con su composición atómica, determina qué sustancias pueden interactuar con ella y qué reacciones químicas puede llevar a cabo o catalizar. El conocimiento de la estructura 3D de estas macromoléculas no solo proporciona información sobre los procesos biológicos, sino que también tiene importantes aplicaciones prácticas (Greer *et al.*, 1994; Congreve *et al.*, 2005).

La estructura 3D de la enzima HsODC ya ha sido determinada previamente mediante cristalografía de rayos X por diferentes investigadores. Sus estructuras cristalizadas están disponibles en el Banco de Datos de Proteínas (PDB, del inglés *Protein Data Bank*) en siete conformaciones diferentes [PDB ID: 1D7K, 2ON3, 2OO0, 7S3F, 7S3G, 7U6P y 7U6U]. En la **Tabla 3** se muestra la resolución de cada una de ellas, así como los residuos que abarcan y los ligandos que presentan. Estas ofrecen la posibilidad de realizar operaciones de acoplamiento y análisis *in silico* tanto en presencia como en ausencia de su ligando intrínseco, cofactores, productos, inhibidores u otras moléculas que puedan unirse a la enzima, ya sea en su sitio catalítico o en un determinado sitio alostérico (Sivashanmugam *et al.*, 2017).

**Tabla 3. Estructuras de la HsODC obtenidas por cristalografía de rayos X y registradas en la Base de Datos de Proteínas (Tomado de Uniprot: P11926).**

PDB ID	Resolución (Å)	Residuos	Ligandos	Referencia
1D7K	2.10	7-427	PLP	(Almrud <i>et al.</i> , 2000)
2ON3	3.00	1-461	APA	(Dufe <i>et al.</i> , 2007)
2OO0	1.90	1-461	PLP, APA, Cad	(Dufe <i>et al.</i> , 2007)
7S3F	2.49	1-424	PLP, APA	(Zhou <i>et al.</i> 2021)
7S3G	1.66	1-424	PLP, Ácido cítrico	(Zhou <i>et al.</i> 2021)
7U6P	2.35	1-424	-	(Zhou <i>et al.</i> 2022)
7U6U	1.85	1-424	PLP	(Zhou <i>et al.</i> 2022)

En el 2000 se publicó la primera estructura cristalográfica de la HsODC recombinante [PDB ID: 1D7K], la cual se determinó por reemplazamiento molecular utilizando la ODC truncada de ratón ( $\Delta$ 425-461) como modelo de búsqueda. Esta consiste en un homodímero que abarca los aminoácidos 7-421 con agua como solvente, donde el PLP se encuentra unido covalentemente a la Lys69 de cada monómero, formando el N'-piridoxil-lisina-5'-monofosfato (Almrud *et al.*, 2000).

Posteriormente, se obtuvieron otras estructuras de la ODC con su cofactor PLP, y también en complejo con el inhibidor APA [PDB ID: 2ON3, 2OO0, 7S3F] (**Dufe et al., 2007; Zhou et al., 2021**). Este es un análogo isostérico de la Put que puede permear a través de la membrana celular e inhibir a la ODC en concentración nanomolar, y ha mostrado efectos antiproliferativos en diferentes líneas tumorales (**Khomutov et al., 1985; Stanek et al. 1992; Hyvönen et al., 1988; Mett et al. 1993; Milovica et al., 2001**), aunque estos han sido relativamente débiles. Al parecer, dicha molécula tiende a ser metabolizada de manera rápida por las células (**Poulin et al., 1989; Hyvönen et al., 1990**). El grupo amino-oxi del APA tiene un pKa de 4.2 y, por lo tanto, no se protona a pH fisiológico, lo que lo hace más reactivo para formar una base de Schiff con el PLP que la L-ornitina o la Put (**Khomutov, 2002; Weisell et al., 2014; Zhou et al., 2021**). Este mecanismo muestra una clara similitud con la inhibición de la aspartato aminotransferasa mitocondrial mediante derivados de la hidroxilamina (**Marković-Housley et al., 1996**). Sin embargo, como se mencionó previamente, en el sitio activo de la ODC, el grupo carbonilo del PLP forma una "aldimina interna" con el grupo  $\epsilon$ -amino de la Lys69. Esta interacción incrementa significativamente la reactividad de la ODC hacia las hidroxilaminas en comparación con la velocidad de reacción del grupo carbonilo no conjugado del PLP con hidrazinas e hidroxilaminas O-sustituidas. La elevada reactividad de la aldimina interna es la razón por la cual la inhibición de la ODC por parte de APA y compuestos similares no ha progresado con el paso del tiempo (**Dirksen y Dawson, 2008; Weisell et al., 2014**).

Aunque se han desarrollado numerosas moléculas que inhiben directamente a la HsODC, ninguna ha mostrado resultados prometedores en los ensayos clínicos, excepto la DMFO (**Sivashanmugam et al., 2017**). Sin embargo, los estudios han demostrado que cuando se usa la DFMO en monoterapia, este fármaco muestra un efecto limitado (**Metcalf et al. 1978; Pegg, 1988; Wallace y Fraser, 2004; Casero Jr. et al., 2018**). En la terapia contra el cáncer, la DFMO ha tenido menos éxito, produciendo efectos citostáticos en lugar de citotóxicos *in vivo* (**Pegg et al., 1982**). Los resultados poco satisfactorios con la DFMO como agente único probablemente se deben a factores farmacocinéticos y farmacodinámicos. Al tratarse de una molécula zwitteriónica cargada, la DFMO no puede difundir libremente a través de la membrana plasmática, de ahí que su capacidad de transporte hacia el interior de la célula sea limitada e ineficiente, por lo que se requiere una alta concentración para mantener la inhibición de la ODC y el agotamiento de las PAs (**Casero Jr. y Marton, 2007; Vincent et al., 2010**). Además, los mecanismos compensatorios que resultan

del agotamiento de PAs por la DFMO, incluyendo la reducción incompleta del contenido de Spm y su retroconversión a Spd y Put, la sobreexpresión de la AdoMetDC y el aumento de la captación de PAs circulantes, contribuyen a la falta de eficacia clínica demostrada hasta ahora (**Alhonen-Hongisto et al., 1980; Gerner y Mamont, 1986**). Por otro lado, los ensayos de Fase I y II realizados con este fármaco han reportado que su dosis máxima tolerada es de 3 g/m<sup>2</sup>/día (la dosis de la Fase II fue de 2.25 g/m<sup>2</sup>/día) (**Meyskens Jr. y Gerner, 1999; Basuroy y Gerner, 2006; Casero Jr. y Marton, 2007**), y se han detectado efectos secundarios en los pacientes como pérdida reversible de la audición, efectos gastrointestinales y trombocitopenia, aunque se debe resaltar que las toxicidades observadas se consideran menores en comparación con otros agentes quimioterapéuticos contra el cáncer (**Coyne Jr., 2001; Smith y Skelton, 2006; Casero Jr. y Marton, 2007; LoGiudice et al., 2018**). También hay que tener en cuenta que la DFMO tiene una vida media en suero de 1.5 a 5 h y el 80% se excreta en la orina. Su eliminación rápida de la sangre hace que sean necesarias dosis de tratamiento elevadas, y estas propiedades farmacocinéticas deficientes hacen que el compuesto sea menos ideal (**Babokhov et al., 2013; LoGiudice et al., 2018**). Lo anterior exige el descubrimiento de inhibidores novedosos y biológicamente seguros que puedan atacar potencialmente a la ODC y, de esta forma, ser usados como agentes efectivos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

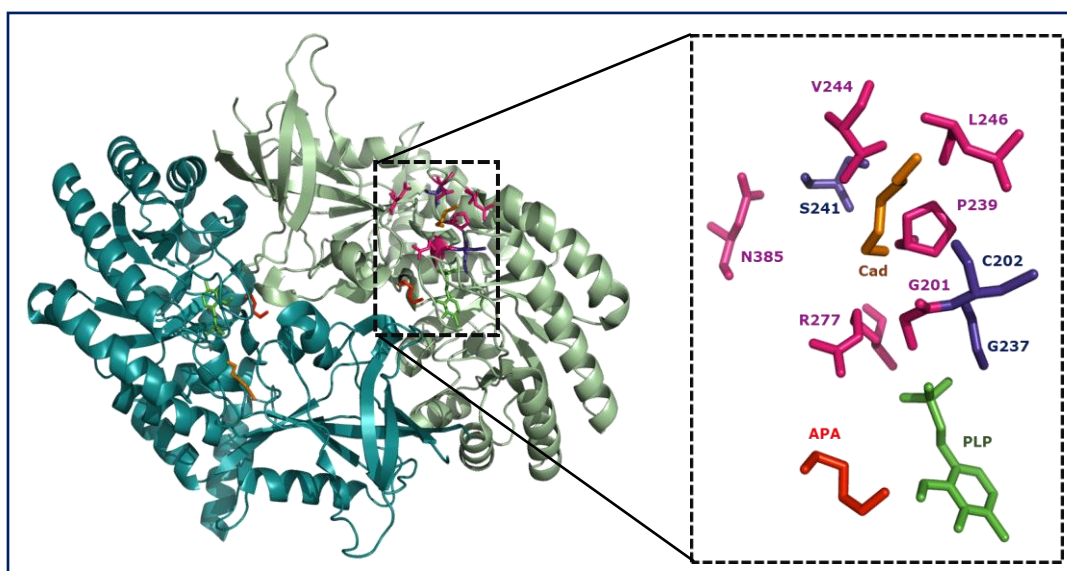
Las PAs que se encuentran más comúnmente en los mamíferos son la Put, la Spd y la Spm, ya que estos presentan toda la maquinaria enzimática requerida para su síntesis (**Williams-Ashman y Canellakis, 1979; Pegg, 2016; Sagar et al., 2021**). No obstante, diferentes reportes han informado también la presencia de Cad en estos organismos, aunque en menor concentración (**Pegg y McGill, 1979; Andersson y Henningson, 1980; Matsuzaki et al., 1981**). La Cad constituye el producto de la descarboxilación de la L-lisina, una reacción que es catalizada por la lisina descarboxilasa (LDC). Esta enzima ha sido identificada en bacterias (*E. coli*, *Vibrio* sp., *Lactobacillus* sp., etc.), cianobacterias y plantas (leguminosas, solanáceas y gramíneas), mientras que para hongos y células de animales no se ha descrito ningún gen de LDC (**Kusano et al., 2008; Tomar et al., 2013; Miller-Fleming et al., 2015**). Se ha sugerido que la ODC es la enzima responsable de sintetizar Cad en estos casos, aunque otras vías de biosíntesis también podrían estar involucradas (**Whitney et al., 1978; Pegg y McGill, 1979**). De manera interesante, se ha observado que las ODCs de *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *S. cerevisiae* y la humana pueden utilizar también a la L-lisina como sustrato y producir Cad (**Pegg y McGill, 1979; Olin-Sandoval et al., 2019; Filisola-Villaseñor et**

*al., en preparación*). En la **Tabla 4** se muestran las constantes de afinidad (Km) que se reportaron para la L-ornitina y la L-lisina de la ODC de algunos de estos organismos y se puede apreciar que las Km de las ODCs por la L-ornitina son menores con respecto a las de la L-lisina. En los experimentos realizados con tejidos de rata y ratón se concluyó, además, que la producción significativa de Cad *in vivo* solo tiene lugar cuando la actividad de la ODC es alta y la concentración de L-lisina excede sustancialmente la de L-ornitina (**Pegg y McGill, 1979**).

**Tabla 4.** Valores de constantes de afinidad (Km) de la L-ornitina y la L-lisina reportados para las ODCs de *R. norvegicus* y *S. cerevisiae*.

ODC	Sustrato	Km (mM)	Referencia
<i>R. norvegicus</i>	L-Ornitina	0.090	(Pegg y McGill, 1979)
	L-Lisina	9.20	
<i>S. cerevisiae</i>	L-Ornitina	0.0318 ± 0.006	(Olin-Sandoval <i>et al.</i> , 2019)
	L-Lisina	3.178 ± 1.5	

Un descubrimiento de gran relevancia se obtuvo también mediante cristalografía de rayos X por Dufe y colaboradores en 2007, quienes determinaron que la Cad se podía unir a la HsODC en un sitio alostérico presente en la enzima, próximo a su sitio catalítico, como se puede apreciar en la **Figura 10**, donde aparecen resaltados los residuos que interactúan con esta molécula.



**Figura 10.** Estructura 3D de un homodímero de la HsODC + PLP + APA + Cad. Se muestra una imagen ampliada del sitio de unión a Cad de un monómero, localizado entre los dominios N- y C-terminal, próximo al sitio catalítico. Los residuos de color púrpura (G237, C202 y S241) pueden formar enlaces de hidrógeno con la Cad, ya sea a través de una molécula de agua en el caso de los dos primeros, o de manera directa en



el caso del tercero, mientras que los residuos de color magenta (R277, N385, G201, P239, L246 y V244) pueden establecer interacciones potenciales con la molécula. Esta figura se realizó en el programa PyMOL: código PDB 2000 (Modificada de **Dufe *et al.*, 2007**).

Estos modelos estructurales basados en complejos enzima-ligando pueden proporcionar una sólida base para construir un marco representativo y explorar compuestos que potencialmente puedan inhibir de manera específica la actividad enzimática de la HsODC. Además, pueden ofrecer información válida acerca del mecanismo de inhibición involucrado y los residuos de la enzima con los que interactúa la molécula inhibidora (**Grishin *et al.*, 1999**; **Sivashanmugam *et al.*, 2017**).

Tomando en cuenta esto y considerando que la HsODC tiene sitios de unión a L-lisina y Cad, un estudio *in silico* desarrollado en nuestro laboratorio por Filisola-Villaseñor y colaboradores (en preparación) se enfocó en la búsqueda de todas aquellas proteínas que habían sido cristalizadas con lisina y, posteriormente, en encontrar en la base de datos BRENDA los inhibidores de dichas proteínas. Después de verificar su disponibilidad comercial, realizaron un análisis de acoplamiento molecular con el objetivo de evaluar la interacción de estas moléculas tanto en el sitio catalítico de la enzima como en el sitio de unión a Cad. Este estudio arrojó una serie de compuestos con estructura similar a la lisina, que pueden actuar potencialmente como inhibidores de la HsODC. Se hizo una selección de 30 compuestos que fueron los que presentaron menores valores de constante de inhibición teórica ( $K_i \text{ teórica} \leq 1 \text{ mM}$ ) y menores  $\Delta G^\circ$ . Además, los 30 compuestos fueron probados en ensayos de termoestabilidad con la HsODC. Los resultados de estos ensayos permitieron seleccionar a la sulfadiazina (Sulf) y al ácido aminocaproico (ACA) como ligandos que pueden unirse potencialmente a la enzima y estabilizar su conformación nativa.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Dada la gran importancia de las PAs en la proliferación y supervivencia de células sanas, pero más aún de células cancerígenas, y que sus niveles se encuentran elevados en estas últimas, la atención se ha dirigido fundamentalmente al bloqueo de la actividad de la HsODC, una de las enzimas clave en la ruta de biosíntesis de estas moléculas. La inhibición de la HsODC constituye un blanco terapéutico para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Los inhibidores canónicos utilizados con este fin en la actualidad resultan tóxicos en altas dosis. Entonces, la búsqueda de nuevos inhibidores más eficientes requiere de la comprensión del mecanismo de unión de estas moléculas mediante estudios estructurales, por lo que resulta necesario obtener cristales de la enzima unida a dichos inhibidores con el tamaño y calidad apropiados, lo que permitiría resolver su estructura 3D mediante cristalografía de rayos X.

### **4. HIPÓTESIS**

La determinación de las condiciones óptimas de cristalización permitirá obtener cristales de HsODC unida a ligandos análogos a la lisina, con la calidad de difracción requerida para dilucidar posteriormente su estructura 3D mediante cristalografía de rayos X.

### **5. OBJETIVOS**

#### **5.1. Objetivo general**

Determinar las condiciones óptimas de cristalización de la HsODC en complejo con ligandos análogos a la lisina.

#### **5.2. Objetivos particulares**

- ✓ Obtener la HsODC recombinante con un alto grado de pureza.
- ✓ Generar cristales de la HsODC unida a ligandos análogos a la lisina.
- ✓ Analizar los cristales obtenidos mediante difracción de rayos X.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de lograr los objetivos establecidos, en primer lugar, se sobreexpresó la HsODC en células SoluBL21 de *E. coli* quimiocompetentes. Se purificó la enzima mediante técnicas cromatográficas con el empleo de equipos ÄKTA Pure 25 L/M de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*) (*Cytiva*), y se evaluó la pureza por SDS-PAGE. Luego, se generaron cristales de la HsODC purificada en presencia de los ligandos propuestos (Sulf y ACA) y, finalmente, se optimizaron las condiciones de cristalización.

### 6.1. Cepas bacterianas y medios para su cultivo

Se utilizaron las siguientes cepas de *E. coli*:

- **TOP10** [ $F^-$ , *mcrA*,  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ ,  $\phi 80lacZ\Delta M15$ ,  $\Delta lacX74$ , *recA1*, *araD139*,  $\Delta(ara-leu)7697$ , *galU*, *galK*,  $\lambda^-$ , *rpsL*, (*Str<sup>R</sup>*), *endA1*, *nupG*]
- **SoluBL21** [ $F^-$ , *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>* ( $r_B^-$ ,  $m_B^-$ ), *gal*, *dcm*, (DE3)]

Para el trabajo con las cepas anteriores se emplearon los siguientes medios de cultivo:

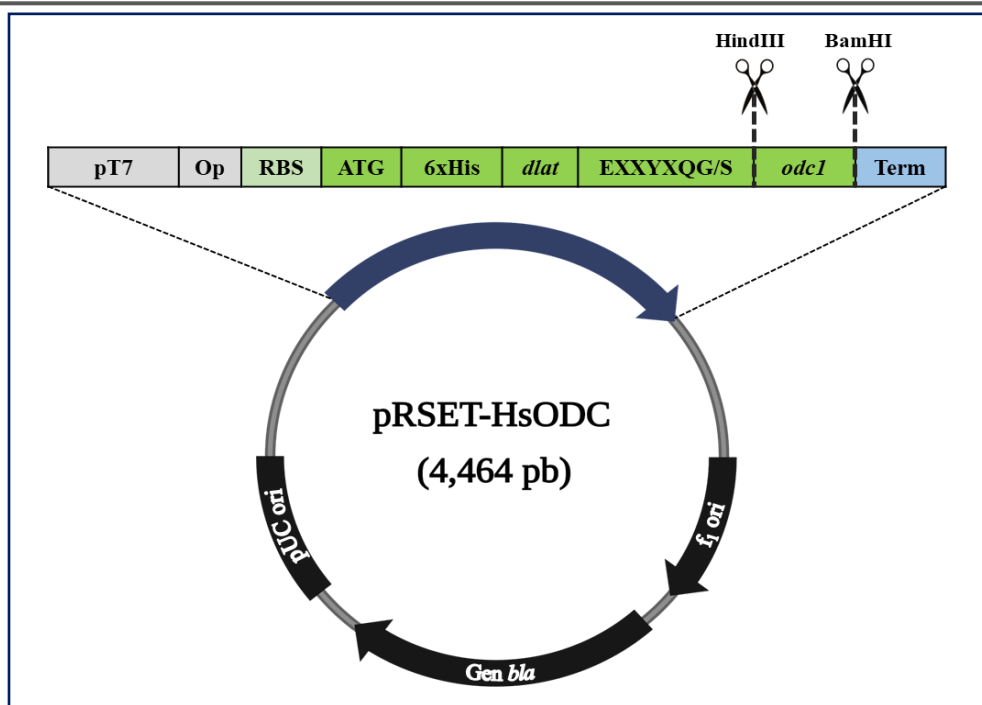
- **Luria Bertani (LB)**: 2 % (p/v) de LB (para la preparación de medio Agar-LB se añadió 1.5 % (p/v) de agar al medio LB).
- **SOB**: 0.5 % (p/v) de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl.
- **SOB++**: medio SOB suplementado con 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 10 mM de MgSO<sub>4</sub>.
- **SOC**: medio SOB suplementado con 20 mM de glucosa.
- **2xYT**: 1.6 % (p/v) de triptona, 1 % (p/v) de extracto de levadura y 85.5 mM de NaCl.

### 6.2. Enzimas

Las enzimas *Hind*III y *Bam*HI, así como sus tampones, se obtuvieron de la casa comercial *New England BioLabs* (EUA). La proteasa del Virus del Grabado del Tabaco (TEV, del inglés *Tobacco Etch Virus*) se obtuvo y se purificó previamente en nuestro laboratorio (**Filisola-Villaseñor et al., en preparación**).

### 6.3. Vector de expresión

Se usó como vector de expresión el plásmido pRSET-HsODC (**Figura 11**), que contiene el gen que codifica para la HsODC (**Filisola-Villaseñor et al., en preparación**). Este vector se obtuvo de una biblioteca de plásmidos de nuestro laboratorio.



**Figura 11. Representación esquemática del vector de expresión pRSET-HsODC.** Este plásmido contiene un origen de replicación en *E. coli* (pUC ori), un origen de replicación del bacteriófago f1 (f1 ori) y un gen de resistencia a la ampicilina (Gen *bla*). El cassette de expresión cuenta con el promotor del bacteriófago T7 (pT7), la región operadora del operón *lac* (Op), un sitio de unión a ribosomas (RBS, del inglés *Ribosome binding site*), un codón de inicio (ATG), una secuencia que codifica para una etiqueta de seis histidinas (6xHis) seguida de otra que codifica para un dominio dihidrolipoil lisina acetiltransferasa derivado del complejo piruvato deshidrogenasa de *Geobacillus* sp. (*dlat*), un sitio de corte para la proteasa TEV (EXXYXQG/S), el gen *odc1* delimitado por sitios de restricción para las endonucleasas *Hind*III y *Bam*HI y un codón de terminación. La figura se confeccionó en BioRender (Modificado de **Gopinath et al., 2016**).

#### 6.4. Preparación de células de *E. coli* SoluBL21 competentes por el método químico

Se realizó una siembra por agotamiento de las células SoluBL21 de *E. coli* en una placa con Agar-LB, y se incubó durante 18 h a 37 °C. Se tomaron 5 colonias, se inocularon en 20 mL de medio SOB, y se incubaron a 37 °C y 150 rpm durante toda la noche. Se adicionó el preinóculo en un matraz Erlenmeyer (500 mL) estéril con 250 mL de medio SOB++ y se incubó a temperatura ambiente (TA) hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm ( $Abs_{600}$ ) entre 0.3 - 0.6 unidades. Posteriormente, se incubaron en hielo de 30 a 60 min y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min a 4 °C en el rotor JA-14. Se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 27 mL de tampón CCMB80 estéril (10 mM de  $CH_3COOK$  a pH 7.0, 80 mM de  $CaCl_2$ , 20 mM de

MnCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y glicerol al 10 %). Se volvió a incubar en hielo por 20 min y se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min a 4 °C en el rotor JA-14. El sedimento celular se resuspendió en 5 mL de tampón CCMB80 estéril. Se mezclaron 800 µL de medio SOC y 200 µL de la suspensión celular y se midió la Abs<sub>600</sub>. Se hizo un ajuste posterior con tampón CCMB80 estéril hasta alcanzar una Abs<sub>600</sub> entre 1 - 1.5 unidades. Se realizaron alícuotas de 50 µL en microtubos de 0.5 mL y se almacenaron a -80 °C.

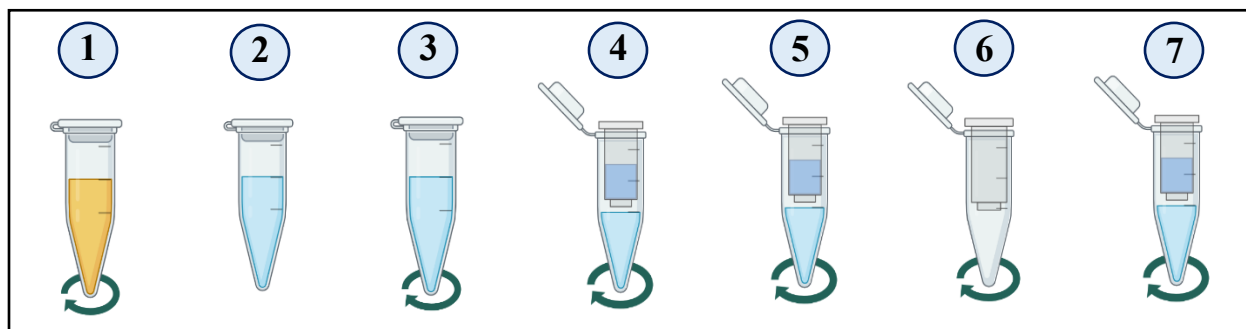
Para evaluar la competencia de las células, se transformaron por choque térmico 50 µL de células competentes con 10 pg del plásmido pUC12 (ver epígrafe 6.5). Como control negativo, se realizó el mismo procedimiento con otra alícuota de 50 µL de células, pero en ausencia de ADN plasmídico. Una vez que se transformaron las células, se sembraron por diseminación en 4 placas con Agar-LB y ampicilina (100 µg/mL): en una se sembraron 50 µL del control negativo, mientras que en las 3 placas restantes se sembraron 10, 25 y 50 µL de las células transformadas con pUC12, y se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

#### **6.5. Transformación de células *E. coli* TOP10 y SoluBL21 quimiocompetentes**

Se transformaron células TOP10 y SoluBL21 quimiocompetentes con el vector de expresión pRSET-HsODC (ver epígrafe 6.2) mediante choque térmico. Para ello, se mezcló 1 µg de plásmido (pRSET-HsODC) con 50 µL de células quimiocompetentes y se incubaron en hielo durante 30 min. La preparación de células con ADN se incubó posteriormente a 42 °C por 35 seg, y, de manera inmediata, se colocó en hielo y se incubó por 2 min. Se adicionaron 400 µL de medio SOB a las células y se incubaron a 37 °C y 180 rpm durante 1 h. Se centrifugó a 12,500 rpm por 3 min y se desechó el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en aproximadamente 25 µL del medio remanente y se sembró por diseminación en una placa con Agar-LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL). La placa se incubó a 37 °C durante toda la noche.

#### **6.6. Purificación de ADN plasmídico a pequeña escala**

Para disponer de una mayor cantidad de vector pRSET-HsODC, se picaron 5 colonias de células TOP10 quimiocompetentes transformadas previamente con el plásmido de interés (ver epígrafe 6.5) y se inocularon en 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL). El cultivo de células se incubó a 37 °C y 180 rpm durante toda la noche. El ADN plasmídico se extrajo de las células y se purificó con el empleo del **FastGene® Plasmid Mini Kit** (NIPPON Genetics Co., Ltd.) según las instrucciones del fabricante (**Figura 12**).



**Figura 12. Protocolo para la extracción y purificación de ADN plasmídico por el *FastGene® Plasmid Mini Kit*.** (1) Cosecha de células: se centrifugó el cultivo de células (5 mL) a 10,000 rpm por 2 min y se desechó el sobrenadante. (2) Lisis: el sedimento celular se resuspendió en 200  $\mu$ L de tampón mP1 (contiene RNasa A), se adicionaron 200  $\mu$ L de tampón de lisis mP2 y se invirtió el tubo para mezclar, se incubó por 2 min a TA, se adicionaron 300  $\mu$ L de tampón de neutralización mP3 y se invirtió el tubo para mezclar. (3) Clarificación del lisado: se centrifugó el lisado celular a 13,000 rpm durante 2 min. (4) Carga de la muestra: se cargó el sobrenadante en una columna FastGene® mP, se centrifugó a 13,000 rpm por 30 seg y se desechó el filtrado. (5) Lavado de membrana: se adicionaron en la columna 400  $\mu$ L de tampón de primer lavado mP4, se centrifugó a 13,000 rpm por 30 seg y se desechó el filtrado, se adicionaron 600  $\mu$ L de tampón de segundo lavado mP5, se centrifugó a 13,000 rpm por 30 seg y se desechó el filtrado. (6) Secado de resina: se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min y se transfirió la columna a un tubo nuevo. (7) Elución: se adicionaron 50  $\mu$ L de agua estéril libre de nucleasas en la columna y se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 min a TA. La figura se confeccionó en BioRender.

Se determinó la concentración del ADN plasmídico purificado en el espectrofotómetro NanoDrop™ (*Thermo Scientific™*) a una longitud de onda de 260 nm y se conservó a -20 °C. Se realizó un análisis con enzimas de restricción (*HindIII* y *BamHI*) en gel de agarosa (ver epígrafes 6.7 y 6.8) para verificar que el ADN plasmídico correspondía con el vector de expresión pRSET-HsODC.

### 6.7. Digestión del ADN plasmídico con enzimas de restricción

El ADN plasmídico purificado se sometió a una digestión con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*. El ADN se linealizó en presencia de una sola enzima (*HindIII*), así como en presencia de ambas. Se incubaron las reacciones individuales a 37 °C durante 1 h. Los productos de la digestión se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v) (ver epígrafe 6.8).

Los componentes de la mezcla de reacción aparecen representados en la **Tabla 5**:

**Tabla 5. Composición de la mezcla de reacción utilizada para el ensayo de restricción.**

Componente	Volumen (reacción de 50 $\mu$ L)	Concentración final
Agua libre de nucleasas	Aforar a 50 $\mu$ L	N/A
Tampón <i>CutSmart</i> (10x)	5 $\mu$ L	1x
Enzima de restricción (20 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	0.4 U/ $\mu$ L
ADN templado (110 ng/ $\mu$ L)	9 $\mu$ L	0.2 $\mu$ g/ $\mu$ L

### 6.8. Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa [0.8 % (p/v) de agarosa (*Invitrogen*, EUA) disueltos en tampón TBE 1x (89.2 mM de Tris, 89 mM de ácido bórico, 2.57 mM de EDTA)] con los productos del ensayo de restricción con las enzimas *HindIII* y *BamHI* (ver epígrafe 6.7). Previo a la polimerización del gel, se adicionó el colorante *Midori Green Advance* a 0.004 % (v/v). Las muestras se mezclaron directamente con tampón de carga 10x (*Invitrogen*) y se cargaron en el gel. La electroforesis se desarrolló a 80 V durante 1 h en tampón TBE 1x. El gel se observó en un transiluminador UV *Accuris* con una longitud de onda de 302 nm y un filtro de 535 nm, y el ADN se visualizó como bandas de color verde. Se usó el *OneMarck® B plus* como patrón de peso molecular, que incluye fragmentos de ADN que van desde 100 a 10 000 pares de bases (las bandas de 1 kpb y 3 kpb tienen una mayor intensidad para servir como puntos de referencia).

### 6.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se utilizó para detectar la presencia de la proteína de interés en las fracciones obtenidas a partir de las diferentes técnicas cromatográficas que se emplearon para su purificación (ver epígrafe 6.10), y para verificar su pureza e identidad. Se utilizaron geles de Bis-acrilamida al 8 % y al 10 % (**Tabla 6**). Las muestras de cada experimento se mezclaron con 2  $\mu$ L de tampón de carga (NüPAGE, *Invitrogen*) con DTT y se cargaron en los geles. La electroforesis se realizó con un voltaje constante de 140 V durante 1 h, con el uso de un tampón de ánodo (200 mM de Tris pH 8.4) y un tampón de cátodo (100 mM de Tris pH 8.25, 0.1 % de SDS, 100 mM de Tricina) (**Schägger y Von Jagow, 1987**). Al finalizar la corrida electroforética, los geles se tiñeron con azul de Coomassie (3 mM de azul brillante de Coomassie, 45 % de metanol, 1.74 M de ácido acético glacial), y se incubaron durante 10 min con agitación constante a 37 °C. Se retiró la solución de tinción y se incubaron en

una solución desteñidora (20 % de metanol, 15 % de ácido acético) durante 30 min con agitación constante hasta la decoloración del gel. También se usó la tinción con  $\text{AgNO}_3$  para evaluar la pureza de la proteína purificada (ver epígrafe 6.11.1) (Merril y Goldman, 1984).

**Tabla 6. Composición de las mezclas para preparar los geles de poli(acrilamida).**

Componente	Gel separador (8 % de Bis-acrilamida)	Gel separador (10 % de Bis-acrilamida)	Gel concentrador (4 % de Bis-acrilamida)
Bis-acrilamida	1.6 mL	2 mL	0.533 mL
Tampón de gel	2 mL	2 mL	1 mL
Glicerol (80%)	0.8 mL	0.8 mL	---
Agua	1.6 mL	1.2 mL	2.466 mL
Persulfato de amonio (10%)	30 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$
TEMED	3 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$

### 6.10. Sobreexpresión de la HsODC recombinante en células SoluBL21

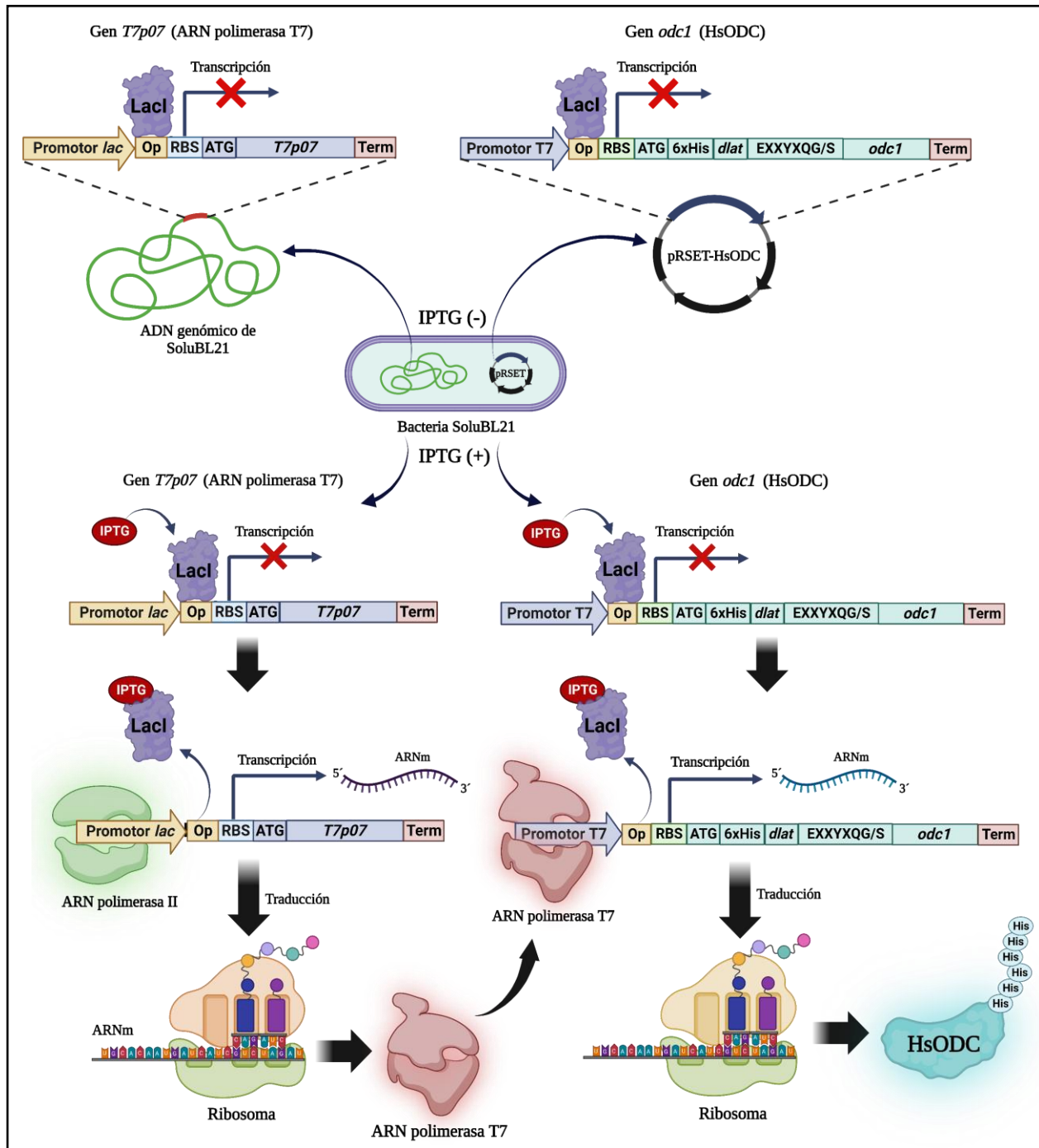
Para sobreexpresar la HsODC recombinante, se tomaron 8 colonias de células SoluBL21 previamente transformadas con el vector de expresión pRSET-HsODC (ver epígrafe 6.5), y se inocularon en 20 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se incubó a 37 °C y 180 rpm durante 18 h. Se adicionaron los 20 mL de preinóculo en 500 mL de medio 2xYT suplementado con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El cultivo de células se incubó a 37 °C y 180 rpm hasta alcanzar una  $\text{Abs}_{600}$  comprendida entre 0.6 y 0.8 unidades. Después se agregaron 500 mL de medio 2xYT suplementado con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 1 mM de  $\text{MgSO}_4$  y 1 mM de IPTG (Figura 13). Se incubó a 37 °C y 180 rpm durante 18 h. Se centrifugó el cultivo de células a 4,500 rpm por 30 min a 4 °C en un rotor JLA 8-1000. Se desechó el sobrenadante y el sedimento bacteriano se almacenó a -80 °C para su uso posterior.

### 6.11. Purificación y cuantificación de la HsODC

La estrategia de purificación de la HsODC recombinante consistió en tres etapas consecutivas de cromatografía. Inicialmente, el sedimento celular de SoluBL21 que se encontraba conservado a -80 °C se resuspendió en 12.5 mL de tampón A [10 % (v/v) de tampón de lisis 10x (300 mM de Tris pH 7.5, 2 M de NaCl y 20 mM de  $\text{MgCl}_2$ ), 10 mM de imidazol pH 7.0, 2 mM de benzamidina, 800  $\mu\text{M}$  de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 3.46 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol], por cada litro de cultivo. Se procedió a la ruptura mecánica de las células por sonicación con el empleo del equipo *Ultrasonic Processor* (Cole Parmer), que consistió en 4 min de sonicación, dividido en ciclos de



5 seg de sonicación por 30 min de reposo (las células se mantuvieron en hielo). Se centrifugó el lisado celular en un rotor 70 Ti a 40,000 rpm y 4 °C por 30 min.



**Figura 13. Inducción de la expresión de la HsODC por IPTG en *E. coli* SoluBL21.** Cuando está ausente el IPTG, se encuentra reprimida la transcripción de los genes *T7p07* y *odc1* por la proteína represora *LacI*, la cual se une al operador *lac* presente en ambos genes [región superior de la figura: IPTG(-)]. El gen *T7p07*

codifica para la ARN polimerasa T7 y se localiza en el ADN genómico de la bacteria, mientras que el gen *odc1* codifica para la HsODC recombinante y está ubicado en el *casette* de expresión del vector pRSET-HsODC. Cuando se adiciona IPTG al cultivo bacteriano [región inferior de la figura: IPTG(+)], este se une a LacI, y provoca su separación del operador, permitiendo la transcripción y posterior traducción del gen *T7p07*. Para que el gen *odc1* se transcriba, requiere tanto de la separación de LacI del operador como de la síntesis de la ARN polimerasa T7. La figura se confeccionó en BioRender.

El sobrenadante (clarificado celular), que contiene a la proteína de interés, se filtró con una membrana de PVDF con un poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (*Millex-GV*). La muestra filtrada se hizo pasar por una columna de cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC del inglés *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) de 5 mL de resina HisTrap<sup>TM</sup>-Ni<sup>2+</sup> (*GE Healthcare*) en un sistema ÄKTA Pure (*Cytiva*) de FPLC. La columna se equilibró previamente con Tampón A con un flujo de 3 mL/min. Después de la aplicación de la muestra, la columna se lavó con Tampón A hasta que se estabilizó la absorbancia a 280 nm. La elución de la proteína de interés se realizó mediante un gradiente lineal de imidazol, aplicando 12 volúmenes de columna (de 0 a 100 %) de tampón B (10 % de tampón de lisis 10x, 500 mM de imidazol pH 7.0, 2 mM de benzamidina, 800  $\mu\text{M}$  de PMSF y 3.46 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol). Se colectaron fracciones de 5 mL cada una desde el inicio del gradiente. Las fracciones obtenidas se corrieron en una SDS-PAGE (ver epígrafe 6.9) y se seleccionaron aquéllas en las que eluyó la proteína HsODC-6His. Éstas se concentraron mediante una filtración por centrifugación a 4500 rpm y 4 °C con el empleo de un Filtro Amicon Ultra-15 (con un corte de 30 kDa), hasta que se obtuvo un volumen entre 500-1000  $\mu\text{L}$ . A la muestra de proteínas concentradas se le adicionaron 25 mL de tampón TEV [20 % de tampón TEV 5x (50 % (v/v) de glicerol, 750 mM de KCl y 100 mM de Tris pH 7.5) y 1 mM de DTT] y 100  $\mu\text{L}$  de enzima TEV (4 mg/mL) y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se llevó a cabo una SDS-PAGE para verificar que toda la proteína HsODC sufrió el corte deseado por la proteasa TEV. Después de escindir la etiqueta de 6-His de la proteína de interés, la muestra se volvió a inyectar en una columna de IMAC (HisTrap<sup>TM</sup>) como se describió anteriormente, y se colectaron fracciones de 5 mL. Se desarrolló un ensayo de Bradford (*Biorad*) cualitativo con las fracciones obtenidas y se identificaron aquéllas que contenían la proteína de interés. Se concentraron las fracciones seleccionadas mediante filtración por centrifugación a 4500 rpm y 4 °C con el empleo de un Filtro Amicon Ultra-15 (con un corte de 30 kDa), hasta que se obtuvo un volumen entre 500-1000  $\mu\text{L}$ . La última etapa de purificación consistió en una cromatografía de exclusión molecular, donde la

proteína concentrada se inyectó en una columna Superdex200 Increase (10/300 mm; *GE Healthcare*) previamente equilibrada con tampón TEV, a un flujo de 0.75 mL/min y se colectaron fracciones de 0.5 mL. Se realizó una SDS-PAGE con las fracciones obtenidas y se seleccionaron las que tenían presente a la proteína HsODC. Se concentraron a través de una filtración por centrifugación como se describió anteriormente y, finalmente, se cuantificó la proteína purificada por el método del ácido bicinonínico (BCA), para lo cual se diseñó una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA). Se prepararon alícuotas de la proteína purificada (220  $\mu$ L) a una concentración de 10 mg/mL y se almacenaron a -80 °C.

### **6.12. Análisis de la HsODC purificada por SDS-PAGE y Western blot**

La proteína purificada se sometió a una SDS-PAGE al 10 % (ver epígrafe 6.9) y se utilizó una tinción con  $\text{AgNO}_3$  (**Merril y Goldman, 1984**) (ver epígrafe 6.12.1) para visualizar las bandas proteicas. La imagen del gel se digitalizó y se determinó el porcentaje de pureza de la proteína con el empleo del software de procesamiento de imágenes ImageJ. La identidad de las bandas observadas se corroboró mediante un ensayo de Western blot (ver epígrafe 6.12.2).

#### **6.12.1. Tinción con $\text{AgNO}_3$**

Se empleó un método rápido de tinción con  $\text{AgNO}_3$  para el análisis de pureza de la HsODC. Después de realizar la corrida electroforética de la proteína (ver epígrafe 6.9), el gel se lavó con 50 mL de agua desionizada durante 10 min con agitación constante. Posteriormente, se sumergió en 50 mL de solución fijadora [40 % (v/v) de metanol y 0.0185 % (v/v) de formaldehído] por 10 min con agitación constante. Se lavó dos veces con agua desionizada durante 5 min cada una. Se colocó el gel en 50 mL de una solución de tiosulfato de sodio al 0.02 % (p/v) y se mantuvo en agitación durante 1 min. Se lavó dos veces con agua desionizada durante 20 seg cada una. Se retiró el agua y se añadieron 50 mL de una solución de  $\text{AgNO}_3$  al 0.1 % (p/v) y se dejó en agitación durante 10 min. Se cambió el gel a 50 mL de solución reveladora [3 % (p/v) de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.0004 % (p/v) de tiosulfato de sodio y 0.0185 % (v/v) de formaldehído (este último se adicionó 5 min antes de utilizar la solución)] y se dejó en agitación hasta la aparición de las bandas de proteínas. Se adicionaron 50 mL de una solución de ácido cítrico al 5 % (p/v) para detener la reacción y se dejó en agitación durante 10 min. Finalmente, se colocó el gel en solución secadora [10 % (v/v) de etanol y 4 % (v/v) de glicerol] por 10 min.

### 6.12.2. Detección de la HsODC mediante Western blot

Se llevó a cabo una SDS-PAGE de la proteína purificada (ver epígrafe 6.9) y se realizó una transferencia semiseca a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PDVF del inglés *Polyvinylidene difluoride*) (*Poly Screen, Perkin Elmer<sup>TM</sup>*), con un voltaje de 25 V durante 40 min en una cámara Trans-blot SD (*Biorad*). Lo anterior requirió del uso de un tampón de transferencia semiseca [25 mM de Tris-base pH 7.4, 192 mM de glicina y 20 % (v/v) de metanol]. Se incubó la membrana en solución de bloqueo [4 % (p/v) de leche descremada disuelta en tampón TBST (10 mM de Tris-base pH 7.4, 100 mM de NaCl y 0.2 % (v/v) de Tween 20)] durante 1 h a TA y agitación constante. Se retiró la solución de bloqueo y se añadió el anticuerpo primario (anticuerpos policlonales anti-HsODC obtenidos a partir de conejo en nuestro laboratorio) (**Filisola-Villaseñor *et al.*, en preparación**), disuelto en solución de bloqueo a una dilución 1: 10,000. La membrana se incubó a 4 °C durante toda la noche en agitación constante. Se retiró el anticuerpo primario y se hicieron 3 lavados de 10 min cada uno con tampón TBST. Se adicionó el anticuerpo secundario (anticuerpo monoclonal anti-Fc de conejo) disuelto en solución de bloqueo a una dilución 1: 10,000 y se incubó por 1 h a TA y agitación constante. Se retiró el anticuerpo secundario y la membrana se lavó 3 veces durante 10 min con tampón TBST. Se realizaron dos lavados de 5 min con tampón TBS (10 mM de Tris-base pH 7.4 y 100 mM de NaCl), la membrana se reveló con el reactivo quimioluminiscente *Western Lightning<sup>TM</sup> Plus*. Finalmente, los fotones desprendidos de la reacción en la membrana se digitalizaron mediante el equipo Amersham Imager 600 (*Cytiva*).

### 6.13. Cristalización de la HsODC

La cristalización de la HsODC en presencia de los ligandos propuestos (Sulf o ACA) se realizó mediante la técnica de difusión de vapor en gota sentada (ver epígrafe 6.13.2). Las concentraciones de los componentes del licor madre (LM) utilizadas para la generación de los cristales de proteína se optimizaron hasta obtener cristales aislados y de mayor tamaño en casi toda la placa.

#### 6.13.1. Preparación del licor madre

Se partió de una composición de licor madre con la que se obtuvieron previamente cristales de la HsODC en nuestro laboratorio (**Filisola-Villaseñor *et al.*, en preparación**), que se basó a su vez en las condiciones en las que se obtuvo la estructura con el código PDB: 2O00 (**Dufe *et al.*, 2007**). El gradiente consistió en 100 mM de tampón Bis-Tris pH 6.5, 10 – 300 mM de acetato de amonio y 12 – 25 % (v/v) de polietilenglicol (PEG 3.35K) (**Figura 14**).

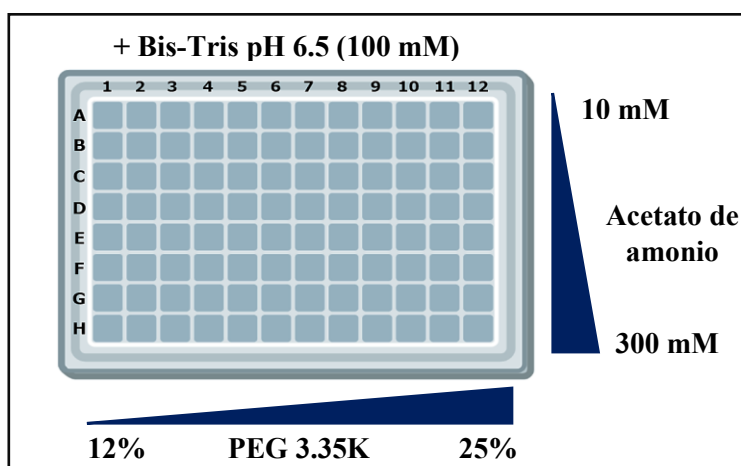


Figura 14. Representación esquemática de la composición inicial de la caja de licor madre utilizada para la cristalización de la HsODC (Filisola-Villaseñor *et al.*, en preparación).

Las diferentes condiciones de LM se diseñaron en la página web de *Hampton Research*: (<https://hamptonresearch.com/maketray.aspx>). Las cajas de licor madre se cubrieron con cinta autoadherible y se almacenaron a 4 °C.

### 6.13.2. Técnica de difusión de vapor en gota sentada

Se utilizaron placas MRC de 96 pocillos para la generación de los cristales de HsODC por difusión de vapor en gota sentada (Figura 15).

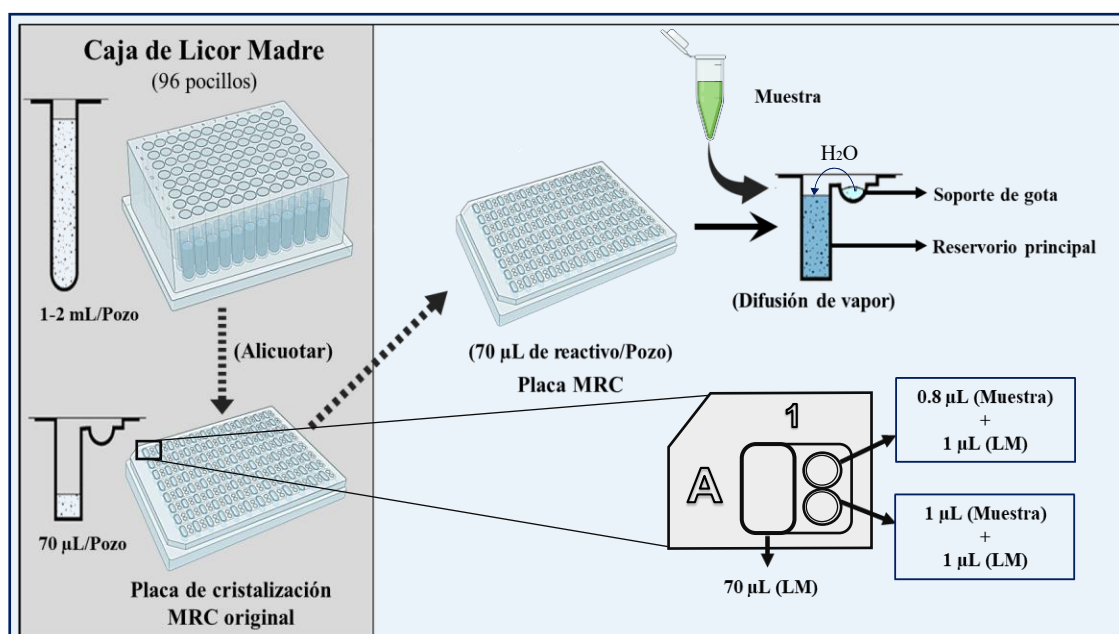


Figura 15. Preparación de las placas MRC para la cristalización de la HsODC por la técnica de difusión de vapor en gota sentada. Se muestran los volúmenes de muestra y LM que se aplicaron por pocillo. La figura se confeccionó en BioRender.

Se adicionaron 70  $\mu\text{L}$  de licor madre en los reservorios principales de la placa. Se depositaron gotas de 0.8 y 1  $\mu\text{L}$  de muestra [HsODC (10 mg/mL), PLP (0.2 mM), Cad (25 mM) y Sulf/ACA (1 mM)] en los pocillos adyacentes a cada reservorio principal. Cabe destacar que la proteína se incubó con el PLP, la Cad y los ligandos seleccionados (Sulf/ACA) durante 10 min a TA, antes del montaje de las placas. A continuación, cada gota de muestra se mezcló con 1  $\mu\text{L}$  de licor madre de su reservorio principal correspondiente. Las placas se cubrieron con una cinta adhesiva y se incubaron a 18 °C.

Se prepararon diferentes placas controles para garantizar que los cristales generados fueran de naturaleza proteica. Con este fin, se emplearon las condiciones iniciales de licor madre, pero se modificó la composición de la muestra a cristalizar (**Tabla 7**).

Una vez que se determinaron las concentraciones idóneas de los componentes de la muestra, que permitieron la formación de cristales de proteínas, se realizó un ensayo suplementario mediante la adición de 0.2  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford en los pocillos donde se generaron cristales para corroborar su identidad química.

**Tabla 7. Composición de la muestra utilizada en las diferentes placas controles.**

Placa control	Composición de la muestra			
	HsODC (10 mg/mL)	PLP (0.2 mM)	Cad (25 mM)	Sulf
<b>1</b>	+	+	+	-
<b>2</b>	-	+	+	-
<b>3</b>	-	+	+	+ (10 mM)
<b>4</b>	+	+	+	+ (10 mM)
<b>5</b>	-	-	-	+ (10 mM)
<b>6</b>	+	+	+	+ (1 mM)
<b>7</b>	-	+	+	+ (1 mM)
<b>8</b>	-	-	-	+ (1 mM)

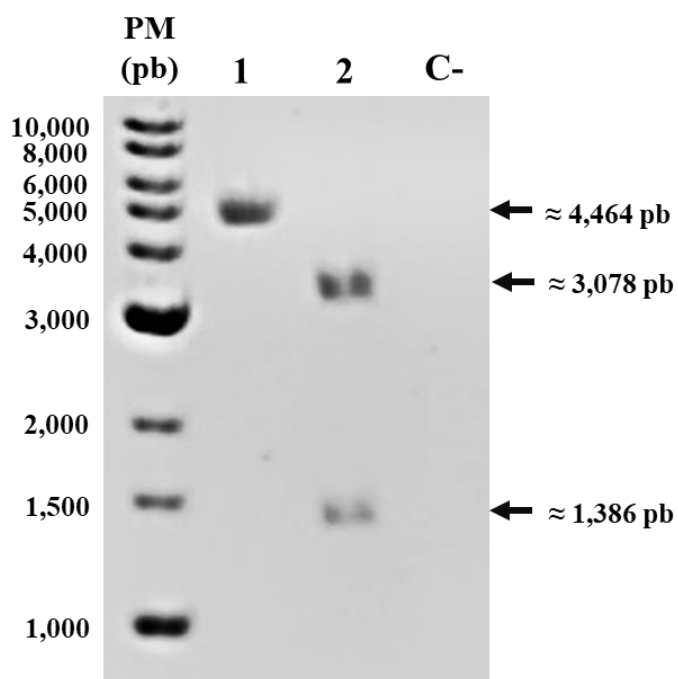
### 6.13.3. Optimización de las condiciones de cristalización

El diseño de la caja de licor madre se optimizó mediante la selección de las condiciones donde se favorecía la formación de cristales de proteína aislados y de mayor tamaño, hasta obtener cristales en la mayoría de los pocillos de la placa. Los cristales formados se visualizaron en un estereoscopio *Olympus sz51* cada 24 h desde el montaje de las placas para determinar el tiempo donde alcanzaron su mayor tamaño.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Purificación de ADN plasmídico y digestión con enzimas de restricción

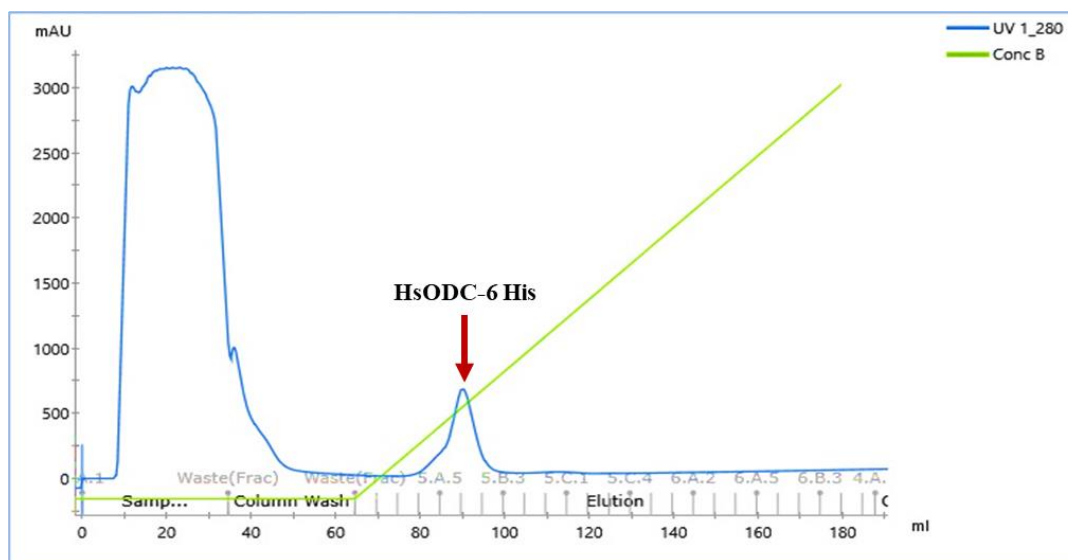
El procedimiento utilizado para la extracción y purificación a pequeña escala del ADN plasmídico permitió obtener una concentración de  $110.86 \pm 8.89$  ng/ $\mu$ L del material purificado y un rendimiento de  $5.54 \pm 0.44$   $\mu$ g de ADN por 5 mL de cultivo. Aunque la identidad del plásmido utilizado se corroboró previamente por secuenciación (Filisola-Villaseñor *et al.*, en preparación), se realizó un ensayo con enzimas de restricción para ratificar que dicho ADN plasmídico correspondía con el vector de expresión pRSET-HsODC. La digestión con una de las enzimas (*Hind*III) produjo una única banda ( $\sim 4,464$  pb) correspondiente al vector linealizado, mientras que la digestión con ambas enzimas (*Hind*III y *Bam*HI) dio lugar a dos bandas con el peso molecular esperado: un fragmento de  $\sim 3,078$  pb (pRSET linealizado sin el gen *odc1*) y otro de  $\sim 1,386$  pb (gen *odc1*) (Figura 16).



**Figura 16. Digestión enzimática del pRSET-HsODC purificado.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (p/V) de los productos digeridos con la enzima *Hind*III (1); o con las enzimas *Hind*III y *Bam*HI (2). También se incluyó un control negativo que contenía la mezcla de reacción sin ADN (C-).

## 7.2. Purificación y cuantificación de la HsODC recombinante

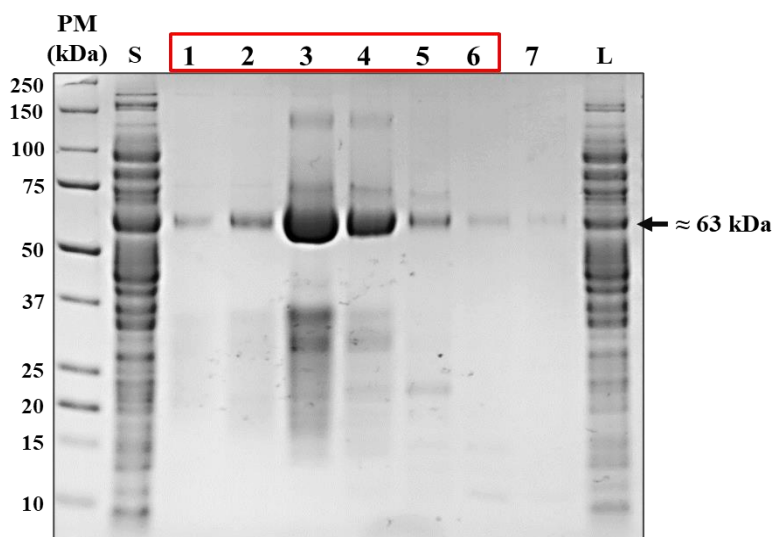
La enzima HsODC recombinante se sobreexpresó en la cepa SoluBL21 de *E. coli*, y se purificó mediante tres etapas consecutivas de cromatografía a partir de 2 L de cultivo. La presencia de una etiqueta de 6 histidinas (6 His) en su extremo N-terminal permitió su purificación inicial por IMAC. En la **Figura 17** se aprecia el cromatograma obtenido por dicha cromatografía. Durante la aplicación de la muestra y al inicio del lavado de la columna con tampón A, eluyeron todas las proteínas que no se unieron a la columna (pico de Abs<sub>280</sub> de 8-50 mL). En la medida que se incrementó el porcentaje de tampón B, tanto la proteína de interés, así como otras que también se encontraban retenidas en la columna comenzaron a eluir (pico de Abs<sub>280</sub> de 80-100 mL), lo cual tuvo lugar entre 82 – 158 mM de imidazol, con el máximo de absorbancia en un 20 % (~ 95 mM de imidazol).



**Figura 17. Purificación de la HsODC-6His por IMAC (primera etapa) (Imagen representativa).** La línea azul del cromatograma corresponde a las unidades de absorbancia medidas a 280 nm (Abs<sub>280</sub>), mientras que la línea verde se refiere al porcentaje de tampón B que se hizo pasar por la columna. Se usó un gradiente continuo de imidazol (25 – 500 mM) para la elución de la proteína de interés. El pico de Abs<sub>280</sub> (80 – 100 mL) correspondió a la enzima HsODC con la etiqueta de 6 His y a otras proteínas que se unieron a la columna de manera inespecífica.

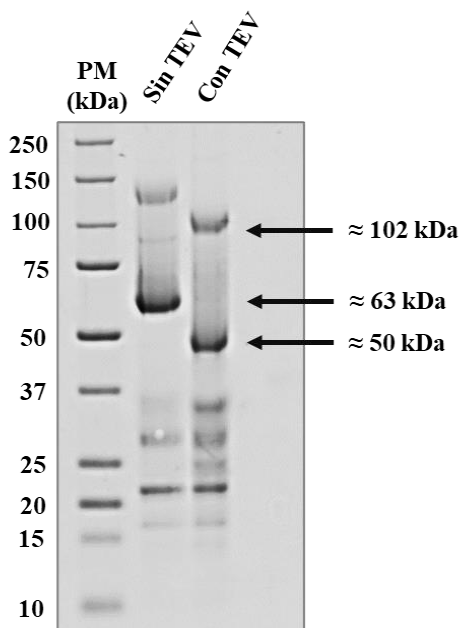
Las fracciones obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE al 8 % para identificar aquellas que contenían a la enzima HsODC-6His (**Figura 18**). Se observó la presencia de una banda (~ 63 kDa) que se ajusta al peso molecular de la proteína en cuestión con la etiqueta de 6 His.





**Figura 18. Primer paso de purificación de la HsODC-6His por IMAC (Imagen representativa).** SDS-PAGE al 8 % (p/v) de las fracciones obtenidas tras la purificación de HsODC-6His con un peso de ~ 63 kDa (S: sobrenadante o clarificado celular; 1 - 7: primeras 7 fracciones obtenidas durante la elución; y L: lavado de la columna con tampón A antes del paso de elución).

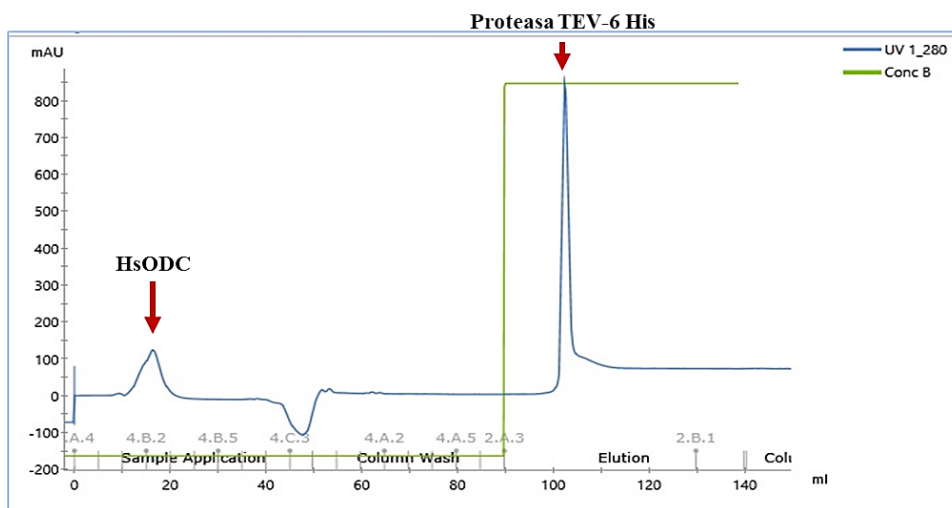
Las fracciones 1 - 6 se concentraron mediante filtración por centrifugación y se cambió a tampón TEV + DTT. Se le adicionó a la muestra la proteasa TEV con la finalidad de escindir la etiqueta de 6 His que presentaba HsODC, y se incubó durante toda la noche a 4 °C. Se llevó a cabo una SDS-PAGE al 8 % para constatar que tuvo lugar el corte deseado en casi toda la proteína presente en la muestra (Figura 19).



**Figura 19. Digestión de la HsODC-6His con la proteasa TEV (Imagen representativa).** SDS-PAGE al 8 % (p/v) del producto de la digestión de la HsODC-6His con la proteasa TEV. El monómero de HsODC presenta un peso molecular de ~ 50 kDa después de retirarle la etiqueta de 6 His, mientras que el posible dímero corre a ~ 102 kDa (Carril 2: HsODC-6His en ausencia de la proteasa TEV; y Carril 3: digestión enzimática de la HsODC-6His por la proteasa TEV).

El carril 3, correspondiente a la digestión de la HsODC-6His con la proteasa TEV, mostró una banda de ~ 50 kDa, que coincide con el peso molecular esperado del monómero de HsODC sin la etiqueta de 6 His. La ausencia de la banda de ~ 63 kDa en este carril indicó que toda la HsODC-6His presente en la muestra sufrió el corte proteolítico deseado. También se observó una banda de ~102 kDa que es consistente con el peso molecular teórico del dímero de HsODC, el cual se pudo distinguir en todos los análisis electroforéticos realizadas debido a su resistencia a la desnaturalización.

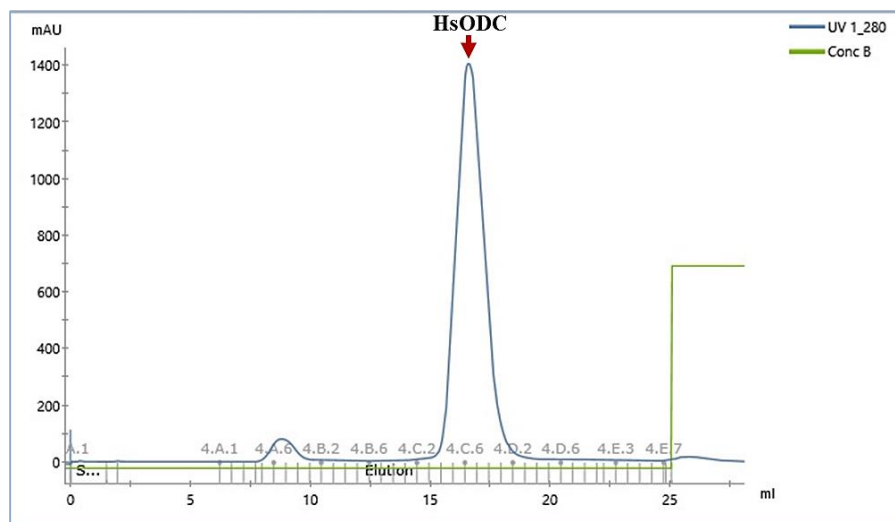
Posteriormente, se realizó la segunda etapa de purificación por IMAC para separar a la HsODC de la proteasa TEV, de su etiqueta de 6 His recién removida y de las otras proteínas que se unieron de manera inespecífica a la columna durante la primera purificación por IMAC (**Figura 20**).



**Figura 20. Purificación de la HsODC sin etiqueta de His (segunda etapa) por IMAC (Imagen representativa).** La línea azul del cromatograma se refiere a las unidades de Abs<sub>280</sub> y la línea verde al porcentaje de tampón B que se aplicó a la columna. El pico de Abs<sub>280</sub> (10 – 20 mL) correspondió a la enzima HsODC.

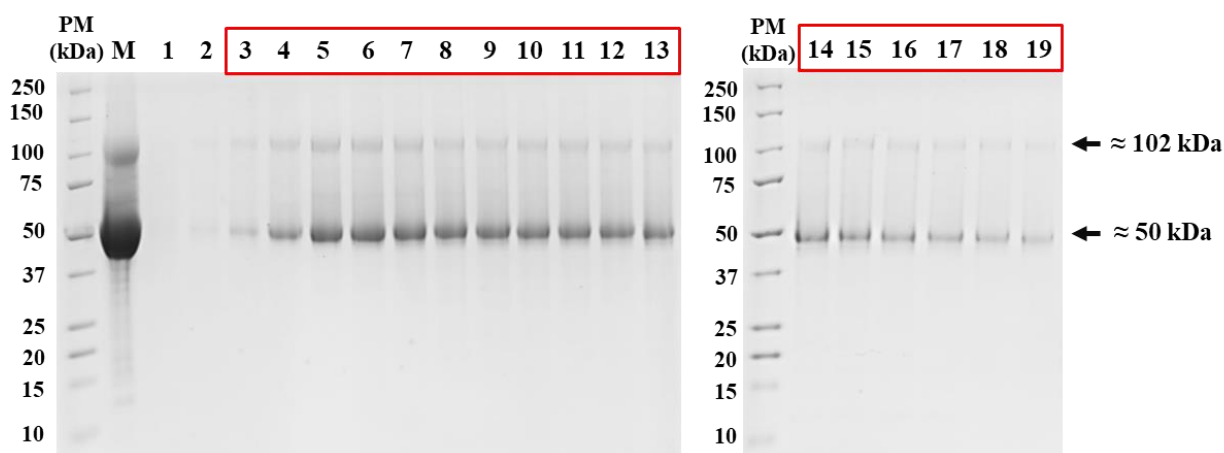
La HsODC eluyó después de la inyección de la muestra (pico de Abs<sub>280</sub> de 10 – 20 mL) ya que, al no presentar la etiqueta de 6 His, la proteína no se une a la columna de IMAC. Cuando se aplicó el gradiente con el tampón B por la columna, eluyeron tanto la proteasa TEV (que también cuenta con una etiqueta de 6 His en su extremo N-terminal), la etiqueta de histidinas de la HsODC, así como otras proteínas (pico de Abs<sub>280</sub> de 100 - 105 mL). Las fracciones con la HsODC se identificaron cualitativamente con el reactivo de Bradford. Éstas se combinaron y se concentraron mediante filtración por centrifugación hasta obtener un volumen de muestra de 500-1000 µL.

Finalmente, la tercera etapa de purificación se basó en una cromatografía de exclusión molecular (SEC del inglés *Size Exclusion Chromatography*) (**Figura 21**), en donde eluyeron primero agregados de la HsODC (pico de  $Ab_{S280}$  (8 – 10 mL) que se debió a agregados de la proteína de interés y un pico mayor (15 - 19 mL) correspondiente a la enzima HsODC.



**Figura 21. Purificación de la HsODC sin etiqueta de His por SEC (tercera etapa) (Imagen representativa).** La línea azul del cromatograma se relaciona con las unidades de  $Ab_{S280}$  y la línea verde con el porcentaje de tampón TEV + DTT que se hizo pasar por la columna. El pico de  $Ab_{S280}$  (15 – 19 mL) se correspondió con la enzima HsODC.

Posteriormente, las fracciones obtenidas en la purificación por exclusión molecular se analizaron por SDS-PAGE al 8 % para identificar cuáles contenían a la HsODC (**Figura 22**).



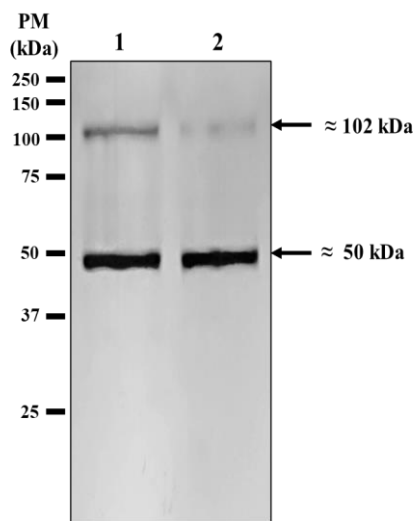
**Figura 22. Tercer paso de purificación de la HsODC por SEC (Imagen representativa).** SDS-PAGE al 8 % (p/v) de 19 fracciones obtenidas tras la tercera purificación de la HsODC por SEC. La banda de ~ 50

kDa se corresponde con el monómero de HsODC y la de ~ 102 kDa con el posible dímero de la enzima (**M**: muestra de proteína concentrada antes de inyectar en la columna de exclusión molecular; **1 - 19**: fracciones obtenidas durante la elución).

Se seleccionaron las fracciones 3 – 19 y se concentraron mediante filtración por centrifugación hasta obtener un volumen de 500 - 1000  $\mu$ L. Finalmente, se cuantificó la proteína purificada por el método del BCA, para lo cual se diseñó una curva patrón de BSA (0, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000  $\mu$ g/mL). La HsODC se llevó a una concentración final de 10 mg/mL para los siguientes experimentos. El rendimiento de la purificación de la HsODC fue de  $3.63 \pm 1.65$  mg a partir de  $190.35 \pm 13.63$  mg de proteínas totales procedentes de 1 L de cultivo.

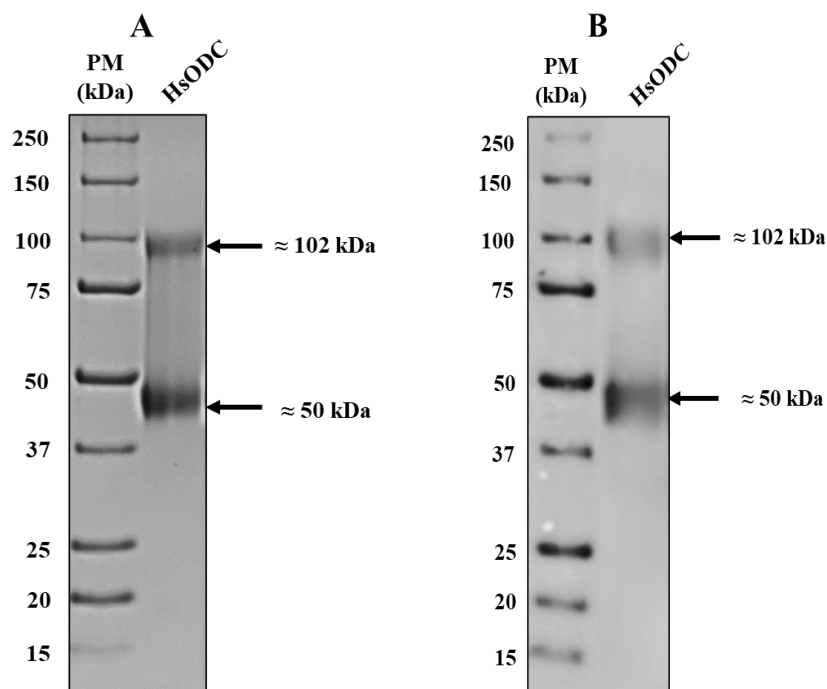
### 7.3. Análisis de la pureza de la HsODC purificada

Para analizar la pureza de la HsODC obtenida, se realizó una SDS-PAGE al 10 % y se realizó una tinción con  $\text{AgNO}_3$ , ya que es un método de detección de proteínas más sensible que el Azul de Coomassie (**Figura 23**). Con esta tinción se pudo observar únicamente la presencia de las dos bandas esperadas: una de ~ 50 kDa (monómero de la HsODC) y otra de ~ 102 kDa (dímero de la HsODC). Posteriormente, la imagen del gel se digitalizó y se determinó en el software ImageJ que la pureza de la proteína era del 93 % (56.1 % de monómero y 36.9 % del posible dímero).



**Figura 23. Verificación de la pureza de la HsODC.** SDS-PAGE al 10 % (p/v) de la HsODC purificada y tinción con  $\text{AgNO}_3$ . El monómero de HsODC presenta un peso molecular de ~ 50 kDa y el posible dímero de ~ 102 kDa (**Carriles 1 y 2**: dos lotes diferentes de HsODC purificada).

Además, se realizó un Western blot utilizando anticuerpos policlonales anti-HsODC (**Figura 24**), que permitió confirmar que las dos bandas observadas con la tinción con Azul de Coomassie correspondían a la HsODC (la banda de ~ 50 kDa referida al monómero de HsODC y la banda de ~ 102 kDa al posible homodímero).

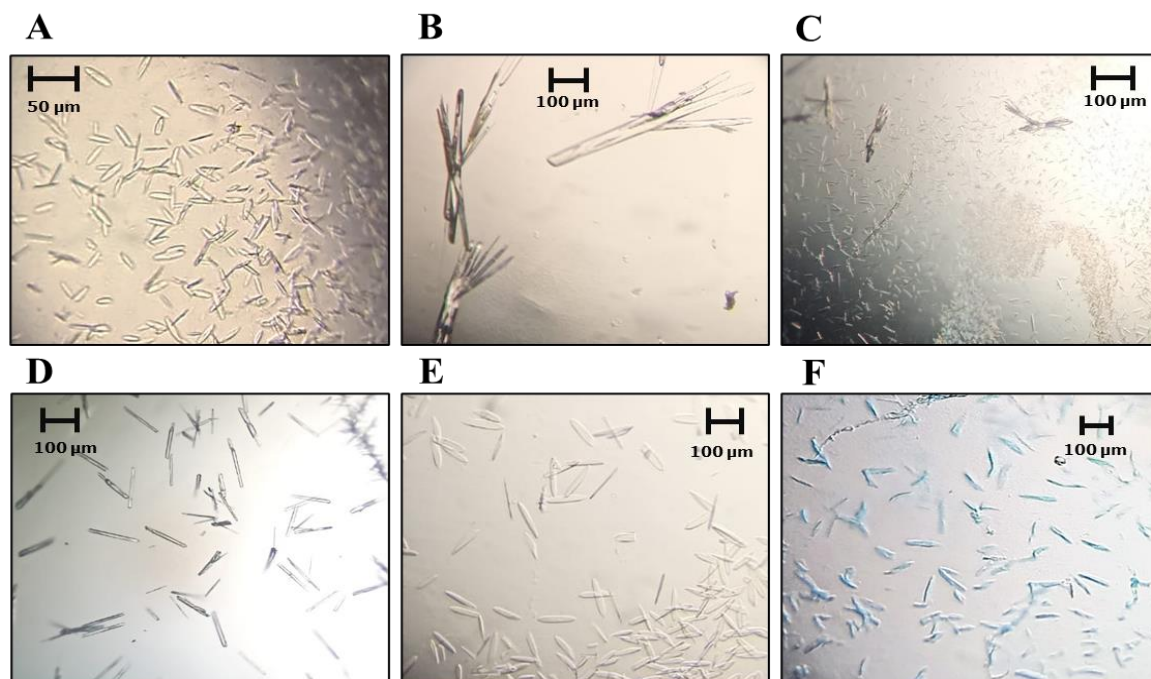


**Figura 24. Identificación de la HsODC purificada por Western blot.** (A) Tinción del gel con azul de Coomassie y (B) Western blot.

#### 7.4. Cristalización de la HsODC

Los cristales de la HsODC en presencia de los ligandos propuestos se generaron por el método de difusión de vapor en gota sentada. Se prepararon placas controles donde solo se variaron los componentes de la muestra a cristalizar y la concentración de ligando, sin modificar las condiciones de licor madre iniciales, para garantizar que los cristales formados eran de naturaleza proteica. Se obtuvieron pequeños cristales en las condiciones donde se encontraban presentes HsODC + PLP + Cad (**Figura 25A**), mientras que al aplicar solo PLP y Cad (en las mismas concentraciones) no se observó la formación de cristales (resultados no mostrados). Lo anterior indicó que los primeros cristales podían ser de proteína. Cuando se incorporó el ligando Sulf (10 mM) junto con PLP y Cad, pero en ausencia de HsODC, se formaron cristales de mayor tamaño y con una morfología diferente en toda la placa (**Figura 25B**). Al combinar la proteína con la muestra anterior, se apreció el crecimiento de ambos tipos de cristales (**Figura 25C**), donde se hizo más evidente su diferencia de tamaño y morfología. Se preparó de manera adicional una placa solo con Sulf (10 mM) (**Figura 25D**) y también crecieron cristales en todos los pocillos con una morfología muy similar a los que crecieron en la **Figura 25B**, lo que permitió concluir que la Sulf a 10 mM era la responsable de la formación de dichos cristales. En función de lo anterior, se decidió reducir la concentración de Sulf a 1 mM. Cuando se mezclaron HsODC + PLP + Cad + Sulf (1 mM) (**Figura 25E**), se generaron

cristales muy semejantes a los de la **Figura 25A** en ciertos pocillos de la placa. Para complementar este resultado, se montaron dos placas: una con PLP + Cad + Sulf (1 mM) y otra sólo con Sulf (1 mM) y no se evidenció la aparición de estructuras cristalinas en ningún pocillo de ambas placas. Con base en esto, se pudo concluir que los últimos cristales obtenidos eran de naturaleza proteica. No obstante, se llevó a cabo otro ensayo suplementario, donde se les adicionó a los cristales 0.2  $\mu$ L de reactivo de Bradford. Los cristales de Sulf (10 mM) no se tiñeron con el reactivo. Sin embargo, los de HsODC + PLP + Cad + Sulf (1 mM) sí se tiñeron de color azul (**Figura 25F**), lo que reafirmó la conclusión establecida anteriormente.

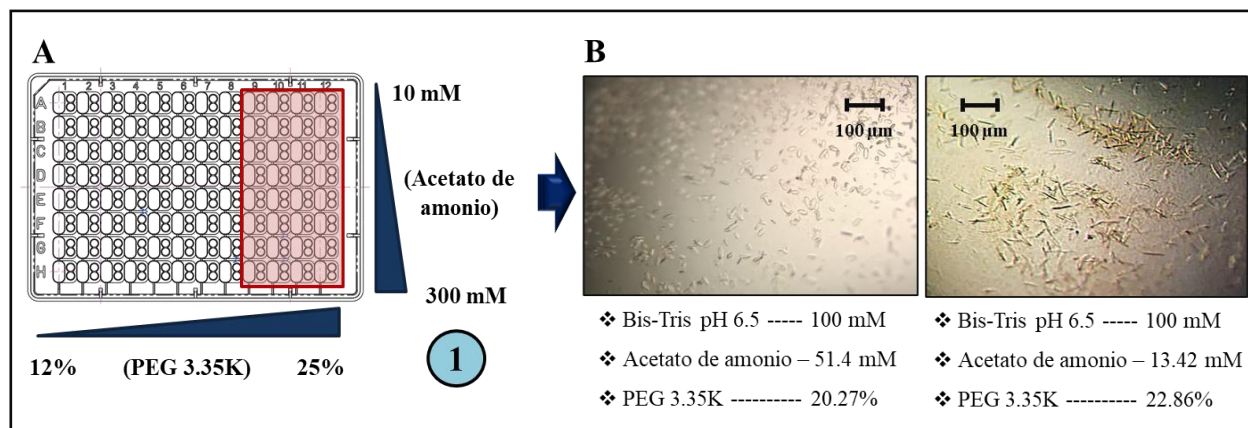


**Figura 25. Efecto de la adición de Sulf (10 mM y 1 mM) en la cristalización de la HsODC.** Se modificó la composición de la muestra a cristalizar sin variar las condiciones del licor madre. (A) **Placa control 1:** HsODC + PLP + Cad; (B) **Placa control 3:** PLP + Cad + Sulf (10 mM); (C) **Placa control 4:** HsODC + PLP + Cad + Sulf (10 mM); (D) **Placa control 5:** Sulf (10 mM); (E) **Placa control 6:** HsODC + PLP + Cad + Sulf (1 mM); y (F) Ensayo de Bradford con los cristales obtenidos en la placa control 6.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, la composición de la muestra que se decidió utilizar para la posterior optimización de las condiciones de cristalización fue la siguiente: HsODC (10 mg/mL), PLP (0.2 mM), Cad (25 mM) y Sulf/ACA (1 mM).

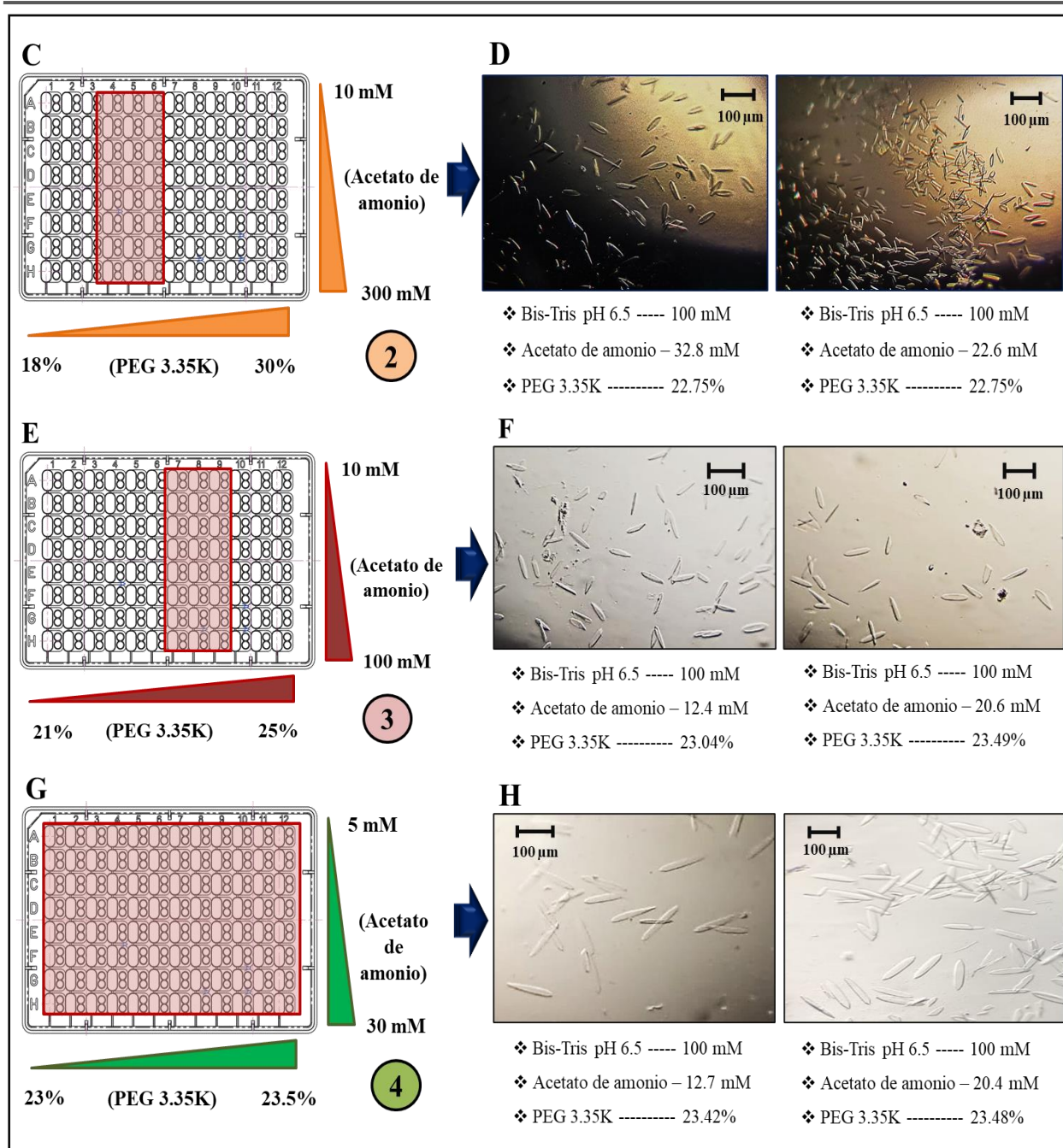
### 7.4.1. Optimización de las condiciones de cristalización

Se obtuvieron cristales de la HsODC en presencia de Sulf (1 mM) con el empleo de las condiciones iniciales de licor madre (**Figura 14**) y la composición de la muestra establecida anteriormente. Se observó el crecimiento de cristales en la zona de mayor concentración de PEG (21 – 25 %), lo cuales presentaron un tamaño muy pequeño ( $< 50 \mu\text{m}$ ) (**Figuras 26-1A, B**). Se incrementó el gradiente de agente precipitante (PEG) a un rango de 18 - 30 %, manteniendo las concentraciones de acetato de amonio (**Figuras 26-2C, D**). En estas condiciones, se formaron cristales en el intervalo de 22 – 25 % de PEG. Concentraciones mayores de PEG provocaron la precipitación de la proteína en agregados amorfos, mientras que concentraciones más bajas generaron cristales pequeños y densos. Se consideró seguir ampliando los gradientes de agente precipitante y de sal (**Figuras 26-2E, F**), hasta llegar a un intervalo específico de PEG (23 – 23.5 %) y de acetato de amonio (10 - 30 mM), que permitió el crecimiento de cristales aislados y de mayor tamaño en casi toda la placa (**Figuras 26-2G, H**). Estos presentaron una longitud que varió entre los 80 y 140  $\mu\text{m}$  y un grosor entre los 30 y 40  $\mu\text{m}$ , y alcanzaron su tamaño máximo a las 48 h. Cabe destacar que este resultado se reprodujo al menos tres veces con el empleo de dichas condiciones de licor madre.



**Figura 26-1. Optimización de las condiciones de cristalización de la HsODC en presencia de Sulf (1 mM).** (A) Composición de la caja de licor madre utilizada para la cristalización, y (B) cristales generados bajo determinadas condiciones de licor madre. El recuadro rojo delimita la región de la placa donde crecieron los mejores cristales.



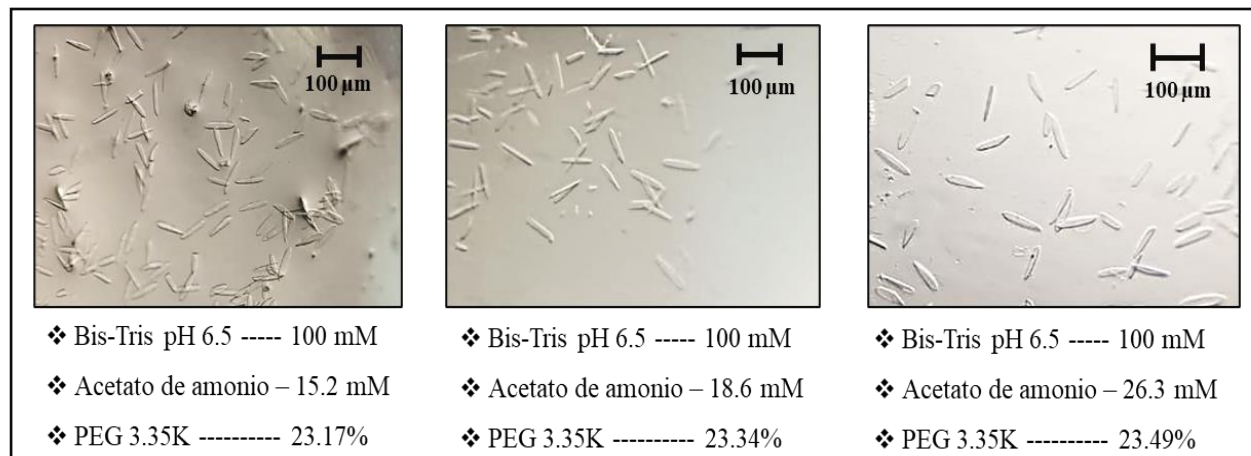


**Figura 26-2. Optimización de las condiciones de cristalización de la HsODC en presencia de Sulf (1 mM).** (C, E y G) Composición de la caja de licor madre utilizada para la cristalización, y (D, F y H) cristales generados bajo determinadas condiciones de licor madre. Se modificó el diseño de la caja de licor madre hasta obtener cristales aislados y de mayor tamaño en casi todos los pocillos de la placa. Los recuadros rojos delimitan la región de la placa donde crecieron los mejores cristales (**Continuación**).

Una vez determinadas las condiciones de muestra y de licor madre óptimas para la cristalización de la HsODC en presencia de Sulf (1 mM), se procedió a cristalizar a la proteína con el segundo



ligando: ACA (1 mM). Como se aprecia en la **Figura 27**, se obtuvieron cristales en la mayoría de los pocillos de la placa con una morfología muy similar a los que se obtuvieron con Sulf (1 mM), aunque un poco más pequeños (80 – 100  $\mu\text{m}$ ).

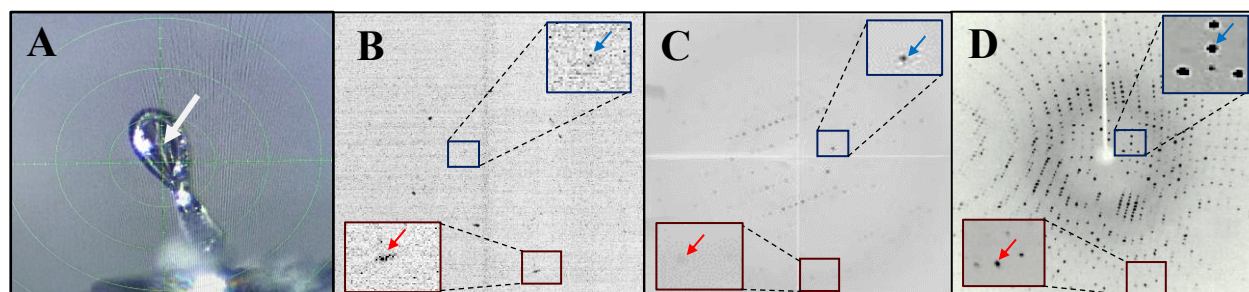


**Figura 27. Cristales de la HsODC en presencia de ACA (1 mM).** Se utilizaron las condiciones de muestra y de licor madre óptimas determinadas previamente con el ligando Sulf.

Teniendo en cuenta lo anterior, se establecieron las siguientes condiciones óptimas de cristalización para la proteína HsODC:

- Composición del licor madre: 100 mM de tampón Bis-Tris pH 6.5, PEG 3.35K (23 – 23.5%) y acetato de amonio (5 – 30 mM).
- Composición de la muestra: HsODC (10 mg/mL), PLP (0.2 mM), Cad (25 mM) y Sulf (1 mM).

Se cosecharon cristales individuales de HsODC en presencia de Sulf/ACA (1 mM) y se realizaron ensayos de difracción de rayos X en el difractómetro D8 VENTURE Bruker del departamento de Química del Cinvestav (**Figura 28**).



**Figura 28. Ensayo de difracción de rayos X de uno de los cristales de la HsODC obtenidos en presencia de Sulf (1 mM).** (A) Imagen de una asa criogénica con un cristal de HsODC (la flecha blanca señala el

crystal cosechado); **(B)** patrón obtenido en el difractómetro D8 VENTURE Bruker por el programa APEX 3 (Bruker) a partir de uno de los cristales de HsODC, y **(C)** patrón obtenido de <https://www.cs.cornell.edu/boom/2004sp/ProjectArch/AppofNeuralNetworkCrystallography/ProteinQuality.htm>. Tanto **B** como **C** muestran patrones de pobre calidad de difracción derivados de cristales de proteínas. **(D)** Patrón de muy buena calidad de difracción obtenido de <https://pccf.usask.ca/xrd.php> (las flechas rojas indican puntos de difracción de alta resolución y las azules de baja resolución).

Se obtuvieron algunas imágenes a partir de la difracción de uno de los cristales obtenidos, pero no proporcionó la cantidad de puntos suficientes para poder determinar los parámetros de celda unitaria debido a la baja resolución del cristal.

## 8. DISCUSIÓN

Las PAs son pequeñas moléculas policatiónicas que están involucradas en una amplia gama de procesos biológicos, entre los que se destacan la organización de la cromatina, la regulación de la expresión génica, la apoptosis, la proliferación y la diferenciación celular. Su importancia radica en la capacidad que tienen para interactuar con macromoléculas cargadas negativamente como las proteínas, los ácidos nucleicos y los fosfolípidos, ya que presentan todos sus grupos amino protonados a pH fisiológico (Miller-Fleming *et al.*, 2015; Pegg, 2016; Mounce *et al.*, 2017). En el contexto del cáncer y otras enfermedades hiperproliferativas, las PAs son especialmente relevantes. Se ha demostrado en numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* que los niveles de estas moléculas se encuentran frecuentemente alterados en diferentes líneas celulares de cáncer, y se ha observado un aumento significativo de su biosíntesis durante las fases G1/S y G2, en comparación con las células normales. Este incremento de las concentraciones intracelulares de las PAs se correlaciona con una mayor capacidad proliferativa y una disminución en la diferenciación celular, lo que contribuye al desarrollo y progresión de los tumores (Soda, 2011; Miller-Fleming *et al.*, 2015; Casero Jr. *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020; Sari *et al.*, 2021).

Teniendo en cuenta lo anterior, la disfunción en el metabolismo de las PAs puede ser explotada como una diana terapéutica potencial para el tratamiento del cáncer. Debido a esto, se han desarrollado diferentes enfoques para modular los niveles de PAs y su función en las células tumorales (Wallace, 1996; Seiler, 2003; Wallace y Fraser, 2004). Uno de los más estudiados es la inhibición de la ODC, ya que es una de las enzimas clave en la síntesis de PAs y está sujeta a una compleja regulación (Persson *et al.*, 1998; Pegg, 2006). Además, la ODC es un objetivo transcripcional directo de c-Myc, el cual se encuentra incrementado en cánceres de casi todos los tipos y se asocia positivamente con una mayor biosíntesis de PAs a través de la ODC (Bello-Fernández *et al.*, 1993; Pena *et al.*, 1993; Bachmann y Geerts, 2018). El uso de inhibidores contra esta enzima, como la DFMO, ha demostrado ser eficaz en la reducción de los niveles de PAs y la inhibición del crecimiento tumoral en modelos preclínicos y clínicos. Sin embargo, este fármaco tiene un efecto limitado debido a su eliminación rápida, transporte celular ineficiente y efectos tóxicos a altas dosis (Wallace y Fraser, 2004; Casero Jr. y Marton, 2007; Alexiou *et al.*, 2017; Casero Jr. *et al.*, 2018; LoGiudice *et al.*, 2018). Es por ello que resulta necesario encontrar nuevos inhibidores que tengan la capacidad potencial de dirigirse a esta enzima. Para ello, es importante conocer la estructura 3D de la proteína diana en asociación con el fármaco propuesto,

ya que proporciona información valiosa sobre cómo interactúan los átomos de estas moléculas, los residuos de la enzima que intervienen en la unión y el mecanismo de inhibición que está involucrado (Grishin *et al.*, 1999; Sivashanmugam *et al.*, 2017).

Para dar cumplimiento a los objetivos propuestos en el presente trabajo, se requirió sobreexpresar a la HsODC recombinante en células SoluBL21 de *E. coli*, con la finalidad de disponer de suficiente cantidad de enzima para llevar a cabo los ensayos de cristalización. Otros autores han sobreexpresado la enzima en las cepas BLR(DE3) (Dufe *et al.*, 2007) y BL21(DE3) (Wu *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2022) de *E. coli* para realizar estudios estructurales. La cepa SoluBL21 es una variante genética mejorada de la cepa BL21(DE3) que se generó mediante un enfoque de evolución dirigida, la cual está optimizada para aumentar la expresión de proteínas en forma soluble y es compatible con todos los vectores de expresión basados en el promotor T7. Además, contiene mutaciones no caracterizadas obtenidas a través de criterios de selección especiales. Estas mutaciones hacen que la cepa pueda expresar proteínas insolubles en forma soluble, total o parcialmente, en la mayoría de los experimentos realizados. Incluso en casos donde se logra una solubilidad parcial, se pueden obtener cantidades suficientes de proteína al aumentar el tamaño del cultivo (Genlantis, 2023).

Las células SoluBL21 se transformaron con el vector de expresión pRSET-HsODC, que contiene el gen de la proteína de interés (*odc1*) y un gen que confiere resistencia a la ampicilina (*bla*) como marcador genético de selección. La sobreexpresión de la HsODC se realizó a partir de condiciones previamente optimizadas por Filisola-Villaseñor y colaboradores (en preparación). La cepa bacteriana que se utilizó tiene integrado en su propio ADN genómico, el gen de la ARN polimerasa T7, que es una enzima procedente del bacteriófago T7, el cual infecta a las células de *E. coli* y puede integrar su genoma en el ADN del hospedero e inhibir su maquinaria celular para producir más copias de sí mismo. La expresión del gen *odc1* en el vector pRSET-HsODC se encuentra regulada por el promotor T7 y la región operadora del operón *lac*. La ARN polimerasa T7 se encarga de iniciar la transcripción en el promotor T7 del vector transformado. El propio gen de la ARN polimerasa T7 está bajo el control de un promotor *lac*. Normalmente, tanto el promotor *lac* como el promotor T7 son reprimidos en la bacteria por la proteína represora LacI. Para comenzar la transcripción del *cassette* de expresión en el vector, se debe unir un inductor al represor LacI, lo que favorece su separación de la región operadora y promueve la expresión génica de la ARN polimerasa T7. Esta enzima, a su vez, puede unirse al promotor T7 en el vector de expresión

y comenzar a transcribir el gen de interés corriente abajo (**Dubendorf y Studier, 1991**). Para estimular este proceso, se agregó al cultivo bacteriano el inductor IPTG, que es un compuesto análogo de la alolactosa y, por lo tanto, puede unirse al represor LacI y evitar que inhiba la transcripción del gen en cuestión (**Figura 13**). La expresión de cualquier proteína recombinante bajo el control del promotor T7 es 8 veces más rápida que la expresión de la proteína bajo el control de la ARN polimerasa de *E. coli* (**New England BioLabs, 2023**).

También, se requirió transformar células TOP10 de *E. coli* con el vector de expresión pRSET-HsODC, con la intención de disponer de una mayor cantidad de plásmido recombinante. Esta cepa permite la replicación estable de plásmidos de alto número de copias (**ThermoFisher, 2023**). El rendimiento de ADN plasmídico que se obtuvo concuerda con lo reportado por la compañía de la que procede el kit de purificación (< 25 µg) (*NIPPON Genetics Co., Ltd.*). Posteriormente, se realizó una digestión enzimática del ADN plasmídico purificado con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*, debido a que el plásmido de interés presenta un sitio de corte para cada una de estas enzimas. Las dos bandas observadas permitieron corroborar que se trataba del vector en cuestión. No obstante, cabe resaltar que este plásmido se secuenció previamente en nuestro laboratorio, lo que asegura la identidad del mismo (**Filisola-Villaseñor et al., en preparación**).

La HsODC recombinante, en este caso, se expresa en el citosol de las bacterias y no es secretada al medio extracelular, por lo que se requirió lisar a las células mediante sonicación. Este es uno de los métodos de ruptura celular mecánica más utilizados para la extracción no-destructiva de productos intracelulares. Se basa en la aplicación de ondas sonoras de alta frecuencia que generan fluctuaciones mecánicas intensas en el medio de muestra, lo que conduce a la ruptura de las membranas celulares y la liberación de los componentes intracelulares (**Brown y Audet, 2008**). Su principal ventaja radica en la capacidad para lograr una ruptura celular eficiente y rápida, lo que permite la obtención de un lisado celular altamente concentrado e intacto en un tiempo relativamente corto. Además, este método no requiere el uso de enzimas o productos químicos fuertes, lo que evita la contaminación y la alteración de las propiedades de las biomoléculas presentes en el lisado celular. También se puede realizar a temperatura ambiente o en condiciones criogénicas, lo que minimiza la desnaturalización de proteínas y la degradación de compuestos sensibles al calor. Es importante destacar que la eficacia de la sonicación depende de varios factores, como la potencia de las sondas ultrasónicas, el tiempo de sonicación y la densidad celular.

Un ajuste adecuado de estos parámetros es esencial para lograr una ruptura celular óptima y evitar daños excesivos en las muestras (**Hielscher Ultrasonics, 2023**).

Después de centrifugar el lisado bacteriano, se colectó y se filtró el sobrenadante donde estaba presente la proteína de interés, y se desechó el sedimento celular formado principalmente por material insoluble, como agregados proteicos, fragmentos de membranas y restos celulares. Se procedió a la purificación de la HsODC recombinante por medio de tres etapas consecutivas de purificación (**Filisola-Villaseñor et al., en preparación**). La primera etapa consistió en una IMAC con el empleo de una columna HisTrap<sup>TM</sup>-Ni<sup>2+</sup>. Las columnas pre-empaquetadas HisTrap brindan un formato rápido, conveniente y reproducible para la purificación preparativa de proteínas recombinantes marcadas con histidina (His-tag). Estas columnas presentan una resina formada por perlas de agarosa altamente reticuladas a las que se ha acoplado un grupo quelante. El grupo quelante está precargado con el ion níquel, el cual se une a la resina por medio de 4 enlaces de coordinación y retiene selectivamente las proteínas con grupos de histidina expuestos. Los anillos de imidazol de las cadenas laterales de las histidinas interactúan con el ion níquel a través de enlaces de coordinación (**Cytiva, 2023**). Cabe resaltar que la enzima de interés presenta una etiqueta de 6 His en su extremo N-terminal que permite su purificación por este tipo de cromatografía, y, a continuación de ésta, un dominio dihidrolipoillisina acetiltransferasa (DLAT) derivado del complejo piruvato deshidrogenasa de *Geobacillus* sp., que favorece el correcto plegamiento de la enzima y contribuye a su solubilidad. Sin embargo, la fracción de sobrenadante puede contener otras proteínas que también se unan de manera inespecífica a la columna (intercambio iónico), y, por lo tanto, afecten la pureza de la proteína en cuestión. La elución de las proteínas adheridas a la columna se realizó mediante la aplicación de un gradiente lineal de imidazol (**Figura 17**). En la medida que se incrementa la concentración de imidazol que pasa a través de la columna, éste compite con los residuos de histidina en la proteína de interés por la unión al níquel, desplazándolos y permitiendo que las proteínas eluyan. Se identificó por SDS-PAGE la banda correspondiente a la proteína de interés con la etiqueta de 6 His (banda de ~ 63 kDa) (**Figura 18**). Este peso molecular concuerda con el obtenido por Filisola-Villaseñor y colaboradores en sus experimentos.

Posteriormente, se retiró la etiqueta de 6 His presente en la HsODC con el empleo de la proteasa TEV, cuya actividad se puede inhibir por imidazol, de ahí la importancia de retirar este compuesto de la muestra. El sitio de corte de la proteasa TEV se localiza justamente entre el dominio DLAT y el extremo N-terminal de la HsODC. Resulta crucial eliminar este fragmento (que comprende la

etiqueta de 6 His y el dominio DLAT) de la proteína expresada, dado que éste no forma parte de su estructura nativa. Su presencia puede obstaculizar la formación de cristales, ya que tiende a conferir una mayor movilidad a la proteína, dificultando su estabilización y, por ende, la obtención de estructuras cristalinas de alta calidad. Después de comprobar que ocurrió el corte proteolítico deseado (**Figura 19**), se llevó a cabo una segunda purificación por IMAC, con la finalidad de separar la HsODC sin etiqueta de 6 His de la proteasa TEV (que también cuenta con una etiqueta de 6 His) y de las otras proteínas que se habían unido inespecíficamente durante la primera purificación (**Figura 20**).

La muestra de proteína obtenida se sometió finalmente a una SEC (**Figura 21**). Esta técnica se basa en el principio de separar a las moléculas según su tamaño y forma, permitiendo la eliminación de contaminantes de menor tamaño y la retención selectiva de la proteína de interés, por lo que desempeña un papel importante en la purificación de proteínas destinadas a ensayos de cristalización. Al analizar la muestra de proteína mediante una columna de gel poroso, se puede observar si existe la presencia de agregados o variantes conformacionales que podrían afectar la calidad de los cristales. Esto permite descartar muestras de baja calidad y seleccionar aquéllas que presenten una distribución de tamaños adecuada y una estructura conformacional uniforme. Otro aspecto relevante es que la SEC es una técnica suave, que se realiza en condiciones fisiológicas y no requiere el uso de detergentes fuertes o agentes desnaturizantes. Esto minimiza el riesgo de alterar la estructura y actividad biológica de la proteína durante el proceso de purificación, lo que es crucial para asegurar que la proteína mantenga su conformación nativa y funcionalidad en los ensayos de cristalización (**Burgess, 2018; Hall, 2018**).

Las fracciones se analizaron mediante una SDS-PAGE y se observó que la HsODC manifiesta un corrimiento anómalo, al presentar un peso molecular aparente de ~ 50 kDa (**Figura 22**), ligeramente inferior a su peso molecular teórico (~ 51 kDa), que coincide con el reportado por Hu y colaboradores en 2003 y por Filisola-Villaseñor y colaboradores (en preparación). Lo anterior puede ser una consecuencia de la forma que adquiere la proteína tras su desnaturalización. Si ésta tiene una forma compacta o una estructura peculiar, puede manifestar un corrimiento anómalo debido a su interacción con la matriz del gel. Otro elemento que también pudo afectar su migración electroforética es la carga neta negativa que adquiere la proteína por la unión del SDS, la cual está determinada por el número y tipo de aminoácidos presentes en la cadena polipeptídica (**Shi et al., 2012**). Varios autores han informado otros pesos moleculares aparentes para el monómero de

HsODC, pero están muy próximos al que se obtuvo en el presente trabajo. Tal es el caso de Mohan y colaboradores en 1999 que reportaron un peso molecular de 53 kDa, y Park y colaboradores en 2023 que informaron un peso de 51 kDa (coincidente con el peso molecular teórico del monómero de la enzima). Se evidenció, además, la presencia de una banda de  $\sim 102$  kDa, que debe corresponder al posible dímero de la HsODC, y que también fue reportada por Park y colaboradores en 2023. El dímero ha mostrado ser resistente a la desnaturalización, lo cual puede estar dado por interacciones no covalentes estables entre los monómeros y también por la estructura compacta del dímero. Esta última proporciona estabilidad a las interacciones entre las subunidades y evita que los agentes desnaturalizantes como el SDS y el  $\beta$ -mercaptoetanol penetren en la estructura del dímero y lo desestabilicen.

Finalmente, la proteína purificada se almacenó a  $-80$  °C para evitar su desnaturalización, degradación o formación de agregados proteicos. Las proteínas son sensibles a las condiciones ambientales, y temperaturas más altas pueden provocar su desnaturalización. Esto implica la pérdida de la estructura tridimensional nativa de la proteína y su función biológica. Además, almacenar la proteína a temperaturas inadecuadas, incrementa el riesgo de agregación. Estos agregados pueden ser insolubles y no funcionales, lo que dificulta el uso de la proteína para estudios de cristalografía. Cabe destacar que Dufe y colaboradores en 2007 y Zhou y colaboradores en 2021 y 2022, utilizaron un protocolo de purificación de la HsODC muy similar al que se empleó en este trabajo. Sin embargo, estos investigadores no retiraron la etiqueta de 6 His presente en la enzima, aunque esto no afectó la cristalización de la misma.

La cristalografía de proteínas es una técnica poderosa y ampliamente utilizada para determinar la estructura tridimensional de las proteínas. Para llevar a cabo esta técnica con éxito, es de vital importancia tener a la proteína lo más pura posible en un periodo de purificación lo más rápido posible. La pureza de la proteína es crucial ya que cualquier contaminante presente en la muestra puede afectar negativamente la formación de cristales de proteínas de alta calidad de difracción y, en última instancia, la resolución y precisión de la estructura determinada. La presencia de impurezas puede generar problemas como la formación de agregados o la aparición de diferentes formas y estados conformacionales de la proteína, lo que puede interferir también en el proceso de cristalización e influir de manera negativa en la reproducibilidad de los experimentos y la interpretación de los resultados. Por lo tanto, la purificación rigurosa de la proteína es esencial para garantizar la fiabilidad y validez de los datos de cristalografía (Lesley, 2001). En función de esto,



se evaluó el grado de pureza de la HsODC mediante una SDS-PAGE, seguido de una tinción con  $\text{AgNO}_3$  (**Figura 23**). Este tipo de tinción es de 50 a 100 veces más sensible que la tinción con Azul de Coomassie, y permite la detección de proteínas a concentraciones nanomolares bajas. También permite una mejor distinción de las bandas proteicas en geles de electroforesis, lo que facilita la identificación de proteínas específicas. El porcentaje de pureza determinado resultó ser idóneo para realizar los ensayos de cristalización, y, adicionalmente, se corroboró la identidad de la enzima mediante un Western blot. En este experimento se observaron las dos bandas con el peso molecular esperado y un barrido comprendido entre estas, que puede deberse a diferentes estados de desnaturalización del dímero (**Figura 24**).

La cristalografía de rayos-X depende completamente de la obtención de cristales de la proteína en cuestión para obtener la amplificación de la señal de los rayos-X. Sin embargo, no basta con tener cristales, sino que estos deben tener un tamaño y calidad adecuados para permitir la recolección precisa de las amplitudes de la difracción. La calidad de la estructura molecular final tiene una relación directa con la calidad de la difracción, la cual está influenciada por el tamaño y las propiedades físicas de la muestra cristalina. Por lo tanto, el cristal se convierte en el factor crucial para el éxito del proceso de difracción (**McPherson, 1989**). Lo anterior implica la búsqueda sistemática de los rangos óptimos de los parámetros individuales que influyen en la formación de los cristales. Esto se logra mediante una serie extensa de ensayos de cristalización, en los que se evalúan los resultados y se optimizan las variables para obtener los mejores cristales posibles. Dado el gran número de variables y los amplios rangos involucrados, la experiencia y el conocimiento en el diseño y evaluación de los ensayos de cristalización son de vital importancia.

Los cristales macromoleculares suelen estar compuestos en promedio por un 50 % de solvente, aunque esta proporción puede variar entre un 25 % y un 90 %, dependiendo de la macromolécula específica. El elevado contenido de solvente en la estructura cristalina resulta en la formación de capas de agua que rodean y preservan la estructura de las moléculas proteicas de manera casi idéntica a la que se observa en la solución original. La proteína, en este caso, ocupa el volumen restante del cristal, lo que da lugar a una estructura cristalina similar a un gel, con espacios intersticiales extensos en los cuales el solvente y otras moléculas pequeñas pueden difundir libremente. Los sistemas biológicos dependen en gran medida de la química acuosa dentro de rangos estrechos de temperatura y pH. Como resultado, las proteínas han desarrollado una compatibilidad adecuada y son intolerantes a desviaciones o perturbaciones significativas. Por lo

tanto, todos los cristales de proteínas deben cultivarse a partir de soluciones acuosas que sean toleradas por estas macromoléculas, y a estas soluciones se les denomina licores madre (LM).

Se han establecido diversos métodos que integran el amplio espectro de factores que influyen y favorecen la cristalización, siendo los más comúnmente empleados la difusión de vapor, la diálisis, la difusión por *batch* y la difusión líquido-líquido. En el presente proyecto, la cristalización de la HsODC en presencia de los ligandos propuestos (Sulf/ACA) se realizó por el método de difusión de vapor en gota sentada, que fue el mismo método utilizado por Dufe y colaboradores en 2007 y Zhou y colaboradores en 2021 y 2022 para la cristalización de la enzima. El principio de esta técnica se basa en la interacción entre una gota, compuesta por una mezcla de muestra y LM, y un reservorio que contiene un volumen considerablemente mayor de licor madre. Por lo general, la concentración de los componentes del LM en la gota es menor que en el reservorio. Durante el proceso de equilibrio, el vapor de agua se desplaza desde la gota hacia el reservorio, generando cambios en la composición de la muestra. A medida que el agua abandona la gota, la muestra experimenta un aumento en la sobresaturación relativa, lo que implica un incremento en la concentración tanto de la muestra como de los componentes del LM. Este intercambio continuo de agua entre la gota y el reservorio finaliza cuando ambas alcanzan una concentración similar. Es en este punto de equilibrio donde se logra la cristalización de manera exitosa.

La composición de LM con la que se iniciaron los ensayos de cristalización se basó en la utilizada por Dufe y colaboradores en 2007 para obtener la estructura de dicha enzima con el código PDB: 2O00. La proteína se usó a una concentración de 10 mg/mL para la inducción de cristales (**Filisola-Villaseñor *et al.*, en preparación**). Esta es una concentración estándar que suele utilizarse cuando se realizan ensayos de cristalización por difusión de vapor (**Chen *et al.*, 2002**). Los primeros cristales que se generaron contenían HsODC, PLP y Cad, aunque presentaron un tamaño muy pequeño (< 40  $\mu\text{m}$  de longitud) (**Figura 25A**). Sin embargo, se corroboró que eran de proteína ya que, al retirar la HsODC de la muestra, no se formó ningún cristal a lo largo de la placa. Cabe resaltar que la Cad se usó como aditivo de cristalización, teniendo en cuenta que la enzima en cuestión presenta un sitio de unión a esta molécula (**Dufe *et al.*, 2007**). Los aditivos pueden influir significativamente en el proceso de cristalización y mejorar la calidad de los cristales obtenidos. Por un lado, ayudan a superar las barreras termodinámicas y cinéticas asociadas con la nucleación, lo que acelera y mejora la formación de los cristales. También pueden interactuar con la proteína y estabilizar su estructura tridimensional, lo que previene su desnaturalización o

agregación durante la cristalización. Además, los aditivos pueden afectar la solubilidad de la proteína y promover su precipitación en forma de cristales. Al modificar las condiciones químicas del entorno, como la fuerza iónica, el pH o la concentración de sales, los aditivos pueden desencadenar la formación de cristales al alcanzar la sobresaturación.

Los controles realizados evidenciaron que la Sulf (10 mM) podía cristalizar por sí misma (**Figuras 25B, C, D**). Sin embargo, al reducir su concentración a 1 mM dejó de cristalizar y se favoreció el crecimiento de cristales de la HsODC (**Figura 25E**). Para reafirmar que estos últimos cristales eran de naturaleza proteica, se mezclaron con reactivo de Bradford, lo que provocó que se tiñeran de color azul (**Figura 25F**) y confirmó la conclusión establecida anteriormente.

A pesar de su similitud morfológica, los cristales de compuestos de moléculas pequeñas y los cristales de proteínas presentan diferencias significativas en términos prácticos. Los cristales de moléculas pequeñas se caracterizan por tener una estructura reticular sólida y ordenada, siendo físicamente robustos y fáciles de manipular. Además, estos cristales pueden exponerse al aire sin sufrir daños, poseen propiedades ópticas fuertes y difractan los rayos X de manera intensa en regiones del detector de alta resolución. En contraste, los cristales de proteínas son generalmente más pequeños y blandos, lo que los hace propensos a desintegrarse fácilmente. Estos cristales son especialmente sensibles a la deshidratación y pueden perder su estructura si se les permite secarse. Además, exhiben propiedades ópticas débiles y presentan una difracción pobre de los rayos X en la región de detector de alta resolución. También son altamente sensibles a cambios de temperatura y pueden sufrir daños extensos después de una exposición prolongada a la radiación.

Se llevó a cabo la optimización de las condiciones de cristalización tomando en cuenta la composición de la muestra establecida anteriormente y modificando el rango de concentraciones de algunos de los componentes del LM. Teniendo en cuenta lo anterior, se redujeron de manera consecutiva los rangos de concentraciones de PEG y de acetato de amonio (**Figuras 26A-F**), hasta obtener cristales aislados y de un tamaño apropiado en casi todos los pocillos de la placa (**Figuras 26G, H**). Los cristales que se formaron en presencia de ACA, con el empleo de las condiciones óptimas determinadas para Sulf, mostraron una morfología muy similar, aunque de un menor tamaño (**Figura 27**). Dufe y colaboradores en 2007 optimizaron la composición de su LM hasta obtener cristales individuales de HsODC con PEG 3.35K al 18 % (p/v), 200 mM de acetato de amonio, 100 mM de tampón Bis-Tris a pH 6.5 y una concentración de proteína de 3 mg/mL. Por su parte, Zhou y colaboradores en 2021 generaron cristales de ApoHsODC a partir de un LM

formado por 100 mM de citrato trisódico a pH 5.0, éter monometílico de PEG al 30 % (PEGmme550) y una concentración de proteína de 16 mg/mL. Estos autores también obtuvieron cristales de la enzima en presencia de su cofactor PLP y del inhibidor APA, y para ello utilizaron un LM constituido por tacsinato al 2 % (p/v), 100 mM de citrato de sodio tribásico deshidratado a pH 5.6, PEG 3.35K al 16 % (p/v) y la misma concentración de proteína usada anteriormente.

Cuando se cristaliza una proteína para estudios de difracción de rayos X, generalmente se busca que la macromolécula también presente un alto grado de homogeneidad, con la finalidad de obtener unos pocos cristales grandes, que tengan una alta calidad de difracción. El grado de orden interno de un cristal está directamente relacionado con la extensión de su patrón de difracción. Cuanto más amplio y resolutivo sea el patrón de difracción, mayor será la uniformidad estructural de las moléculas en el cristal y más precisa será su disposición periódica. La resolución alcanzada en la determinación de las posiciones atómicas mediante el análisis de la estructura cristalina está estrechamente ligada a este grado de orden cristalino. En comparación con los cristales convencionales que se difractan hasta su límite teórico de resolución, los cristales de proteínas suelen generar patrones de difracción de extensión más limitada. Esto se debe a la presencia de canales líquidos y cavidades llenas de disolvente que impregnan los cristales macromoleculares. Estas características son las principales responsables de la limitada resolución en los patrones de difracción. Debido a los espacios relativamente grandes entre moléculas adyacentes y las fuerzas reticulares débiles resultantes, no todas las moléculas en el cristal ocupan orientaciones y posiciones exactamente equivalentes, sino que pueden variar ligeramente dentro o entre las celdas unitarias. Además, debido a la complejidad estructural de las moléculas de proteínas y su potencial para la dinámica conformacional, es posible que las moléculas en un cristal particular exhiban pequeñas variaciones en las cadenas polipeptídicas o en la disposición de los grupos laterales de una molécula a otra (**McPherson y Gavira, 2014**).

El proceso de cristalización de moléculas, incluyendo las proteínas, se lleva a cabo en dos etapas distintas pero inseparables: nucleación y crecimiento. La nucleación representa la transición de fase de primer orden en la cual las moléculas pasan de un estado completamente desordenado a uno ordenado. Esta etapa implica la formación de agregados de proteínas parcialmente ordenados o paracristalinos, conocidos como intermedios, que finalmente se convierten en núcleos críticos pequeños y completamente ordenados. Los núcleos críticos se deben considerar en términos de las dimensiones moleculares, la sobresaturación y la energía libre superficial del agregado molecular.

Tanto la nucleación como el crecimiento dependen de la sobresaturación del LM, que impulsa ambos procesos y determina su ocurrencia, extensión y cinética. En el caso de la cristalización de macromoléculas, es fundamental crear un estado sobresaturado, que es una condición de no equilibrio en la que una cantidad de macromolécula que supera el límite de solubilidad está presente en la solución bajo condiciones químicas y físicas específicas. La sobresaturación se logra mediante la introducción de precipitantes suaves, como sales neutras o polímeros, y mediante la modulación de múltiples parámetros, que engloban la temperatura, la fuerza iónica y el pH. Además, existen otros factores determinantes en el proceso de cristalización que pueden influir en el estado estructural de la macromolécula, tales como iones metálicos, inhibidores, cofactores y otras pequeñas moléculas. El equilibrio se establece a medida que se alcanza el límite de saturación mediante la formación y el desarrollo de un estado sólido, como los cristales (**McPherson y Gavira, 2014**).

La cristalización de proteínas presenta desafíos adicionales en comparación con la cristalización de moléculas pequeñas convencionales. En primer lugar, las proteínas pueden adoptar múltiples estados sólidos, como precipitados amorfos, aceites o geles, además de los cristales, y la formación de la mayoría de estos estados es favorecida cinéticamente. En segundo lugar, los cristales de proteínas requieren niveles de sobresaturación considerablemente más altos para iniciar su nucleación o crecimiento, a menudo en rangos de dos o tres órdenes de magnitud superiores a los necesarios para el crecimiento establecido (**McPherson y Gavira, 2014**). Por último, la cinética de la nucleación y el crecimiento de los cristales de macromoléculas es significativamente más lenta, de dos a tres órdenes de magnitud, en comparación con las moléculas pequeñas convencionales (**Kuznetsov et al., 1995; Malkin et al., 1996**). Esta diferencia se atribuye a su mayor tamaño, menor difusividad y una tendencia de asociación más débil en comparación con las moléculas pequeñas o los iones. Además, la incorporación de una macromolécula en crecimiento es menos probable debido a estas características (**Chernov, 2003; Vekilov y Chernov, 2003**).

Los cristales de HsODC que se generaron en presencia de Sulf/ACA (1 mM) se cosecharon individualmente y se sometieron a ensayos de difracción de rayos X en el difractor D8 VENTURE Bruker del departamento de Química del Cinvestav. Uno de los cristales probados proporcionó algunas imágenes, aunque la cantidad de puntos no fueron suficientes para determinar los parámetros de celda unitaria debido a la baja resolución del cristal (**Figura 28**). También se debe tener en cuenta que el difractor que se utilizó tenía como fuente de rayos X un ánodo de

molibdeno (Mo), el cual produce una radiación de alta resolución, pero de baja energía, que no es lo más idóneo para los cristales de proteínas. En los ensayos de difracción de rayos X de cristales de proteínas, el tipo de ánodo más utilizado puede tener un impacto significativo en la calidad de los datos obtenidos (**Drenth, 2007**). Entre los ánodos comúnmente utilizados, el ánodo de cobre (Cu) es una opción ampliamente preferida debido a sus características y ventajas únicas. Por un lado, el ánodo de cobre emite una radiación característica de alta intensidad (Cu  $K\alpha$ ), que es especialmente adecuada para la difracción de proteínas. Esta radiación de baja resolución proporciona una señal fuerte y constante, lo que resulta en una recolección de datos eficiente y confiable. Otra ventaja importante del ánodo de cobre es que puede proporcionar datos de resolución máxima de 1.5 Å. Al permitir una mayor resolución espacial, el ánodo de cobre contribuye a revelar la disposición precisa de los átomos en los cristales de la proteína de estudio. Además, este ánodo posee una buena conductividad térmica, lo que permite una rápida disipación del calor que se genera durante los ensayos. Esto garantiza la integridad estructural de los cristales y minimiza posibles efectos adversos. Por otra parte, el ánodo de cobre también ofrece ventajas prácticas, ya que es ampliamente disponible en los laboratorios de cristalografía de proteínas y su costo es generalmente más bajo en comparación con otros ánodos, como el de molibdeno. Esto lo convierte en una opción conveniente y accesible para la comunidad científica dedicada a la cristalografía de rayos X (**Su et al., 2015**).

## 9. CONCLUSIONES

El protocolo empleado para la purificación de la HsODC permitió obtener un rendimiento de  $3.63 \pm 1.65$  mg de proteína con un alto grado de pureza (93 %) a partir de 1 L de cultivo ( $190.35 \pm 13.63$  mg de proteínas totales del clarificado celular), requeridos para generar cristales de esta enzima en presencia de Sulf o ACA.

Las condiciones óptimas de cristalización para la HsODC en presencia de Sulf fueron las siguientes: un licor madre constituido por 100 mM de tampón Bis-Tris pH: 6.5, 23 – 23.5% de precipitante PEG 3.35K y acetato de amonio: 5 - 30 mM, y una muestra formada por la HsODC (10 mg/mL), PLP (0.2 mM), Cad (25 mM) y Sulf (1 mM).

Se obtuvieron cristales de proteína con una longitud que varió entre los 80 y 140  $\mu\text{m}$  y un grosor entre los 30 y 40  $\mu\text{m}$ , siendo los cristales de HsODC en presencia de Sulf los de mayor tamaño (100-140  $\mu\text{m}$ ). Sin embargo, no se pudo generar un set de datos con una cantidad de puntos de difracción suficientes para determinar los parámetros de celda unitaria.

## **10. PERSPECTIVAS**

- Modificar otros parámetros que pueden influir en el proceso de cristalización, como la concentración de la proteína, el pH del tampón, la temperatura, el agente precipitante y las concentraciones del cofactor y del aditivo utilizados.
- Probar otras técnicas de cristalización, como la difusión de vapor en gota colgante y el microbatch.
- Obtener los datos de difracción de los cristales de la HsODC en el sincrotrón de Stanford (California).
- Construir y refinar el modelo 3D de la HsODC en presencia de Sulf o ACA con el empleo de la suite CCP4.



---

## 11. REFERENCIAS

- Alcázar, R., & Tiburcio, A. F. (2018). Polyamines. *Methods and Protocols*, Humana Press, Springer.
- Alexander, E. T., Minton, A., Peters, M. C., Phanstiel IV, O., & Gilmour, S. K. (2017). A novel polyamine blockade therapy activates an anti-tumor immune response. *Oncotarget*, 8(48), 84140.
- Alexiou, G. A., Lianos, G. D., Ragos, V., Galani, V., & Kyritsis, A. P. (2017). Difluoromethylornithine in cancer: new advances. *Future Oncology*, 13(9), 809-819.
- Alhonen-Hongisto, L., Seppänen, P., & Jänne, J. (1980). Intracellular putrescine and spermidine deprivation induces increased uptake of the natural polyamines and methylglyoxal bis (guanylhydrazone). *Biochemical Journal*, 192(3), 941-945.
- Almud, J. J., Oliveira, M. A., Kern, A. D., Grishin, N. V., Phillips, M. A., & Hackert, M. L. (2000). Crystal structure of human ornithine decarboxylase at 2.1 Å resolution: structural insights to antizyme binding. *Journal of molecular biology*, 295(1), 7-16.
- Andersson, A. C., & Henningson, S. (1980). Biosynthesis and accumulation of cadaverine and putrescine in rat ovary after administration of human chorionic gonadotrophin. *European Journal of Endocrinology*, 95(2), 237-243.
- Asher, G., Bercovich, Z., Tsvetkov, P., Shaul, Y., & Kahana, C. (2005). 20S proteasomal degradation of ornithine decarboxylase is regulated by NQO1. *Molecular cell*, 17(5), 645-655.
- Auvinen, M., Laine, A., Paasinen-Sohns, A., Kangas, A., Kangas, L., Saksela, O., ... & Hölttä, E. (1997). Human ornithine decarboxylase-overproducing NIH3T3 cells induce rapidly growing, highly vascularized tumors in nude mice. *Cancer research*, 57(14), 3016-3025.
- Babokhov, P., Sanyaolu, A. O., Oyibo, W. A., Fagbenro-Beyioku, A. F., & Iriemenam, N. C. (2013). A current analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis. *Pathogens and global health*, 107(5), 242-252.
- Bachmann, A. S., & Geerts, D. (2018). Polyamine synthesis as a target of MYC oncogenes. *Journal of Biological Chemistry*, 293(48), 18757-18769.

- Bachrach, U. (2005). Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. *Current protein and peptide science*, 6(6), 559-566.
- Bachrach, U. (2010). The early history of polyamine research. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(7), 490-495.
- Bae, D. H., Lane, D. J., Jansson, P. J., & Richardson, D. R. (2018). The old and new biochemistry of polyamines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1862(9), 2053-2068.
- Bailey, H. H., Kim, K., Verma, A. K., Sielaff, K., Larson, P. O., Snow, S., ... & Carbone, P. P. (2010). A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 skin cancer prevention study of  $\alpha$ -difluoromethylornithine in subjects with previous history of skin cancer. *Cancer prevention research*, 3(1), 35-47.
- Bartek, J., & Lukas, J. (2001). p27 destruction: Cks1 pulls the trigger. *Nature cell biology*, 3(4), E95-E97.
- Bartholeyns, J., Mamont, P., & Casara, P. (1984). Antitumor Properties of (2 R, 5 R)-6-Heptyne-2, 5-diamine, a New Potent Enzyme-activated Irreversible Inhibitor of Ornithine Decarboxylase, in Rodents. *Cancer research*, 44(11), 4972-4977.
- Basuroy, U. K., & Gerner, E. W. (2006). Emerging concepts in targeting the polyamine metabolic pathway in epithelial cancer chemoprevention and chemotherapy. *Journal of Biochemistry*, 139(1), 27-33.
- Baudino, T. A., Maclean, K. H., Brennan, J., Parganas, E., Yang, C., Aslanian, A., ... & Cleveland, J. L. (2003). Myc-mediated proliferation and lymphomagenesis, but not apoptosis, are compromised by E2f1 loss. *Molecular cell*, 11(4), 905-914.
- Bauer, P. M., Buga, G. M., Fukuto, J. M., Pegg, A. E., & Ignarro, L. J. (2001). Nitric Oxide Inhibits Ornithine Decarboxylase via S-Nitrosylation of Cysteine 360 in the Active Site of the Enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 276(37), 34458-34464.
- Bello-Fernández, C., Packham, G., & Cleveland, J. L. (1993). The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(16), 7804-7808.

- Bercovich, Z., & Kahana, C. (2004). Degradation of antizyme inhibitor, an ornithine decarboxylase homologous protein, is ubiquitin-dependent and is inhibited by antizyme. *Journal of Biological Chemistry*, 279(52), 54097-54102.
- Bey, P., Danzin, C., Van Dorselaer, V., Mamont, P., Jung, M., & Tardif, C. (1978). Analogs of ornithine as inhibitors of ornithine decarboxylase. New deductions concerning the topography of the enzyme's active site. *Journal of Medicinal Chemistry*, 21(1), 50-55.
- Borrell, A., Carbonell, L., Farras, R., Puig-Parellada, P., & Tiburcio, A. F. (1997). Polyamines inhibit lipid peroxidation in senescing oat leaves. *Physiologia Plantarum*, 99(3), 385-390.
- Brown, R. B., & Audet, J. (2008). Current techniques for single-cell lysis. *Journal of the Royal Society Interface*, 5(suppl\_2), S131-S138.
- Burgess, R. R. (2018). A brief practical review of size exclusion chromatography: rules of thumb, limitations, and troubleshooting. *Protein expression and purification*, 150, 81-85.
- Burns, M. R., Graminski, G. F., Weeks, R. S., Chen, Y., & O'Brien, T. G. (2009). Lipophilic lysine-spermine conjugates are potent polyamine transport inhibitors for use in combination with a polyamine biosynthesis inhibitor. *Journal of medicinal chemistry*, 52(7), 1983-1993.
- Byers, T. L., Ganem, B., & Pegg, A. E. (1992). Cytostasis induced in L1210 murine leukaemia cells by the S-adenosyl-l-methionine decarboxylase inhibitor 5'-[(Z)-4-amino-2-butenyl] methylamino)-5'-deoxyadenosine may be due to hypusine depletion. *Biochemical Journal*, 287(3), 717-724.
- Carmichael, J., Cantwell, B. M., Harris, A. L., Buamah, P. K., Hodson, A. W., & Skillen, A. W. (1990). Assessment of renal toxicity by urinary enzymes in patients receiving chemotherapy with 8-methyl-8-acetylenic-putrescine. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 26, 65-66.
- Casero Jr, R. A., & Marton, L. J. (2007). Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nature reviews Drug discovery*, 6(5), 373-390.
- Casero Jr, R. A., Murray Stewart, T., & Pegg, A. E. (2018). Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 18(11), 681-695.

- Chen, A. C., & Luke, J. D. (2021). Eflornithine. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 13(3), 179-182.
- Chen, C. J., Rose, J. P., Newton, M. G., Liu, Z. J., & Wang, B. C. (2002). Protein crystallography. *Modern protein chemistry: practical aspects*, 7.
- Chen, Y., Megosh, L. C., Gilmour, S. K., Sawicki, J. A., & O'Brien, T. G. (2000). K6/ODC transgenic mice as a sensitive model for carcinogen identification. *Toxicology letters*, 116(1-2), 27-35.
- Chernov, A. A. (2003). Protein crystals and their growth. *Journal of structural biology*, 142(1), 3-21.
- Choi, S. H., Kim, S. W., Choi, D. H., Min, B. H., & Chun, B. G. (2000). Polyamine-depletion induces p27Kip1 and enhances dexamethasone-induced G1 arrest and apoptosis in human T lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia research*, 24(2), 119-127.
- Coffino, P. (2001a). Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochimie*, 83(3-4), 319-323.
- Coffino, P. (2001b). Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(3), 188-194.
- Congreve, M., Murray, C. W., & Blundell, T. L. (2005). Keynote review: Structural biology and drug discovery. *Drug discovery today*, 10(13), 895-907.
- Cornbleet, M. A., Kingsnorth, A., Tell, G. P., Haegele, K. D., Joder-Ohlenbusch, A. M., & Smyth, J. F. (1989). Phase I study of methylacetylenic putrescine, an inhibitor of polyamine biosynthesis. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 23, 348-352.
- Corral, M., & Wallace, H. M. (2020). Upregulation of polyamine transport in human colorectal cancer cells. *Biomolecules*, 10(4), 499.
- Correa-Basurto, J., Rodríguez-Páez, L., Aguiar-Moreno, E. S., Lopez-Sanchez, P., Espinoza-Fonseca, L. M., Wong, C., & Trujillo-Ferrara, J. (2009). Computational and experimental evaluation of ornithine derivatives as ornithine decarboxylase inhibitors. *Medicinal chemistry research*, 18, 20-30.

- Coyne Jr, P. E. (2001). The eflornithine story. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 45(5), 784-786.
- Cytiva. (2023). cytivalifesciences. Consultado el 2 de junio de 2023, de <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/chromatography/prepacked-columns/affinity-tagged-protein/histrap-hp-histidine-tagged-protein-purification-columns-p-00250>
- Damiani, E., & Wallace, H. M. (2018). Polyamines and cancer. *Polyamines: Methods and Protocols*, 469-488.
- Danzin, C., Casara, P., Claverie, N., Metcalf, B. W., & Jung, M. J. (1983). (2R, 5R)-6-heptyne-2, 5-diamine, an extremely potent inhibitor of mammalian ornithine decarboxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 116(1), 237-243.
- Das, K. C., & Misra, H. P. (2004). Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen quenching properties of polyamines. *Molecular and cellular biochemistry*, 262, 127-133.
- Davis, R. H., Morris, D. R., & Coffino, P. (1992). Sequestered end products and enzyme regulation: the case of ornithine decarboxylase. *Microbiological reviews*, 56(2), 280-290.
- Degirmenci, U., Wang, M., & Hu, J. (2020). Targeting aberrant RAS/RAF/MEK/ERK signaling for cancer therapy. *Cells*, 9(1), 198.
- Dirksen, A., & Dawson, P. E. (2008). Rapid oxime and hydrazone ligations with aromatic aldehydes for biomolecular labeling. *Bioconjugate chemistry*, 19(12), 2543-2548.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature reviews cancer*, 3(1), 11-22.
- Drenth, J. (2007). Principles of protein X-ray crystallography. *Springer Science & Business Media*.
- Dubendorf, J. W., & Studier, F. W. (1991). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *Journal of molecular biology*, 219(1), 45-59.

- Dufe, V. T., Ingner, D., Heby, O., Khomutov, A. R., Persson, L., & Al-Karadaghi, S. (2007). A structural insight into the inhibition of human and *Leishmania donovani* ornithine decarboxylases by 1-amino-oxy-3-aminopropane. *Biochemical Journal*, 405(2), 261-268.
- Filisola-Villaseñor *et al.*, (en preparación).
- Fujisawa, S., & Kadoma, Y. (2005). Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer research*, 25(2A), 965-969.
- Gandre, S., Bercovich, Z., & Kahana, C. (2002). Ornithine decarboxylase-antizyme is rapidly degraded through a mechanism that requires functional ubiquitin-dependent proteolytic activity. *European journal of biochemistry*, 269(4), 1316-1322.
- Ganju, V., Edmonson, J. H., & Buckner, J. C. (1994). Phase I study of combined alpha interferon, alpha difluoromethylornithine (DFMO), and doxorubicin in advanced malignancy. *Investigational new drugs*, 12, 25-27.
- Genlantis. (2023). amsbio. Consultado el 12 de mayo de 2023, de [https://www.researchgate.net/profile/Saleh\\_Alkarim/post/Did\\_anyone\\_get\\_good\\_expression\\_with\\_SOLUBL21\\_and\\_M9\\_media/attachment/59d64482c49f478072ead48f/AS%3A324293794172930%401454329073875/download/SOLUBL21+and+M9.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Saleh_Alkarim/post/Did_anyone_get_good_expression_with_SOLUBL21_and_M9_media/attachment/59d64482c49f478072ead48f/AS%3A324293794172930%401454329073875/download/SOLUBL21+and+M9.pdf)
- Gerner, E. W., & Mamont, P. S. (1986). Restoration of the polyamine contents in rat hepatoma tissue-culture cells after inhibition of polyamine biosynthesis: Relationship with cell proliferation. *European journal of biochemistry*, 156(1), 31-35.
- Gerner, E. W., & Meyskens Jr, F. L. (2004). Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature Reviews Cancer*, 4(10), 781-792.
- Gitto, S. B., Pandey, V., Oyer, J. L., Copik, A. J., Hogan, F. C., Phanstiel IV, O., & Altomare, D. A. (2018). Difluoromethylornithine combined with a polyamine transport inhibitor is effective against gemcitabine resistant pancreatic cancer. *Molecular Pharmaceutics*, 15(2), 369-376.
- Gohda, E., Takigawa, M., Inoue, H., Kato, Y., Daikuhara, Y., & Takeda, Y. (1983). Inhibition of Polyamine Synthesis and Proliferation in Mouse L Cells by DL- $\alpha$ -Hydrazino- $\delta$ -Aminovaleric Acid, an Inhibitor of Ornithine Decarboxylase. *The Journal of Biochemistry*, 94(1), 97-106.

- Gopinath, R., Durgadevi, P., Gopinath, V., Vasanthi, K., & Manickan, E. (2016). Efficient diagnosis of Mycobacterium tuberculosis (MTB) infections by using membrane secretory proteins of MTB. *Int J Biol Res*, 1(2), 47-52.
- Greer, J., Erickson, J. W., Baldwin, J. J., & Varney, M. D. (1994). Application of the three-dimensional structures of protein target molecules in structure-based drug design. *Journal of medicinal chemistry*, 37(8), 1035-1054.
- Grens, A., & Scheffler, I. E. (1990). The 5'-and 3'-untranslated regions of ornithine decarboxylase mRNA affect the translational efficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 265(20), 11810-11816.
- Grishin, N. V., Osterman, A. L., Brooks, H. B., Phillips, M. A., & Goldsmith, E. J. (1999). X-ray structure of ornithine decarboxylase from Trypanosoma brucei: the native structure and the structure in complex with  $\alpha$ -difluoromethylornithine. *Biochemistry*, 38(46), 15174-15184.
- Guo, Y., Cleveland, J. L., & O'Brien, T. G. (2005). Haploinsufficiency for *odc* modifies mouse skin tumor susceptibility. *Cancer research*, 65(4), 1146-1149.
- Guo, Y., Harris, R. B., Rosson, D., Boorman, D., & O'Brien, T. G. (2000). Functional analysis of human ornithine decarboxylase alleles. *Cancer research*, 60(22), 6314-6317.
- Ha, H. C., Sirisoma, N. S., Kuppusamy, P., Zweier, J. L., Woster, P. M., & Casero Jr, R. A. (1998). The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(19), 11140-11145.
- Hall, M. (2018). Size exclusion chromatography (SEC). In *Biopharmaceutical Processing* (pp. 421-432). Elsevier.
- Hamouda, N. N., Van den Haute, C., Vanhoutte, R., Sannerud, R., Azfar, M., Mayer, R., ... & Vangheluwe, P. (2021). ATP13A3 is a major component of the enigmatic mammalian polyamine transport system. *Journal of Biological Chemistry*, 296.
- Hayashi, S. I., & Murakami, Y. (1995). Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase. *Biochemical Journal*, 306(Pt 1), 1.

- Hayashi, S. I., Murakami, Y., & Matsufuji, S. (1996). Ornithine decarboxylase antizyme: a novel type of regulatory protein. *Trends in biochemical sciences*, 21(1), 27-30.
- Hielscher Ultrasonics. (2023). hielscher. Consultado el 2 de junio de 2023, de <https://www.hielscher.com/ultrasonic-lysis-cell-disruption-extraction.htm>
- Heby, O., & Persson, L. (1990). Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells. *Trends in biochemical sciences*, 15(4), 153-158.
- Heller, J. S., Fong, W. F., & Canellakis, E. S. (1976). Induction of a protein inhibitor to ornithine decarboxylase by the end products of its reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(6), 1858-1862.
- Hessels, J., Kingma, A. W., Ferwerda, H., Keu, J., Van den Berg, G. A., & Muskiet, F. A. J. (1989). Microbial flora in the gastrointestinal tract abolishes cytostatic effects of  $\alpha$ -difluoromethylornithine *in vivo*. *International journal of cancer*, 43(6), 1155-1164.
- Holbert, C. E., Cullen, M. T., Casero Jr, R. A., & Stewart, T. M. (2022). Polyamines in cancer: Integrating organismal metabolism and antitumour immunity. *Nature Reviews Cancer*, 22(8), 467-480.
- Hölttä, E., Korpela, H., & Hovi, T. (1981). Several inhibitors of ornithine and adenosylmethionine decarboxylases may also have antiproliferative effects unrelated to polyamine depletion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 677(1), 90-102.
- Hölttä, E., Sistonen, L., & Alitalo, K. (1988). The mechanisms of ornithine decarboxylase deregulation in c-Ha-ras oncogene-transformed NIH 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 263(9), 4500-4507.
- Horn, Y., Schechter, P. J., & Marton, L. J. (1987). Phase I–II clinical trial with alpha-difluoromethylornithine—an inhibitor of polyamine biosynthesis. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 23(8), 1103-1107.
- Huber, M., Pelletier, J. G., Torossian, K., Dionne, P., Gamache, I., Charest-Gaudreault, R., ... & Poulin, R. (1996). 2, 2'-Dithiobis (N-ethyl-spermine-5-carboxamide) is a high affinity, membrane-impermeant antagonist of the mammalian polyamine transport system. *Journal of Biological Chemistry*, 271(44), 27556-27563.



- Hu, H. Y., Liu, X. X., Jiang, C. Y., Zhang, Y., Bian, J. F., Lu, Y., ... & Wang, W. (2003). Cloning and expression of ornithine decarboxylase gene from human colorectal carcinoma. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 9(4), 714.
- Hyvönen, T., Alakuijala, L., Andersson, L., Khomutov, A. R., Khomutov, R. M., & Eloranta, T. O. (1988). 1-Aminoxy-3-aminopropane reversibly prevents the proliferation of cultured baby hamster kidney cells by interfering with polyamine synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 263(23), 11138-11144.
- Hyvönen, T., Khomutov, A. R., Khomutov, R. M., Lapinjoki, S., & Eloranta, T. O. (1990). Uptake of 3H-Labeled 1-Aminopropane by Baby Hamster Kidney Cells. *The Journal of Biochemistry*, 107(6), 817-820.
- Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochemical and biophysical research communications*, 271(3), 559-564.
- Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2010). Modulation of cellular function by polyamines. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(1), 39-51.
- Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2015). Modulation of protein synthesis by polyamines. *IUBMB life*, 67(3), 160-169.
- Igarashi, K., Porter, C. W., & Morris, D. R. (1984). Comparison of specificity of inhibition of polyamine synthesis in bovine lymphocytes by ethylglyoxal bis (guanylhydrazone) and methylglyoxal bis (guanylhydrazone). *Cancer research*, 44(11), 5326-5331.
- Inoue, H., Kato, Y., Takigawa, M., Adachi, K., & Takeda, Y. (1975). Effect of dl- $\alpha$ -hydrazino- $\delta$ -aminovaleric acid, an inhibitor of ornithine decarboxylase, on polyamine metabolism in isoproterenol-stimulated mouse parotid glands. *The Journal of Biochemistry*, 77(4), 879-893.
- Ito, K., & Igarashi, K. (1990). Polyamine regulation of the synthesis of thymidine kinase in bovine lymphocytes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 278(1), 277-283.
- Jackson, L. K., Brooks, H. B., Osterman, A. L., Goldsmith, E. J., & Phillips, M. A. (2000). Altering the reaction specificity of eukaryotic ornithine decarboxylase. *Biochemistry*, 39(37), 11247-11257.

- Jiang, Y., Roberts, S. C., Jardim, A., Carter, N. S., Shih, S., Ariyanayagam, M., ... & Ullman, B. (1999). Ornithine decarboxylase gene deletion mutants of *Leishmania donovani*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(6), 3781-3788.
- Kahana, C. (2016). Protein degradation, the main hub in the regulation of cellular polyamines. *Biochemical Journal*, 473(24), 4551-4558.
- Kahana, C., Asher, G., & Shaul, Y. (2005). Mechanisms of protein degradation: an odyssey with ODC. *Cell Cycle*, 4(11), 1461-1464.
- Kanerva, K., Mäkitie, L. T., Pelander, A., Heiskala, M., & Andersson, L. C. (2008). Human ornithine decarboxylase paralogue (ODCp) is an antizyme inhibitor but not an arginine decarboxylase. *Biochemical Journal*, 409(1), 187-192.
- Kato, Y., Inoue, H., Gohda, E., Tamada, F., & Takeda, Y. (1976). Effect of dl- $\alpha$ -hydrazino- $\delta$ -aminovaleric acid, an inhibitor of ornithine decarboxylase, on polyamine metabolism and growth of mouse sarcoma-180. *GANN Japanese Journal of Cancer Research*, 67(4), 569-576.
- Kern, A. D., Oliveira, M. A., Coffino, P., & Hackert, M. L. (1999). Structure of mammalian ornithine decarboxylase at 1.6 Å resolution: stereochemical implications of PLP-dependent amino acid decarboxylases. *Structure*, 7(5), 567-581.
- Khomutov, A. R. (2002). Inhibition of enzymes of polyamine biosynthesis by substrate-like O-substituted hydroxylamines. *Biochemistry (Moscow)*, 67, 1159-1167.
- Khomutov, R. M., Hyvönen, T., Karvonen, E., Kauppinen, L., Paalanen, T., Paulin, L., ... & Pösö, H. (1985). 1-Aminoxy-3-aminopropane, a new and potent inhibitor of polyamine biosynthesis that inhibits ornithine decarboxylase, adenosylmethionine decarboxylase and spermidine synthase. *Biochemical and biophysical research communications*, 130(2), 596-602.
- Kramer, D. L., Vujcic, S., Diegelman, P., Alderfer, J., Miller, J. T., Black, J. D., ... & Porter, C. W. (1999). Polyamine analogue induction of the p53-p21WAF1/CIP1-Rb pathway and G1 arrest in human melanoma cells. *Cancer research*, 59(6), 1278-1286.

- Kurata, H. T., Akrouh, A., Li, J. W., Marton, L. J., & Nichols, C. G. (2013). Scanning the topography of polyamine blocker binding in an inwardly rectifying potassium channel. *Journal of Biological Chemistry*, 288(9), 6591-6601.
- Kurata, H. T., Marton, L. J., & Nichols, C. G. (2006). The polyamine binding site in inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *The Journal of general physiology*, 127(5), 467-480.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., & Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228, 367-381.
- Kuznetsov, Y. G., Malkin, A. J., Greenwood, A., & McPherson, A. (1995). Interferometric studies of growth kinetics and surface morphology in macromolecular crystal growth: canavalin, thaumatin, and turnip yellow mosaic virus. *Journal of structural biology*, 114(3), 184-196.
- Lenis, Y. Y., Elmetwally, M. A., Maldonado-Estrada, J. G., & Bazer, F. W. (2017). Physiological importance of polyamines. *Zygote*, 25(3), 244-255.
- Lesley, S. A. (2001). High-throughput proteomics: protein expression and purification in the postgenomic world. *Protein expression and purification*, 22(2), 159-164.
- Leveque, J., Burtin, F., Catros-Quemener, V., Havouis, R., & Moulinoux, J. P. (1998). The gastrointestinal polyamine source depletion enhances DFMO induced polyamine depletion in MCF-7 human breast cancer cells *in vivo*. *Anticancer research*, 18(4A), 2663-2668.
- Levin, V. A., Hess, K. R., Choucair, A., Flynn, P. J., Jaeckle, K. A., Kyritsis, A. P., ... & Kim, H. W. (2003). Phase III randomized study of postradiotherapy chemotherapy with combination  $\alpha$ -difluoromethylornithine-PCV versus PCV for anaplastic gliomas. *Clinical cancer research*, 9(3), 981-990.
- Levin, V. A., Prados, M. D., Yung, W. A., Gleason, M. J., Ictech, S., & Malec, M. (1992). Treatment of recurrent gliomas with eflornithine. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 84(18), 1432-1437.
- Lewis, E. C., Kraveka, J. M., Ferguson, W., Eslin, D., Brown, V. I., Bergendahl, G., ... & Saulnier Sholler, G. L. (2020). A subset analysis of a phase II trial evaluating the use of DFMO as maintenance therapy for high-risk neuroblastoma. *International journal of cancer*, 147(11), 3152-3159.

- Li, L., Liu, L., Rao, J. N., Esmaili, A., Strwilliauch, E. D., Bass, B. L., & Wang, J. Y. (2002). JunD stabilization results in inhibition of normal intestinal epithelial cell growth through p21 after polyamine depletion. *Gastroenterology*, 123(3), 764-779.
- Li, J., Meng, Y., Wu, X., & Sun, Y. (2020). Polyamines and related signaling pathways in cancer. *Cancer cell international*, 20, 1-16.
- Liu, C., Chan, C. B., & Ye, K. (2016b). 7, 8-dihydroxyflavone, a small molecular TrkB agonist, is useful for treating various BDNF-implicated human disorders. *Translational neurodegeneration*, 5(1), 1-9.
- Liu, H., Dong, Y., Gao, Y., Du, Z., Wang, Y., Cheng, P., ... & Huang, H. (2016a). The fascinating effects of baicalein on cancer: a review. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1681.
- Liu, Y. C., Liu, Y. L., Hsieh, J. Y., Wang, C. H., Lin, C. L., Liu, G. Y., & Hung, H. C. (2020). Baicalein, 7, 8-Dihydroxyflavone and Myricetin as Potent Inhibitors of Human Ornithine Decarboxylase. *Nutrients*, 12(12), 3867.
- LoGiudice, N., Le, L., Abuan, I., Leizorek, Y., & Roberts, S. C. (2018). Alpha-difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of polyamine biosynthesis, as a therapeutic strategy against hyperproliferative and infectious diseases. *Medical Sciences*, 6(1), 12.
- Love, R. R., Jacoby, R., Newton, M. A., Tutsch, K. D., Simon, K., Pomplun, M., & Verma, A. K. (1998). A randomized, placebo-controlled trial of low-dose alpha-difluoromethylornithine in individuals at risk for colorectal cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 7(11), 989-992.
- Lövkvist Wallström, E., Takao, K., Wendt, A., Vargiu, C., Yin, H., & Persson, L. (2001). Importance of the 3' untranslated region of ornithine decarboxylase mRNA in the translational regulation of the enzyme. *Biochemical Journal*, 356(2), 627-634.

- Luk, G. D., Civin, C. I., Weissman, R. M., & Baylin, S. B. (1982). Ornithine decarboxylase: essential in proliferation but not differentiation of human promyelocytic leukemia cells. *Science*, 216(4541), 75-77.
- Luk, G. D., Goodwin, G., Marton, L. J., & Baylin, S. B. (1981). Polyamines are necessary for the survival of human small-cell lung carcinoma in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(4), 2355-2358.
- Macrae, M., Kramer, D. L., & Coffino, P. (1998). Developmental effect of polyamine depletion in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Journal*, 333(2), 309-315.
- Malkin, A. J., Kuznetsov, Y. G., Glantz, W., & McPherson, A. (1996). Atomic force microscopy studies of surface morphology and growth kinetics in thaumatin crystallization. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(28), 11736-11743.
- Mamont, P. S., Duchesne, M. C., Grove, J., & Tardif, C. (1978). Initial characterization of a HTC cell variant partially resistant to the anti-proliferative effect of ornithine decarboxylase inhibitors. *Experimental Cell Research*, 115(2), 387-393.
- Mangold, U. (2005). The antizyme family: polyamines and beyond. *IUBMB life*, 57(10), 671-676.
- Marković-Housley, Z., Schirmer, T., Hohenester, E., Khomutov, A. R., Khomutov, R. M., Karpeisky, M. Y., ... & Jansonius, J. N. (1996). Crystal structures and solution studies of oxime adducts of mitochondrial aspartate aminotransferase. *European journal of biochemistry*, 236(3), 1025-1032.
- Martínez, M. E., O'Brien, T. G., Fultz, K. E., Babbar, N., Yerushalmi, H., Qu, N., ... & Gerner, E. W. (2003). Pronounced reduction in adenoma recurrence associated with aspirin use and a polymorphism in the ornithine decarboxylase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 7859-7864.
- Matsufuji, S., Matsufuji, T., Miyazaki, Y., Murakami, Y., Atkins, J. F., Gesteland, R. F., & Hayashi, S. I. (1995). Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme. *Cell*, 80(1), 51-60.

- Matsuzaki, S., Tanaka, S., Suzuki, M., & Hamana, K. (1981). A possible role of cadaverine in the biosynthesis of polyamines in the Japanese newt testis. *Endocrinologia Japonica*, 28(3), 305-312.
- McCann, P. P., & Pegg, A. E. (1992). Ornithine decarboxylase as an enzyme target for therapy. *Pharmacology & therapeutics*, 54(2), 195-215.
- McPherson, A. (1989). Macromolecular crystals. *Scientific American*, 260(3), 62-69.
- McPherson, A., & Gavira, J. A. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70(1), 2-20.
- Medina-Enríquez, M. M., Alcantara-Farfan, V., Aguilar-Faisal, L., Trujillo-Ferrara, J. G., Rodríguez-Paez, L., & Vargas-Ramírez, A. L. (2015). N- $\omega$ -chloroacetyl-L-ornithine, a new competitive inhibitor of ornithine decarboxylase, induces selective growth inhibition and cytotoxicity on human cancer cells versus normal cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 30(3), 345-353.
- Meehan, T. F., Conte, N., West, D. B., Jacobsen, J. O., Mason, J., Warren, J., ... & Smedley, D. (2017). Disease model discovery from 3,328 gene knockouts by The International Mouse Phenotyping Consortium. *Nature genetics*, 49(8), 1231-1238.
- Megosh, L., Gilmour, S. K., Rosson, D., Soler, A. P., Blessing, M., Sawicki, J. A., & O'Brien, T. G. (1995). Increased frequency of spontaneous skin tumors in transgenic mice which overexpress ornithine decarboxylase. *Cancer research*, 55(19), 4205-4209.
- Merril, C. R., & Goldman, D. A. V. I. D. (1984). Detection of polypeptides in two-dimensional gels using silver staining. In *Two-dimensional Gel Electrophoresis of Proteins: Methods and Applications* (pp. 111-126). New York: Academic Press.
- Metcalfe, B. W., Bey, P., Danzin, C., Jung, M. J., Casara, P., & Vevert, J. P. (1978). Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (EC 4.1.1.17) by substrate and product analogs. *Journal of the American Chemical Society*, 100(8), 2551-2553.
- Mett, H., Stanek, J., Lopez-Ballester, J. A., Jänne, J., Alhonen, L., Sinervirta, R., ... & Regenass, U. (1993). Pharmacological properties of the ornithine decarboxylase inhibitor 3-

- aminooxy-1-propanamine and several structural analogues. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 32, 39-45.
- Meyskens Jr, F. L., Emerson, S. S., Pelot, D., Meshkinpour, H., Shassetz, L. R., Einspahr, J., ... & Gerner, E. W. (1994). Dose de-escalation chemoprevention trial of  $\alpha$ -difluoromethylornithine in patients with colon polyps. *Journal of the National Cancer Institute*, 86(15), 1122-1130.
- Meyskens Jr, F. L., & Gerner, E. W. (1999). Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent. *Clinical Cancer Research*, 5(5), 945-951.
- Michael, A. J. (2016a). Polyamines in eukaryotes, bacteria, and archaea. *Journal of Biological Chemistry*, 291(29), 14896-14903.
- Michael, A. J. (2016b). Biosynthesis of polyamines and polyamine-containing molecules. *Biochemical Journal*, 473(15), 2315-2329.
- Miller-Fleming, L., Olin-Sandoval, V., Campbell, K., & Ralser, M. (2015). Remaining mysteries of molecular biology: the role of polyamines in the cell. *Journal of molecular biology*, 427(21), 3389-3406.
- Milovica, V., Turchanowa, L., Khomutov, A. R., Khomutov, R. M., Caspary, W. F., & Stein, J. (2001). Hydroxylamine-containing inhibitors of polyamine biosynthesis and impairment of colon cancer cell growth. *Biochemical pharmacology*, 61(2), 199-206.
- Minois, N., Carmona-Gutierrez, D., Bauer, M. A., Rockenfeller, P., Eisenberg, T., Brandhorst, S., ... & Madeo, F. (2012). Spermidine promotes stress resistance in *Drosophila melanogaster* through autophagy-dependent and-independent pathways. *Cell death & disease*, 3(10), e401-e401.
- Minois, N., Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F. (2011). Polyamines in aging and disease. *Aging (albany NY)*, 3(8), 716.
- Mohan, R. R., Challa, A., Gupta, S., Bostwick, D. G., Ahmad, N., Agarwal, R., ... & Mukhtar, H. (1999). Overexpression of ornithine decarboxylase in prostate cancer and prostatic fluid in humans. *Clinical Cancer Research*, 5(1), 143-147.

- Moinard, C., Cynober, L., & de Bandt, J. P. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 24(2), 184-197.
- Monti, M. G., Ghiaroni, S., Barbieri, D., Franceschi, C., Marverti, G., & Moruzzi, M. S. (1999). 2-deoxy-d-ribose-induced apoptosis in HL-60 cells is associated with the cell cycle progression by spermidine. *Biochemical and biophysical research communications*, 257(2), 460-465.
- Moriyama, Y., Hatano, R., Moriyama, S., & Uehara, S. (2020). Vesicular polyamine transporter as a novel player in amine-mediated chemical transmission. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1862(12), 183208.
- Moshier, J. A., Dosesco, J., Skunca, M., & Luk, G. D. (1993). Transformation of NIH/3T3 cells by ornithine decarboxylase overexpression. *Cancer Research*, 53(11), 2618-2622.
- Moshier, J. A., Malecka-Panas, E., Geng, H., Dosesco, J., Tureaud, J., Skunca, M., & Majumdar, A. P. (1995). Ornithine decarboxylase transformation of NIH/3T3 cells is mediated by altered epidermal growth factor receptor activity. *Cancer research*, 55(22), 5358-5365.
- Mounce, B. C., Olsen, M. E., Vignuzzi, M., & Connor, J. H. (2017). Polyamines and their role in virus infection. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(4), e00029-17.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Hayashi, S. I., Tanahashi, N., & Tanaka, K. (2000). Degradation of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. *Biochemical and biophysical research communications*, 267(1), 1-6.
- Muth, A., Madan, M., Archer, J. J., Ocampo, N., Rodriguez, L., & Phanstiel IV, O. (2014). Polyamine transport inhibitors: design, synthesis, and combination therapies with difluoromethylornithine. *Journal of medicinal chemistry*, 57(2), 348-363.
- New England BioLabs. (2023). Consultado el 2 de junio de 2023, de <https://international.neb.com/applications/protein-expression/protein-expression-in-e-coli/t7-expression>.
- Nilsson, J. A., Keller, U. B., Baudino, T. A., Yang, C., Norton, S., Old, J. A., ... & Cleveland, J. L. (2005). Targeting ornithine decarboxylase in Myc-induced lymphomagenesis prevents tumor formation. *Cancer cell*, 7(5), 433-444.



- Nilsson, J. A., Maclean, K. H., Keller, U. B., Pendeville, H., Baudino, T. A., & Cleveland, J. L. (2004). Mnt loss triggers Myc transcription targets, proliferation, apoptosis, and transformation. *Molecular and cellular biology*, 24(4), 1560-1569.
- Nishimura, K., Okudaira, H., Ochiai, E., Higashi, K., Kaneko, M., Ishii, I., ... & Igarashi, K. (2009). Identification of proteins whose synthesis is preferentially enhanced by polyamines at the level of translation in mammalian cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(11), 2251-2261.
- Nowotarski, S. L., & Shantz, L. M. (2010). Cytoplasmic accumulation of the RNA-binding protein HuR stabilizes the ornithine decarboxylase transcript in a murine nonmelanoma skin cancer model. *Journal of Biological Chemistry*, 285(41), 31885-31894.
- O'Brien, T. G., Guo, Y., Visvanathan, K., Sciulli, J., McLaine, M., Helzlsouer, K. J., & Watkins-Bruner, D. (2004). Differences in ornithine decarboxylase and androgen receptor allele frequencies among ethnic groups. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 41(2), 120-123.
- O'Brien, T. G., Megosh, L. C., Gilliard, G., & Soler, A. P. (1997). Ornithine decarboxylase overexpression is a sufficient condition for tumor promotion in mouse skin. *Cancer Research*, 57(13), 2630-2637.
- Olin-Sandoval, V., Yu, J. S. L., Miller-Fleming, L., Alam, M. T., Kamrad, S., Correia-Melo, C., ... & Ralser, M. (2019). Lysine harvesting is an antioxidant strategy and triggers underground polyamine metabolism. *Nature*, 572(7768), 249-253.
- Origanti, S., & Shantz, L. M. (2007). Ras transformation of RIE-1 cells activates cap-independent translation of ornithine decarboxylase: regulation by the Raf/MEK/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Cancer Research*, 67(10), 4834-4842.
- Osterman, A. L., Kinch, L. N., Grishin, N. V., & Phillips, M. A. (1995). Acidic residues important for substrate binding and cofactor reactivity in eukaryotic ornithine decarboxylase identified by alanine scanning mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 270(20), 11797-11802.

- Ouameur, A. A., Bourassa, P., & Tajmir-Riahi, H. A. (2010). Probing tRNA interaction with biogenic polyamines. *Rna*, 16(10), 1968-1979.
- Ouameur, A. A., & Tajmir-Riahi, H. A. (2004). Structural analysis of DNA interactions with biogenic polyamines and cobalt (III) hexamine studied by Fourier transform infrared and capillary electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 42041-42054.
- Ozfiliz, P., Kizilboga, T., Demir, S., Alkurt, G., Palavan-Unsal, N., Arisan, E. D., & Dinler-Doganay, G. (2015). Bag-1 promotes cell survival through c-Myc-mediated ODC upregulation that is not preferred under apoptotic stimuli in MCF-7 cells. *Cell biochemistry and function*, 33(5), 293-307.
- Packham, G., & Cleveland, J. L. (1997). Induction of ornithine decarboxylase by IL-3 is mediated by sequential c-Myc-independent and c-Myc-dependent pathways. *Oncogene*, 15(10), 1219-1232.
- Park, M. G., Kim, S. Y., & Lee, C. J. (2023). DMSO-tolerant ornithine decarboxylase (ODC) tandem assay optimized for high-throughput screening. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 38(1), 309-318.
- Park, M. H., Cooper, H. L., & Folk, J. E. (1982). The biosynthesis of protein-bound hypusine (N epsilon-(4-amino-2-hydroxybutyl) lysine). Lysine as the amino acid precursor and the intermediate role of deoxyhypusine (N epsilon-(4-aminobutyl) lysine). *Journal of Biological Chemistry*, 257(12), 7217-7222.
- Park, M. H., & Igarashi, K. (2013). Polyamines and their metabolites as diagnostic markers of human diseases. *Biomolecules & therapeutics*, 21(1), 1.
- Park, M. H., Nishimura, K., Zanelli, C. F., & Valentini, S. R. (2010). Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino acids*, 38, 491-500.
- Paz, E. A., Garcia-Huidobro, J., & Ignatenko, N. A. (2011). Polyamines in cancer. *Advances in clinical chemistry*, 54, 45-70.
- Pegg, A. E. (1986). Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochemical Journal*, 234(2), 249.

- Pegg, A. E. (1988). Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. *Cancer research*, 48(4), 759-774.
- Pegg, A. E. (2006). Regulation of ornithine decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(21), 14529-14532.
- Pegg, A. E. (2009). Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB life*, 61(9), 880-894.
- Pegg, A. E. (2016). Functions of polyamines in mammals. *Journal of Biological Chemistry*, 291(29), 14904-14912.
- Pegg, A. E., & McGill, S. (1979). Decarboxylation of ornithine and lysine in rat tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 568(2), 416-427.
- Pegg, A. E., McGovern, K. A., & Wiest, L. (1987). Decarboxylation of  $\alpha$ -difluoromethylornithine by ornithine decarboxylase. *Biochemical Journal*, 241(1), 305-307.
- Pegg, A. E., Shantz, L. M., & Coleman, C. S. (1995). Ornithine decarboxylase as a target for chemoprevention. *Journal of Cellular Biochemistry*, 59(S22), 132-138.
- Pegg, A. E., Tang, K. C. C., & Coward, J. K. (1982). Effects of S-adenosyl-1, 8-diamino-3-thiooctane on polyamine metabolism. *Biochemistry*, 21(20), 5082-5089.
- Pegg, A. E., & Williams-Ashman, H. G. (1968). Biosynthesis of putrescine in the prostate gland of the rat. *Biochemical Journal*, 108(4), 533.
- Pena, A., Reddy, C. D., Wu, S., Hickok, N. J., Reddy, E. P., Yumet, G., ... & Soprano, K. J. (1993). Regulation of human ornithine decarboxylase expression by the c-Myc. Max protein complex. *Journal of Biological Chemistry*, 268(36), 27277-27285.
- Pendeville, H., Carpino, N., Marine, J. C., Takahashi, Y., Muller, M., Martial, J. A., & Cleveland, J. L. (2001). The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development. *Molecular and cellular biology*, 21(19), 6549-6558.
- Persson, L., Wallström, E. L., Nasizadeh, S., Dartsch, C., Jeppsson, A., Wendt, A., & Holmgren, J. (1998). Regulation of mammalian ornithine decarboxylase. *Biochemical Society Transactions*, 26(4), 575-579.

- Peters, M. C., Minton, A., Phanstiel IV, O., & Gilmour, S. K. (2018). A novel polyamine-targeted therapy for BRAF mutant melanoma tumors. *Medical Sciences*, 6(1), 3.
- Polyak, K., Lee, M. H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P., & Massagué, J. (1994). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, 78(1), 59-66.
- Poulin, R., Lu, L., Ackermann, B., Bey, P., & Pegg, A. E. (1992). Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by alpha-difluoromethylornithine. Characterization of sequences at the inhibitor and coenzyme binding sites. *Journal of Biological Chemistry*, 267(1), 150-158.
- Poulin, R., Secrist 3rd, J. A., & Pegg, A. E. (1989). Effect of 1-amino-oxy-3-aminopropane on polyamine metabolism and growth of L1210 cells. *Biochemical Journal*, 263(1), 215-221.
- Priotto, G., Kasparian, S., Mutombo, W., Ngouama, D., Ghorashian, S., Arnold, U., ... & Kande, V. (2009). Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *The Lancet*, 374(9683), 56-64.
- Proietti, E., Rossini, S., Grohmann, U., & Mondanelli, G. (2020). Polyamines and kynurenes at the intersection of immune modulation. *Trends in immunology*, 41(11), 1037-1050.
- Pyronnet, S., Pradayrol, L., & Sonenberg, N. (2000). A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Molecular cell*, 5(4), 607-616.
- Qin, C., Samudio, I., Ngwenya, S., & Safe, S. (2004). Estrogen-dependent regulation of ornithine decarboxylase in breast cancer cells through activation of nongenomic cAMP-dependent pathways. *Molecular Carcinogenesis*: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center, 40(3), 160-170.
- Qiu, S., Liu, J., & Xing, F. (2017). Antizyme inhibitor 1: a potential carcinogenic molecule. *Cancer Science*, 108(2), 163-169.
- Qu, N., Ignatenko, N. A., Yamauchi, P., Stringer, D. E., Levenson, C., Shannon, P., ... & Gerner, E. W. (2003). Inhibition of human ornithine decarboxylase activity by enantiomers of difluoromethylornithine. *Biochemical journal*, 375(2), 465-470.

- Radford, D. M., Nakai, H., Eddy, R. L., Haley, L. L., Byers, M. G., Henry, W. M., ... & Shows, T. B. (1990). Two chromosomal locations for human ornithine decarboxylase gene sequences and elevated expression in colorectal neoplasia. *Cancer Research*, 50(19), 6146-6153.
- Rao, J. N., Xiao, L., & Wang, J. Y. (2020). Polyamines in gut epithelial renewal and barrier function. *Physiology*, 35(5), 328-337.
- Ray, R. M., Zimmerman, B. J., McCormack, S. A., Patel, T. B., & Johnson, L. R. (1999). Polyamine depletion arrests cell cycle and induces inhibitors p21Waf1/Cip1, p27Kip1, and p53 in IEC-6 cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 276(3), C684-C691.
- Rhee, H. J., Kim, E. J., & Lee, J. (2007). Physiological polyamines: simple primordial stress molecules. *Journal of cellular and molecular medicine*, 11(4), 685-703.
- Rickman, D. S., Schulte, J. H., & Eilers, M. (2018). The expanding world of N-MYC-driven tumors. *Cancer discovery*, 8(2), 150-163.
- Rider, J. E., Hacker, A., Mackintosh, C. A., Pegg, A. E., Woster, P. M., & Casero, R. A. (2007). Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amino acids*, 33(2), 231-240.
- Russell, D. (1980). Ornithine decarboxylase as a biological and pharmacological tool. *Pharmacology*, 20(3), 117-129.
- Russell, D., & Snyder, S. H. (1968). Amine synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 60(4), 1420-1427.
- Sacitharan, P. K., Lwin, S., Gharios, G. B., & Edwards, J. R. (2018). Spermidine restores dysregulated autophagy and polyamine synthesis in aged and osteoarthritic chondrocytes via EP300. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(9), 1-10.
- Sagar, N. A., Tarafdar, S., Agarwal, S., Tarafdar, A., & Sharma, S. (2021). Polyamines: functions, metabolism, and role in human disease management. *Medical Sciences*, 9(2), 44.

- Sala-Rabanal, M., Li, D. C., Dake, G. R., Kurata, H. T., Inyushin, M., Skatchkov, S. N., & Nichols, C. G. (2013). Polyamine transport by the polyspecific organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3. *Molecular pharmaceutics*, 10(4), 1450-1458.
- Sandmeier, E., Hale, T. I., & Christen, P. (1994). Multiple evolutionary origin of pyridoxal-5'-phosphate-dependent amino acid decarboxylases. *European journal of biochemistry*, 221(3), 997-1002.
- Sari, I. N., Setiawan, T., Kim, K. S., Wijaya, Y. T., Cho, K. W., & Kwon, H. Y. (2021). Metabolism and function of polyamines in cancer progression. *Cancer Letters*, 519, 91-104.
- Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2), 368-379.
- Schipper, R. G., Cuijpers, V. M., De Groot, L. H., Thio, M., & Verhofstad, A. A. (2004). Intracellular localization of ornithine decarboxylase and its regulatory protein, antizyme-1. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(10), 1259-1266.
- Schipper, R. G., Penning, L. C., & Verhofstad, A. A. (2000). Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors?. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 10, No. 1, pp. 55-68). Academic Press.
- Schwartz, B., Hittelman, A., Daneshvar, L., Basu, H. S., Marton, L. J., & Feuerstein, B. (1995). A new model for disruption of the ornithine decarboxylase gene, SPE1, in *Saccharomyces cerevisiae* exhibits growth arrest and genetic instability at the MAT locus. *Biochemical Journal*, 312(1), 83-90.
- Seiler, N. (2003). Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 1. Selective enzyme inhibitors. *Current drug targets*, 4(7), 537-564.
- Shantz, L. M. (2004). Transcriptional and translational control of ornithine decarboxylase during Ras transformation. *Biochemical Journal*, 377(1), 257-264.
- Shantz, L. M., Hu, R. H., & Pegg, A. E. (1996). Regulation of ornithine decarboxylase in a transformed cell line that overexpresses translation initiation factor eIF-4E. *Cancer Research*, 56(14), 3265-3269.

- Shantz, L. M., & Levin, V. A. (2007). Regulation of ornithine decarboxylase during oncogenic transformation: mechanisms and therapeutic potential. *Amino acids*, 33, 213-223.
- Shantz, L. M., & Pegg, A. E. (1998). Ornithine decarboxylase induction in transformation by H-Ras and RhoA. *Cancer research*, 58(13), 2748-2753.
- Shantz, L. M., & Pegg, A. E. (1999). Translational regulation of ornithine decarboxylase and other enzymes of the polyamine pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 31(1), 107-122.
- Shimogori, T., Kashiwagi, K., & Igarashi, K. (1996). Spermidine regulation of protein synthesis at the level of initiation complex formation of Met-tRNA<sub>i</sub>, mRNA and ribosomes. *Biochemical and biophysical research communications*, 223(3), 544-548.
- Shi, Y., Mowery, R. A., Ashley, J., Hentz, M., Ramirez, A. J., Bilgicer, B., ... & Shaw, B. F. (2012). Abnormal SDS-PAGE migration of cytosolic proteins can identify domains and mechanisms that control surfactant binding. *Protein Science*, 21(8), 1197-1209.
- Sholler, G. L. S., Ferguson, W., Bergendahl, G., Bond, J. P., Neville, K., Eslin, D., ... & Kraveka, J. M. (2018). Maintenance DFMO increases survival in high risk neuroblastoma. *Scientific reports*, 8(1), 14445.
- Sivashanmugam, M., Jaidev, J., Umashankar, V., & Sulochana, K. N. (2017). Ornithine and its role in metabolic diseases: An appraisal. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86, 185-194.
- Smith, K. J., & Skelton, H. (2006).  $\alpha$ -Difluoromethylornithine, a polyamine inhibitor: its potential role in controlling hair growth and in cancer treatment and chemoprevention. *International journal of dermatology*, 45(4), 337-344.
- Soda, K. (2011). The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30, 1-9.
- Solano, F., Penafiel, R., Solano, M. E., & Lozano, J. A. (1985). Equilibrium between active and inactive forms of rat liver ornithine decarboxylase mediated by L-ornithine and salts. *FEBS letters*, 190(2), 324-328.

- Soulet, D., Covassin, L., Kaouass, M., Charest-Gaudreault, R., Audette, M., & Poulin, R. (2002). Role of endocytosis in the internalization of spermidine-C2-BODIPY, a highly fluorescent probe of polyamine transport. *Biochemical Journal*, 367(2), 347-357.
- Soulet, D., Gagnon, B., Rivest, S., Audette, M., & Poulin, R. (2004). A fluorescent probe of polyamine transport accumulates into intracellular acidic vesicles via a two-step mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49355-49366.
- Stanek, J., Frei, J., Mett, H., Schneider, P., & Regenass, U. (1992). 2-Substituted 3-(aminooxy) propanamines as inhibitors of ornithine decarboxylase: synthesis and biological activity. *Journal of medicinal chemistry*, 35(8), 1339-1344.
- Su, X. D., Zhang, H., Terwilliger, T. C., Liljas, A., Xiao, J., & Dong, Y. (2015). Protein crystallography from the perspective of technology developments. *Crystallography reviews*, 21(1-2), 122-153.
- Tabor, C. W., & Tabor, H. (1976). 1, 4-Diaminobutane (putrescine), spermidine, and spermine. *Annual review of biochemistry*, 45(1), 285-306.
- Takano, T., Takigawa, M., & Suzuki, F. (1983). Role of polyamines in expression of the differentiated phenotype of chondrocytes: effect of DL- $\alpha$ -hydrazino- $\delta$ -aminovaleric acid (DL-HAVA), an inhibitor of ornithine decarboxylase, on chondrocytes treated with parathyroid hormone. *The Journal of Biochemistry*, 93(2), 591-598.
- Terui, Y., Sakamoto, A., Yoshida, T., Kasahara, T., Tomitori, H., Higashi, K., ... & Kashiwagi, K. (2015). Polyamine stimulation of eEF1A synthesis based on the unusual position of a complementary sequence to 18S rRNA in eEF1A mRNA. *Amino Acids*, 47, 345-356.
- ThermoFisher. (2023). thermofisher. Consultado el 2 de junio de 2023, de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/competent-cells-strains/top10-competent-cells.html>
- Thomas, T., & Thomas, T. J. (2001). Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58, 244-258.



- Tkachenko, A. G., & Nesterova, L. Y. (2003). Polyamines as modulators of gene expression under oxidative stress in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Moscow)*, 68, 850-856.
- Tomar, P. C., Lakra, N., & Mishra, S. N. (2013). Cadaverine: a lysine catabolite involved in plant growth and development. *Plant signaling & behavior*, 8(10), e25850.
- Uemura, T., Higashi, K., Takigawa, M., Toida, T., Kashiwagi, K., & Igarashi, K. (2009). Polyamine modulon in yeast—stimulation of COX4 synthesis by spermidine at the level of translation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(12), 2538-2545.
- Uemura, T., Stringer, D. E., Blohm-Mangone, K. A., & Gerner, E. W. (2010). Polyamine transport is mediated by both endocytic and solute carrier transport mechanisms in the gastrointestinal tract. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(2), G517-G522.
- Vargas-Ramírez, A. L., Medina-Enríquez, M. M., Cordero-Rodríguez, N. I., Ruiz-Cuello, T., Aguilar-Faisal, L., Trujillo-Ferrara, J. G., ... & Rodríguez-Páez, L. (2016). N- $\omega$ -chloroacetyl-L-ornithine has in-vitro activity against cancer cell lines and in-vivo activity against ascitic and solid tumors. *Anti-Cancer Drugs*, 27(6), 508-518.
- Vincent, I. M., Creek, D., Watson, D. G., Kamleh, M. A., Woods, D. J., Wong, P. E., ... & Barrett, M. P. (2010). A molecular mechanism for eflornithine resistance in African trypanosomes. *PLoS pathogens*, 6(11), e1001204.
- Vekilov, P. G., & Chernov, A. A. (2003). The physics of protein crystallization. In *Solid State Physics* (Vol. 57, pp. 1-147). Academic Press.
- Wallace, H. M. (1996). Polyamines in human health. *Proceedings of the Nutrition Society*, 55(1B), 419-431.
- Wallace, H. M., & Fraser, A. V. (2004). Inhibitors of polyamine metabolism. *Amino acids*, 26, 353-365.
- Wang, C. C. (1991). A novel suicide inhibitor strategy for antiparasitic drug development. *Journal of cellular biochemistry*, 45(1), 49-53.

- Wang, X., Ying, W., Dunlap, K. A., Lin, G., Satterfield, M. C., Burghardt, R. C., ... & Bazer, F. W. (2014). Arginine decarboxylase and agmatinase: an alternative pathway for de novo biosynthesis of polyamines for development of mammalian conceptuses. *Biology of Reproduction*, 90(4), 84-1.
- Watanabe, S. I., Kusama-Eguchi, K., Kobayashi, H., & Igarashi, K. (1991). Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 266(31), 20803-20809.
- Weeks, R. S., Vanderwerf, S. M., Carlson, C. L., Burns, M. R., O'Day, C. L., Cai, F., ... & Webb, H. K. (2000). Novel Lysine–Spermine Conjugate Inhibits Polyamine Transport and Inhibits Cell Growth When Given with DFMO. *Experimental cell research*, 261(1), 293-302.
- Weicht, R. R., Schultz, C. R., Geerts, D., Uhl, K. L., & Bachmann, A. S. (2018). Polyamine biosynthetic pathway as a drug target for osteosarcoma therapy. *Medical sciences*, 6(3), 65.
- Weisell, J., T Hyvonen, M., Alhonen, L., Vepsalainen, J., A Keinanen, T., & R Khomutov, A. (2014). Charge deficient analogues of the natural polyamines. *Current Pharmaceutical Design*, 20(2), 262-277.
- Whitney, P. A., & Morris, D. R. (1978). Polyamine auxotrophs of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 134(1), 214-220.
- Williams-Ashman, H. G., & Canellakis, Z. N. (1979). Polyamines in mammalian biology and medicine. *Perspectives in Biology and Medicine*, 22(3), 421-453.
- Wu, H. Y., Chen, S. F., Hsieh, J. Y., Chou, F., Wang, Y. H., Lin, W. T., ... & Chan, N. L. (2015). Structural basis of antizyme-mediated regulation of polyamine homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11229-11234.
- Xu, L., Long, J., Wang, P., Liu, K., Mai, L., & Guo, Y. (2015). Association between the ornithine decarboxylase G316A polymorphism and breast cancer survival. *Oncology Letters*, 10(1), 485-491.
- Yuan, Q., Ray, R. M., Viar, M. J., & Johnson, L. R. (2001). Polyamine regulation of ornithine decarboxylase and its antizyme in intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(1), G130-G138.

- 
- Zhang, M., Pickart, C. M., & Coffino, P. (2003). Determinants of proteasome recognition of ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate. *The EMBO journal*, 22(7), 1488-1496.
- Zhao, B., & Butler, A. P. (2001). Core promoter involvement in the induction of rat ornithine decarboxylase by phorbol esters. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 32(2), 92-99.
- Zhou, X. E., Suino-Powell, K., Schultz, C. R., Aleiwi, B., Brunzelle, J. S., Lamp, J., ... & Melcher, K. (2021). Structural basis of binding and inhibition of ornithine decarboxylase by 1-amino-oxy-3-aminopropane. *Biochemical Journal*, 478(23), 4137-4149.
- Zhou, X. E., Schultz, C. R., Suino Powell, K., Henrickson, A., Lamp, J., Brunzelle, J. S., ... & Melcher, K. (2022). Structure and enzymatic activity of an intellectual disability-associated ornithine decarboxylase variant, g84r. *ACS omega*, 7(38), 34665-34675.
- Zhu, M. Y., Iyo, A., Piletz, J. E., & Regunathan, S. (2004). Expression of human arginine decarboxylase, the biosynthetic enzyme for agmatine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1670(2), 156-164.
- Zou, T., Rao, J. N., Liu, L., Xiao, L., Yu, T. X., Jiang, P., ... & Wang, J. Y. (2010). Polyamines regulate the stability of JunD mRNA by modulating the competitive binding of its 3' untranslated region to HuR and AUF1. *Molecular and Cellular Biology*, 30(21), 5021-5032.