

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



Maestría en Ciencias en Nanociencias

**Expresión y purificación del citocromo P450_{BM3} con el dominio
reductasa de *Bacillus megaterium* para la activación de
profármacos**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Carlos Alejandro Medrano Villagómez

Ensenada, Baja California, México

2020

Tesis defendida por

Carlos Alejandro Medrano Villagómez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Andrés Zarate Romero
Codirector de tesis

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Codirector de tesis

Dr. Alejandro Huerta Saquero

Dra. Carolina Álvarez Delgado

Dra. Marcela Ayala Aceves



Dr. Sergio Fuentes Moyado
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Carlos Alejandro Medrano Villagómez © 2020

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Carlos Alejandro Medrano Villagómez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Expresión y purificación del citocromo P450_{BM3} con el dominio reductasa de *Bacillus megaterium* para la activación de profármacos.

Resumen en español aprobado por:

Dr. Andrés Zarate Romero
Codirector de tesis

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Codirector de tesis

La utilización de estructuras nanométricas en el área médica ha tomado fuerza en los últimos años. Dentro de este contexto, las nanopartículas proteínicas derivadas de virus (VLP's) han sido empleadas ampliamente como vehículos para la entrega intracelular de DNA, RNA, fármacos y proteínas. Una de las patologías con mayor impacto social actualmente y apta para ser tratada con sistemas nanométricos, es el cáncer de mama. Desde 1980, el tamoxifeno es el principal fármaco para el tratamiento de cáncer de mama. Sin embargo, la efectividad de este profármaco se ve abatido por la disminución de la concentración de enzimas que lo activan en el tejido tumoral. Estas enzimas principalmente pertenecen a la familia de los citocromos P450 (CYP). Por lo que el diseño y caracterización de sistemas de entrega basados en bionanorretores ensamblados a partir de VLP's y una enzima CYP, es una propuesta para aumentar la eficiencia de oxidación de profármacos anticancerígenos. En este proyecto se llevó a cabo la expresión y purificación CYP_{BM3} dependiente de NADPH, para la oxidación de profármacos como el tamoxifeno de manera intracelular y proponer el diseño de una nanorreator con posible potencial terapéutico.

Palabras clave: VLP's, CYP, tamoxifeno, NADPH.

Abstract of the thesis presented **Carlos Alejandro Medrano Villagómez** as a partial requirement to obtain the Master of Science in Nanoscience

Expression and purification of cytochrome P450_{BM3} with the *Bacillus megaterium* reductase domain for prodrug activation.

Abstract approved by:

Dr. Andrés Zarate Romero
Codirector de tesis

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Codirector de tesis

The use of nanometric structures in the biomedical field has strongly increased in the last years. Among them, the protein-based nanoparticles from virus or virus-like particles (VLP's) have been widely used as nanocarriers for cell delivery of DNA, RNA, drugs and proteins. Breast cancer is an illness with high social impact that can be treated with nanometric systems. Since 1980, tamoxifen is the major drug for the breast cancer treatment, however, its efficiency is reduced by the low concentration of activating enzymes in the tumor tissue. These enzymes mainly belong to the cytochrome P450 family (CYP). Thus, the design and characterization of delivery systems based on VLP's containing CYP activity, as enzymatic nanoreactors, to increase the activation efficiency of prodrugs for cancer treatment is proposed. In this work the expression and purification of CYP_{BM3} using NADPH as source of electrons for the oxidation of prodrugs such as tamoxifen has been carried out, in order to design a nanoreactor with potential biomedical applications.

Keywords: VLP's, CYP, tamoxifen, NADPH.

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada especialmente a mi núcleo familiar, a mis padres y a mi hermana, quienes nunca han dejado de darme su apoyo incondicional.

A todas aquellas personas que me han impulsado a seguir mis sueños y mis metas.

Y una dedicatoria especial mi yo del futuro que espero este realizando todos sus sueños y también a mi yo del pasado, que gracias a todos sus esfuerzos estamos en haciendo esta tesis.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Rafael por confiar en mí y aceptarme para hacer la maestría bajo su dirección.

Al Dr. Andrés Zarate, ya que, sin él, esta tesis no sería lo que es, agradezco su apoyo incondicional como director, colega y amigo.

A los tóxicos, que gracias a ellos me mantengo cuerdo en toda esta aventura llamada maestría.

A todos los integrantes del departamento de bionanotecnología, quienes siempre han sido un gran apoyo académico.

También es importante agradecer todas esas amistades que se han formado, entre las cuales se destacan mi amistad la M. A. Itandehui Betanzo Gutiérrez, el Dr. Oscar Davis Gonzales y la Dra. Ana Guadalupe Rodríguez Hernández.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento con los proyectos CB-251241 y IFC-1. Agradezco la asistencia técnica de la Dra. Katrin Quester y de la M. A. Itandehui Betanzo Gutiérrez.

Agradezco al CICESE por sus servicios, por haberme aceptado y ser parte de su programa de posgrado, así como por sus instalaciones y su personal académico y administrativo.

Tabla de contenido

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Cáncer en la salud pública.....	1
1.1.2 Citocromo P450	5
1.3 Sistemas terapéuticos nanométricos	12
1.2 Justificación.....	13
1.3 Hipótesis	14
1.4 Objetivos.....	14
1.4.1 Objetivo general	14
1.4.2 Objetivos específicos	14
Capítulo 2. Metodología.....	15
2.1 Construcciones de CYPR _{BM3}	15
2.2 Transformación genética	15
2.3 Expresión de las mutantes de CYPR _{BM3}	15
2.4 Expresión de CYPR _{BM3} en presencia de proteínas chaperonas.	16
2.5 Purificación de las mutantes de CYPR _{BM3}	17
2.6 Actividad enzimática de las mutantes de CYP dependiente de NADPH (CYPR).....	18
2.7 Estudio in silico del perfil inmunológico de las cápsides de la familia bromovirus.....	19
Capítulo 3. Resultados.....	20
3.1 Corroboración de construcciones	20
3.2 Resistencia a antibiótico	20
3.3 Evaluación cualitativa del nivel de expresión	22
3.4 Evaluación de la actividad catalítica	22
3.5 Expresión heteróloga en presencia de proteínas chaperonas.....	25

3.6 Incorporación de riboflavina en el protocolo de expresión.....	27
3.7 Purificación de CYP _{BM3}	29
3.7.1 Precipitación con sulfato de amonio	29
3.7.2 Cromatografía por Intercambio aniónico	30
3.7.3 Cromatografía por exclusión molecular.....	31
3.8 Actividad enzimática	32
3.8.1 Evaluación de concentración de NADPH.	33
3.8.2 Cinética de saturación	34
3.8.3 Degradación de tamoxifeno.....	35
3.9 Análisis in silico del perfil inmunológico de las cápsides virales.	37
Capítulo 4. Discusión.....	41
Capítulo 5. Conclusiones	46
Literatura citada	48

Lista de figuras

Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer.....	3
Figura 2. Posicionamiento de tamoxifeno en el receptor de estrógenos α . R.....	4
Figura 3. Transformación del tamoxifeno.....	6
Figura 4. Representación del grupo prostético de las enzimas tipo CYP.....	7
Figura 5. Mecanismo esquematizado de CYP_{BM3}	8
Figura 6. Mecanismo propuesto para la transferencia de electrones.....	9
Figura 7. Representación proporcional de la expresión de CYP.....	10
Figura 8. Modelado in silico de VLP's.....	13
Figura 9. Linealización de plásmidos.....	21
Figura 10. Cuantificación cualitativa de la expresión.....	23
Figura 11. Evaluación de la actividad enzimática a tiempo final.....	24
Figura 12. Actividad enzimática en presencia de proteínas chaperonas.....	26
Figura 13. Análisis electroforético de la expresión heteróloga en presencia de proteínas chaperonas....	27
Figura 14. Evaluación de la incorporación de Riboflavina..	28
Figura 15. Resultados de la precipitación con sulfato de amonio.....	30
Figura 16. Perfil proteínico resultante de cromatografía de intercambio aniónico.....	31
Figura 17. Perfil electroforético resultante de la cromatografía exclusion molecular.....	32
Figura 18. Cinética de formación de producto en función de la concentración de NADPH.....	33
Figura 19. Gráfica de Lineweaver–Burk de la enzima CYP_{BM3} con el sustrato 2,6-DMF.....	35
Figura 20. Disminución de la concentración de Tamoxifeno.....	36
Figura 21. Identificación de secuencias con potencial inmunogénico.....	38
Figura 22. Localización física de las secuencias inmunogénicas.....	39
Figura 23. Diseño propuesto para un nanoreactor activador de Tamoxifeno.....	40

Lista de tablas

Tabla 1. Agrupamiento de CYP según sustrato que catalizan.....	11
Tabla 2 Eficiencia de transformación genética.....	21
Tabla 3. Constantes cinéticas de las enzimas tipo CYP.....	34
Tabla 4. Degradación de tamoxifeno.....	35
Tabla 5. Identificación de secuencias con un perfil inmunogénico.....	38

Capítulo 1. Introducción

En las últimas décadas, el cáncer se ha convertido en un serio problema de salud pública debido a sus altas tasas de incidencia y mortalidad anuales (Rodríguez et al., 2014). En el 2018 a nivel mundial y nacional, el cáncer de mama fue el más frecuente a pesar de presentar la mayor tasa de prevalencia a 5 años (Bray et al., 2018), esto se debe al avance que se tiene en el desarrollo de terapias y fármacos para controlar esta patología, por ejemplo, el uso de tamoxifeno.

El tamoxifeno al ser un profármaco, es dependiente de un grupo de enzimas denominadas CYP que se encargan de su metabolización para generar compuestos aún más efectivos contra las células tumorales, sin embargo, la presencia de estas enzimas se ve disminuida por las modificaciones genéticas que se generan en el proceso de carcinogénesis (Hoskins et al., 2009), por lo que se plantea la propuesta de crear un sistema nanométrico para la entrega de este tipo de enzima a nivel intracelular.

En años anteriores, los esfuerzos para generar un sistema de entrega de enzimas CYP han sido potenciados y se ha planteado el confinamiento de CYP en VLP's de origen vegetal, dando lugar a varios trabajos en los que utilizan el dominio catalítico de una CYP de *Bacillus megaterium* (CYP_{BM3}); la cual es un modelo para el estudio de la encapsidación de CYP. Esta enzima ha sido encapsidada en VLP's derivadas de virus de plantas y del bacteriófago P22 (Chauhan et al., 2018; Sánchez-Sánchez et al., 2014, 2015; Tapia-Moreno, Juárez-Moreno, González-Davis, Cadena-Nava, & Vazquez-Duhalt, 2017), desafortunadamente al solo confinar el sitio catalítico, el sistema es dependiente de peróxido de hidrogeno que debe ser suministrado de manera independiente, haciendo que este sistema no sea apto en aplicaciones médicas. Por lo anterior, en este trabajo se plantea la producción y purificación del CYP_{BM3} reductasa dependiente de NADPH y proponer el diseño de un nanoreactor basado en una VLP derivada de un virus vegetal, con la finalidad de oxidar profármacos utilizados en terapias anticáncer.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Cáncer en la salud pública

El Instituto Nacional del Cáncer, define al cáncer como el conjunto de enfermedades que presenta como característica común, el crecimiento de células anormales de manera descontrolada.

Desafortunadamente aún se desconocen las razones por las cuales esta patología se genera en un órgano o tejido (Rodríguez et al., 2014). Las altas tasas de incidencia y mortalidad que el cáncer presenta anualmente, hacen que el cáncer se considere una problemática para la salud pública.

La incidencia, se define como el número de casos nuevos en un periodo de tiempo establecido; en el 2018 la incidencia global del cáncer fue de 18 000 000, cifra que corresponde al 0.23% de la población mundial. Por otro lado, la mortalidad, se define como el número de muertes asociadas a una patología, para el mismo año el cáncer generó una mortalidad de 9 500 000, equivalente al 0.12% de la población mundial (Bray et al., 2018).

Estos datos estadísticos posicionan al cáncer como la principal patología causante de la morbilidad mundial y es responsable del 13% de las muertes registradas anualmente alrededor del mundo. Se pronostica que para el año 2040, la incidencia mundial de esta enfermedad se acerque a los treinta millones (Bray et al., 2018).

En México la incidencia y la mortalidad del cáncer en el 2018 presentó 191 000 y 83 500 casos respectivamente, lo cual representa el 1.5 % y 0.65 % de la población total de México, haciendo que la República Mexicana ocupe el segundo lugar a nivel Latinoamérica, únicamente por debajo de Brasil (Bray et al., 2018). El gran impacto que esta patología tiene en la población mundial y nacional ha conducido al diseño de tratamientos terapéuticos que concluyan en la erradicación de esta enfermedad.

1.1.1.1. Cáncer de mama

Dentro de todos los tipos de cáncer existentes, el cáncer de mama es el carcinoma con mayor incidencia mundial y nacional (Figura 1). Como se muestra en la figura 1A, a nivel mundial el cáncer de mama presentó una incidencia de 1 810 000 y una mortalidad de 469 000, mientras que en México (Figura 1B) la incidencia fue de 24 700 y la mortalidad de 5 700, con estos datos se establece que el cáncer de mama representa el 10.01 % de los casos de incidencia del cáncer a nivel mundial, mientras que en México representa el 12.96 % (Bray et al., 2018) .

El carcinoma de mama tiene alrededor de 10 subtipos basados en la localización fisiológica del tumor, sin embargo, ya que todos son carcinomas, es decir, derivan de células epiteliales, el tratamiento

puede generalizarse en función a la presencia o ausencia de 3 receptores asociados al desarrollo y crecimiento celular (Subramani et al., 2017), dos de estos son hormonales y el tercero es el receptor del factor de crecimiento humano tipo 2 (HER2).

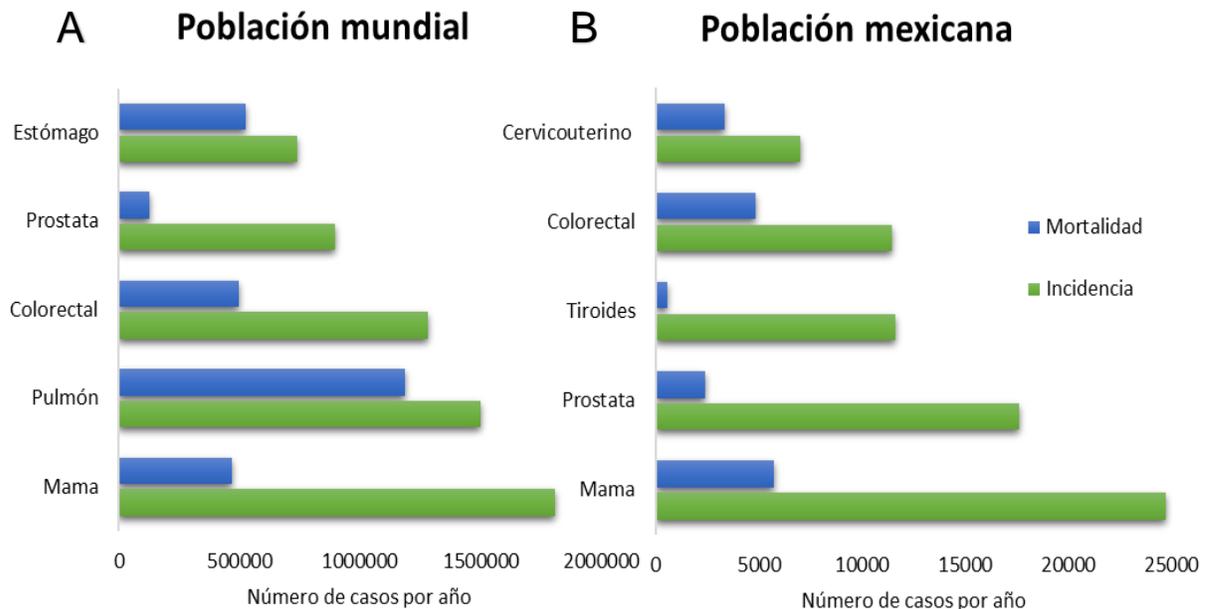


Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer. Estadísticas registradas en el 2018 en un sector de la población de 0 a 74 años para: A) Población mundial; B) Población Mexicana (adaptado de Bray et al., 2018).

En caso de que los dos receptores hormonales: el receptor de estrógeno (ER) y el receptor de progesterona (PR), estén sobreexpresados se denomina carcinoma de mama dependiente de hormonas; por otro lado, si el receptor sobreexpresado es el HER2, se denomina carcinoma independiente de hormonas. Es importante mencionar que el carcinoma dependiente de hormonas (ER+ y/o PR+) es el más común y abarca alrededor del 75 % de los casos de cáncer de mama. Este fenotipo está asociado a un cáncer no agresivo (Tsang y Tse, 2019), lo que hace que el cáncer de mama dependiente de hormonas tanto a nivel mundial como nacional, presente la mayor tasa de prevalencia a 5 años, siendo de 6 298 689 casos a nivel mundial y 75 125 casos a nivel nacional (Bray et al., 2018).

Actualmente, se conoce el efecto que las hormonas tienen sobre la transcripción asociada a la proliferación celular, los receptores hormonales han sido un blanco terapéutico para el tratamiento del cáncer. Esto debido a que, al bloquear los receptores hormonales que se encuentran sobreexpresados

tanto en la membrana plasmática como en la región nuclear, la proliferación celular de las células cancerosa será abatida (Levin, 2005).

1.1.1.2 Terapia de bloqueo hormonal

Bajo este fundamento, se planteó la terapia de bloqueo hormonal con fármacos, como el tamoxifeno (TAM), los fármacos que se utilizan son moléculas afines a los receptores hormonales para prevenir que las células de cáncer de mama reciban la estimulación endógena por el estrógeno/progesterona que promueve la proliferación y el desarrollo celular (González Espinoza et al., 2015).

El TAM es un fármaco antiestrógeno proveniente de un esteroide y es reconocido por los receptores a estrógenos presentes en las células del tejido mamario en mujeres con pre y post-menopausia (Irrázaval O, 2011), por lo que se utiliza como bloqueador hormonal (Figura 2). Además, esta molécula es un profármaco, lo que implica que su transformación es dependiente de enzimas endógenas asociadas al metabolismo de xenobióticos.

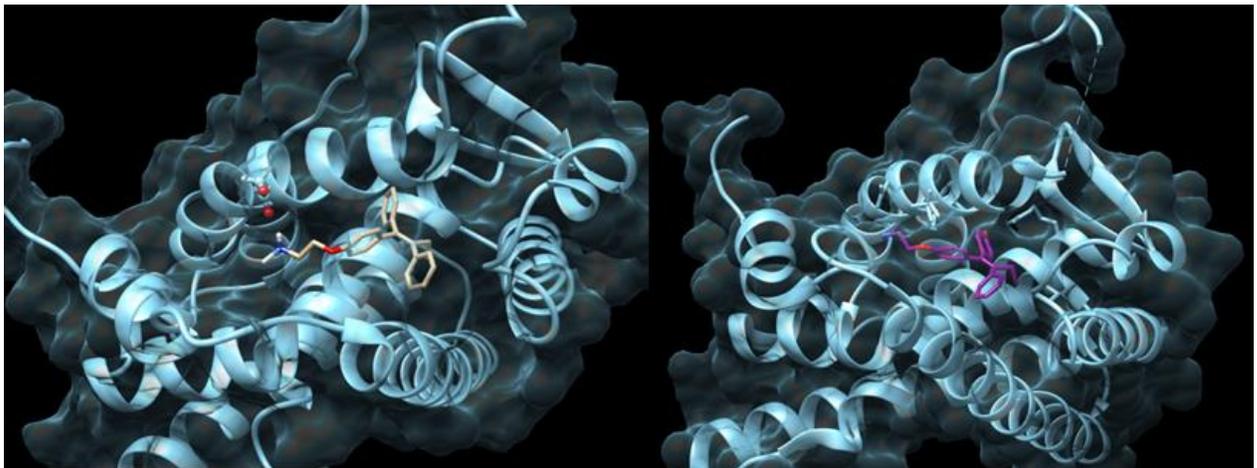


Figura 2. Posicionamiento de tamoxifeno en el receptor de estrógenos α . Resultados del acoplamiento molecular *in silico* de los profármacos en el receptor de estrógenos alfa el cual se ilustra en color cian en ambas imágenes. La molécula de tamoxifeno se visualiza del lado izquierdo de la imagen en color café claro. La molécula de endoxifeno se visualiza del lado derecho de la imagen en color morado.

Los profármacos, son moléculas que no presentan una actividad biológica al ser consumidas, pero al ser metabolizadas por enzimas endógenas producen los compuestos activos terapéuticos (Rautio et al., 2008).

El TAM se ha utilizado para el tratamiento de cáncer ER+ y/o PR+ y al tener una administración sistémica bloquea los receptores hormonales y, adicionalmente, al ser metabolizado se genera una molécula conocida como endoxifeno (END) que funciona con el mismo mecanismo que el TAM, pero esta molécula presenta una mayor afinidad a los receptores de estrógeno α y β ; los productos intermedios de la metabolización del TAM llegan a presentar una afinidad a los receptores de estrógenos 33 veces mayor a la de su precursor (Singh et al., 2011), por lo que en años recientes la regulación negativa de la proliferación celular en cáncer de mama se le adjudica al END y no precisamente al TAM.

Los profármacos, se clasifican en dos grandes familias; los que se encuentran unidos a un mensajero que les permite entrar a través de la membrana celular y ejercer su función de manera intracelular y los bioprofármacos (Hartmann Jornada et al., 2015). Estos últimos, son compuestos orgánicos dependientes de una reacción redox para su activación la cual es catalizada por enzimas intracelulares. Generalmente estas enzimas que metabolizan los bioprofármacos pertenecen a la familia de citocromos P450.

1.1.2 Citocromo P450

El mecanismo por el cual el tamoxifeno es metabolizado y se genera endoxifeno ha sido ampliamente investigado y se conoce que es una reacción catalizada por una amplia cantidad de enzimas tipo CYP (Figura 3). Las CYP en humanos se encuentran en casi todos los tejidos, pero las concentraciones y la expresión de dichas enzimas varían entre estos, siendo el hígado el que contiene la mayor variedad y cantidad de las enzimas CYP, involucradas en la biotransformación de profármacos.

Los citocromos P450 pertenecen a una súper familia enzimática de hemoproteínas y tienen la capacidad de catalizar reacciones de mono-oxigenación que ocurren tanto en eucariontes como en procariontes (Williams et al., 2003).

Estas enzimas están directamente involucradas en la metabolización de compuestos endógenos como esteroides, ácidos grasos o vitaminas liposolubles (vitamina A y vitamina D). Además forman parte

del metabolismo de xenobióticos (agentes químicos ajenos al cuerpo) entre los que se encuentran fármacos, compuestos cancerígenos, pesticidas, alcaloides, etc. (Santiago et al., 2002).

Adicional a lo anterior, las enzimas CYP se encargan de la activación metabólica de hidrocarburos aromáticos policíclicos, como parte del metabolismo de xenobióticos. Es decir, transforman compuestos hidrófobicos a compuestos con un carácter más hidrófilico. Esto ayuda a su secreción y a la desintoxicación del sistema (Shimada y Fujii-Kuriyama, 2004). Esta reacción está ligada directamente a la estructura de la enzima CYP ya que depende del grupo hemo que ésta contiene en la cavidad catalítica.

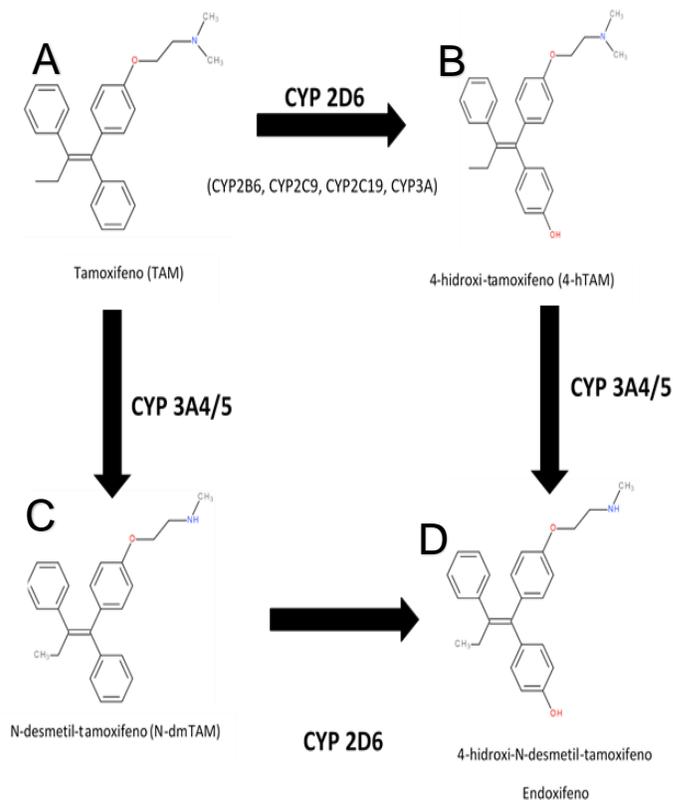


Figura 3. Transformación del tamoxifeno. Esquema de las etapas de la metabolización que sufre el tamoxifeno para la producción de los metabolitos activos involucrados en el efecto anti cancerígeno y las enzimas de la familia CYP involucradas (Singh, Francis, & Michael, 2011).

1.1.2.1 Estructura de CYP

Las enzimas CYP son hemoproteínas que están formadas por alrededor de 500 aminoácidos y un único grupo hemo en la cavidad catalítica. El átomo de Fe^{+3} presente en este grupo prostético (grupo hemo, figura 4A) presenta dos estados de coordinación en el sitio catalítico. Estos estados le dan una

estabilidad electrónica al átomo de Fe^{+3} ; en uno de estos, el átomo se encuentra unido a una molécula de agua estando de forma libre y sin sustrato presente. Por otro lado, cuando el sustrato se une a la enzima el átomo de Fe^{+3} cambia su estado de coordinación, haciendo que la molécula de agua sea desplazada por el sustrato y el átomo de Fe^{+3} salga del plano del anillo hemo (Figura 4B).

Adicional a estas posibilidades, cuando existe la unión directa al átomo de hierro de un inhibidor, al igual que en el caso del sustrato, la molécula de agua es desplazada y se ve favorecido el estado fuera del plano (Figura 4C) (Manikandan y Nagini, 2018).

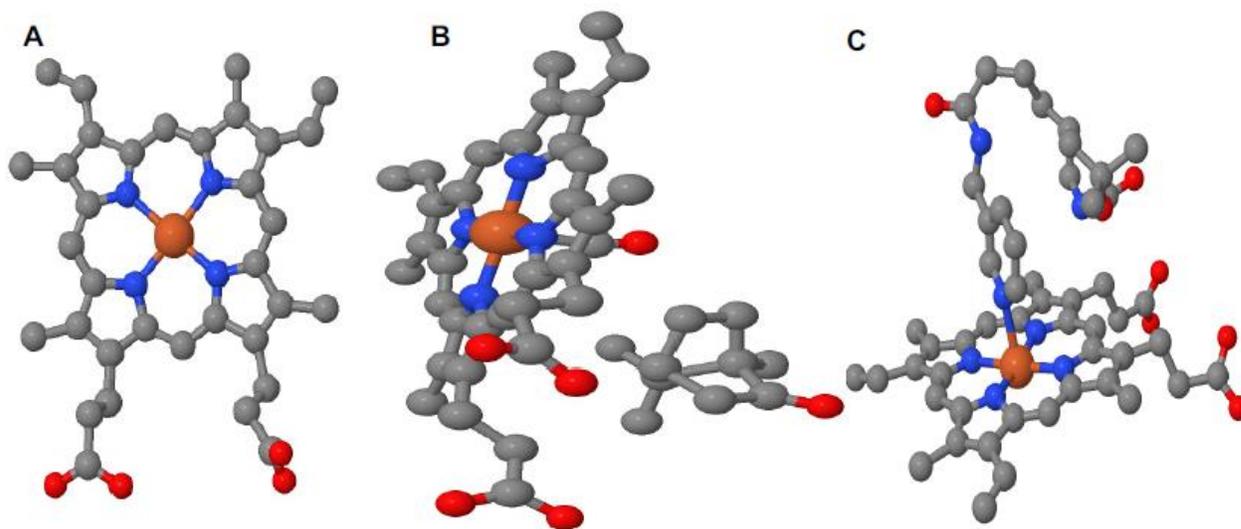
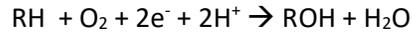


Figura 4. Representación del grupo prostético de las enzimas tipo CYP. Grupo hemo B, átomos de oxígeno en color rojo, átomos de nitrógeno en color azul y átomo de hierro en naranja. A: Grupo hemo libre. B: Grupo hemo activo por la unión de sustrato enzima. C: Grupo hemo unido a un inhibidor. Figura modificada de Manikandan y Nagini, 2018.

1.1.2.2. Reacción catalítica

Conociendo la estructura del grupo prostético en el sitio catalítico de las hemoproteínas CYP, se puede entender la reacción que catalizan. Estas enzimas tienen una gran variedad de sustratos al ser parte de la metabolización de xenobióticos, por lo que diversas reacciones de oxidación y reducción (Hrycay y Bandiera, 2015). De manera general, las reacciones que llevan a cabo las enzimas CYP son reacciones de monooxigenación; esta reacción incorpora un átomo del oxígeno molecular al sustrato, mientras que el átomo restante es reducido a agua (Manikandan y Nagini, 2018), la reacción general se representa de la siguiente manera:



Como se observa en la reacción anterior, es necesario romper el oxígeno molecular lo cual requiere de una gran cantidad de energía, esta energía es suplementada por la transferencia de electrones a partir del NADPH (Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato reducido). Esta transferencia se lleva a cabo a través de un dominio reductasa que requiere de dos cofactores de flavina, estos son flavín mononucleótido (FMN) y flavín dinucleótido (FAD), generando el citocromo P450 reductasa dependiente de NADPH (CYPR_{BM3}) (Figura 5) (Villavicencia-Queijeiro, 2012).

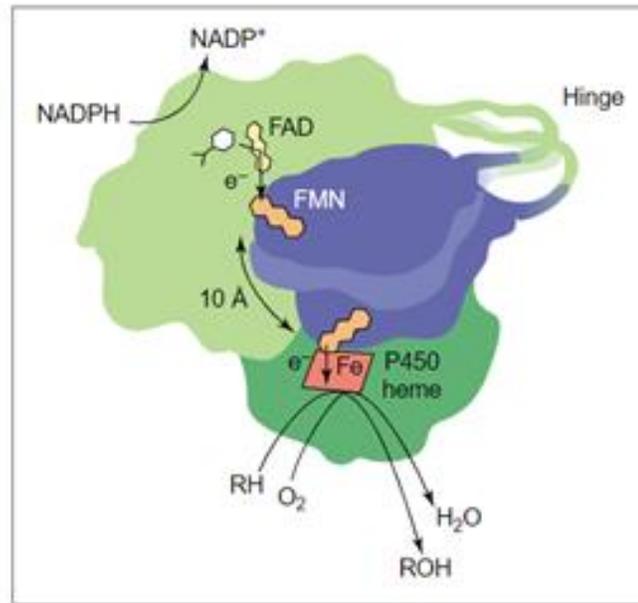


Figura 5. Mecanismo esquematizado de CYPR_{BM3}. El esquema muestra el flujo de electrones a través del dominio reductasa, el cual está formado por dos subdominios, el dominio FMN (azul) y el dominio FAD (verde claro). La ruta de los electrones para llegar al dominio CYP (verde oscuro) es a través de los anillos de los cofactores de riboflavina (anillos naranjas) (figura tomada de Munro et al., 2002).

De manera general la reacción que cataliza la CYPR_{BM3} y el flujo de los electrones es $\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD} \rightarrow \text{FMN} \rightarrow \text{CYP}$. La transferencia de los electrones se realiza en el dominio reductasa y la reacción de monooxigenación se lleva a cabo en el grupo hemo del CYP, (Munro et al., 2002).

El movimiento de electrones es facilitado por una región de enlace entre los dominios FAD y FMN, y facilita la transferencia de electrones (e^-) producidos por la oxidación de NADPH desde el dominio FAD al hemo, todo esto se lleva a cabo en la isoaloxazina. En el grupo hemo, el oxígeno molecular se rompe reductivamente para convertir el sustrato (RH) en un producto hidroxilado (ROH), con la formación de una

molécula de agua a partir del segundo átomo de oxígeno. Todo este mecanismo de reacción se visualiza en la figura 6 (C. Zhang et al., 2019).

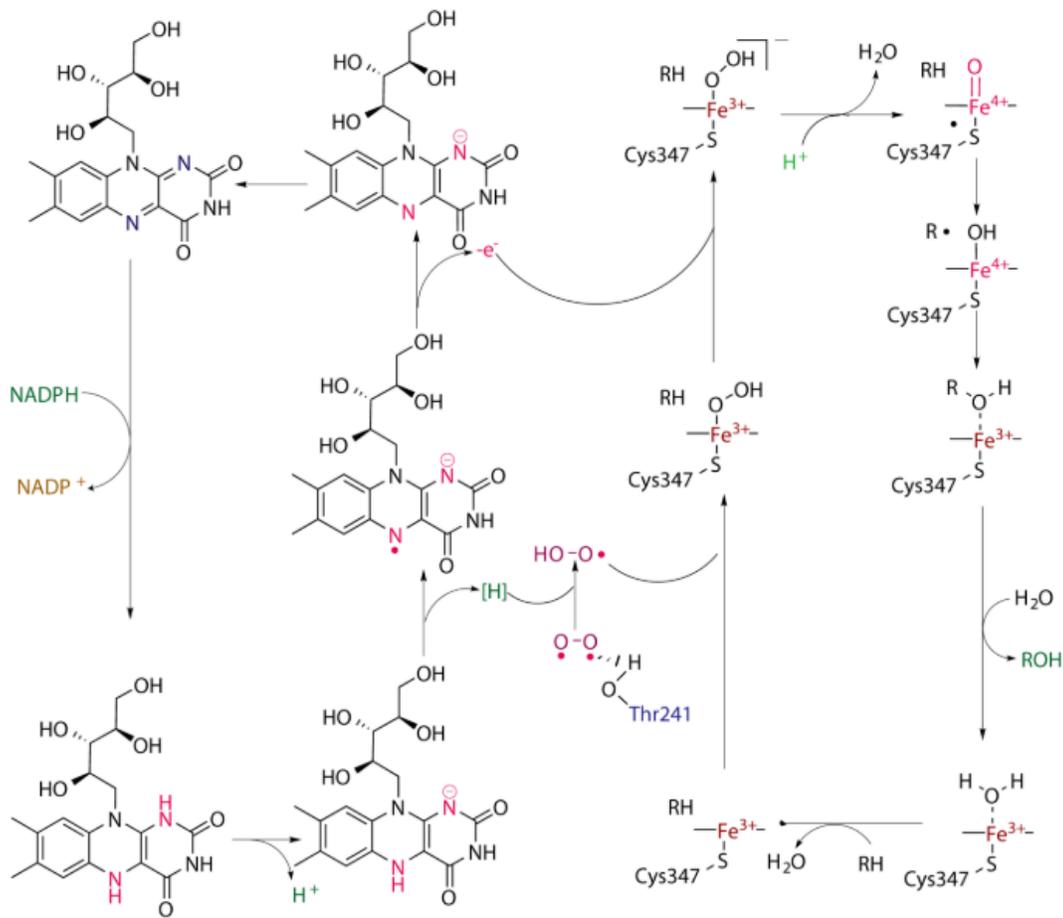


Figura 6. Mecanismo propuesto para la transferencia de electrones. Ruta propuesta por Zhang en 2019, para la transferencia de los electrones en el complejo de la CYPR_{BM3} de los organismos microbianos.

1.1.2.3. Clasificación de CYP

Las enzimas CYP han sido clasificadas bajo distintos parámetros, una de estas clasificaciones tiene base en su función, generando dos grandes grupos, las enzimas CYP encargadas de la desintoxicación de xenobióticos; y las enzimas tipo citocromo encargadas de la biosíntesis de compuestos endógenos (Manikandan y Nagini, 2018).

Por otro lado, la clasificación más común, se basa en la identidad que estas presentan entre sí a nivel genético, de esta manera se obtienen 18 familias y 44 subfamilias. El porcentaje de identidad en cada familia es menor al 40% mientras que para pertenecer a una subfamilia deben de presentar al menos el 55% de identidad.

Esta clasificación tiene un sistema alfanumérico para denotar la clasificación, en primer lugar se usa un numero arábigo para indicar la familia, seguido de una letra para indicar la subfamilia y posterior a este carácter se coloca nuevamente un numero arábigo el cual funciona como indicador único que corresponde con el gen de esta subfamilia, por lo ejemplo, CYP2C9, es un citocromo perteneciente a la familia 2, subfamilia C y es la enzima codificada en el gen 9 de esta subfamilia (Manikandan y Nagini, 2018), bajo esta clasificación se conocen alrededor de 57 enzimas activas tipo CYP en el cuerpo humano.

1.1.2.4. CYP en el metabolismo de fármacos

En el 2007 Ingelma-Sundberg y colaboradores, publicaron una revisión sobre todos los polimorfismos de los CYP presentes en el cuerpo humano, encontrando que la mayor parte de la expresión de esta enzima se encuentra en 12 variantes, siendo la CYP2D6 la que se encuentra en mayor proporción seguida de CYP2C9 y CYP2C19 (Figura 7) (Ingelman-Sundberg et al., 2007). En la tabla 1 se muestran

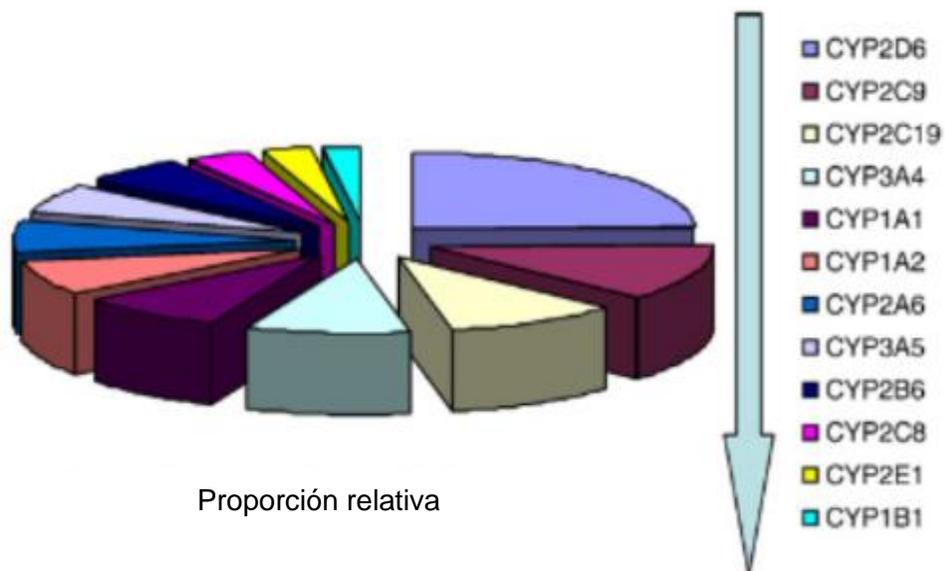


Figura 7. Representación proporcional de la expresión de CYP. Grafica de pastel donde se presenta la proporción relativa del nivel de expresión de los distintos genes codificantes para CYP 450 en el cuerpo humano, figura modificada de Ingelma-Sundberg y colaboradores, 2007.

ejemplos de distintas proteínas tipo CYP agrupadas en función del sustrato que metabolizan (Manikandan y Nagini, 2018).

Como ya se estableció anteriormente estas hemoproteínas están involucradas directamente en la metabolización de xenobióticos, por una reacción de mono-oxigenación que hace que los compuestos difíciles de secretar obtengan un carácter más afín a los sistemas de desintoxicación. Estas enzimas están directamente relacionadas a la metabolización de profármacos como el tamoxifeno, el cual, como se mencionó previamente, se utiliza ampliamente para el tratamiento de cáncer de mama dependiente de hormonas.

Tabla 1. Agrupamiento de CYP según sustrato que catalizan.

Tipo de sustrato	Enzima CYP
Esteroides	1B1, 7A1,7B1,11A1, 11B1, 11B2, 17A1,19A1, 21A2,27A1, 39A1, 46A1, 51A1.
Xenobioticos	1A1,1A2, 2A6, 2A13, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 2F1. 3A4, 3A5, 3A7.
Ácidos grasos	2J2, 4A11, 4B1, 4F12.
Icosanoides	4F2, 4F3, 4F8, 5A1, 8A1.
Vitaminas	2R1, 24A1, 26A1, 26B1, 26C1, 27B1.

Desafortunadamente, el nivel de expresión de las enzimas CYP disminuye en células cancerosas debido a las modificaciones genéticas que sufre el DNA en el proceso tumoral (Hoskins et al., 2009). Este defecto genotípico en células cancerosas reduce el potencial que tienen en las terapias hormonales contra el cáncer los profármacos como el tamoxifeno.

Unido a esta limitante, la terapia de bloqueo hormonal es un proceso sistémico, es decir, que al aplicarse los bloqueadores hormonales como el tamoxifeno, no solamente se unen a los receptores ubicados en las células cancerosas, sino a todos los receptores presentes en el cuerpo, generando efectos secundarios como sangrado vaginal, pérdida de peso, choques de calor, entre otros (Lee et al., 2011).

1.3 Sistemas terapéuticos nanométricos

Por todo lo anterior, la búsqueda de tratamientos con mayor eficiencia y menos efectos secundarios se ha promovido y el desarrollo e implementación de fármacos dirigidos exclusivamente a células cancerígenas ha tomado fuerza en las últimas décadas (Zhang et al., 2017). De acuerdo con esta idea, surge la propuesta de generar sistemas de entrega de enzimas a nivel celular utilizando VLP's como vectores de transporte.

1.3.1 Nanopartículas proteínicas derivadas de virus (VLP's)

Estas VLP's formadas por una estructura icosaédrica proteínica y hueca conocida como cápside, presentan grandes ventajas de protección tanto químicas como físicas para las moléculas en su interior. Entre estas ventajas se pueden destacar su estabilidad química en condiciones fisiológicas tanto de pH como fuerza iónica, su estructura tridimensional y distribución uniforme de tamaños; por lo que presentan ventajas sustanciales para ser utilizadas como sistemas de entrega a nivel celular y su biocompatibilidad (Lee et al., 2009).

Sin embargo, aunque la encapsidación disminuye la inmunogenicidad de las enzimas confinadas, la mayoría de estos sistemas aún genera una respuesta inmune en el organismo. Ejemplo de esto, es el empleo de la cápside del bacteriófago P22, que al ser utilizado como sistema de entrega en células eucariotas, activa una respuesta inmune provocando que no sean aplicables para uso clínico (Chauhan et al., 2018).

Diversos estudios han demostrado que los virus de plantas son poco inmunogénicos (Azizgolshani et al., 2013), y utilizarlos para la producción de VLP's ha tomado fuerza para aplicaciones médicas, siendo las cápsides del virus mosaico de bromo (Figura 8A) y del virus mosaico clorótico del frijol (Figura 8B) las más utilizadas (Soto et al., 2010; Van De Waterbeemd et al., 2016).

En años anteriores, los esfuerzos para generar un sistema de entrega de enzimas CYP han sido potenciados y se ha planteado la encapsidación de CYP en VLP's de origen vegetal, dando lugar a varios trabajos. El dominio catalítico de una CYP de *Bacillus megaterium* (CYP_{BM3}) ha sido confinado en cápsides provenientes del virus de plantas CCMV y en cápsides del bacteriófago P22, sin embargo, la activación

catalítica de estos nanorreactores requiere de peróxido de hidrógeno, haciendo que sea imposible su uso médico y terapéutico (Chauhan et al., 2018; Sánchez-Sánchez et al., 2014, 2015; Tapia-Moreno et al., 2017).

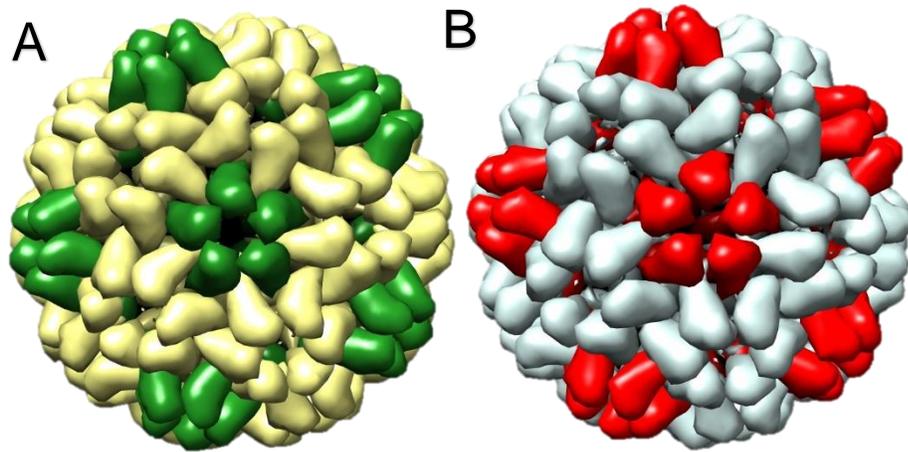


Figura 8. Modelado *in silico* de VLP's. Representación tridimensional de las cápsidas virales derivadas del virus mosaico del bromo (A) y del virus clorótico del frijol (B). Ambas representaciones se realizaron partiendo de los archivos tipo pdb con los códigos 3J7N y 1ZA7, respectivamente.

Este problema se solucionaría al encapsular la $CYPR_{BM3}$, es decir, confinar un citocromo P450 que contenga el dominio reductasa (FAD/FMN), ya que con este nanorreactor se vería favorecida la monooxigenación de sustratos como el tamoxifeno, utilizando donadores de electrones intracelulares, como lo es el NADPH.

Por lo anterior, en este trabajo se plantea la expresión y purificación del $CYPR_{BM3}$ dependiente de NADPH para proponer el diseño de un nanorreactor basado en una VLP derivada de un virus vegetal, con la finalidad de oxidar profármacos utilizados en terapias anticáncer y adicionalmente, evaluar su perfil inmunogénico *in silico*.

1.2 Justificación

La alta tasa de incidencia y de mortalidad del cáncer a nivel mundial y en México, genera una preocupación en el sector salud, debido a que los tratamientos nivel clínico no tienen una gran especificidad contra las células cancerosa. El tratamiento del cáncer con profármacos es una propuesta que toma fuerza, desafortunadamente la activación de estas moléculas se ve abatida por la baja expresión

de las enzimas de la familia citocromo P450 en células con un fenotipo tumoral. Por lo que, la entrega de nanorreactores acoplados con CYP y cápside proteínica de BMV, generaría un sistema nanométrico con baja respuesta inmune, lo que representa una alternativa para optimizar el tratamiento con profármacos. La purificación de CYPR sería el primer paso para el diseño de un nanorreactor dependiente de NADPH para la oxidación de profármacos como el tamoxifeno.

1.3 Hipótesis

El citocromo P450 dependiente de NADPH de *Bacillus megaterium* expresado en *E. coli*, tendrá la actividad catalítica para oxidación del tamoxifeno, demostrando su potencial para su uso en nanorreactores.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Expresar y purificar la enzima CYPR_{BM3} y evaluar la oxidación de tamoxifeno dependiente de NADPH.

1.4.2 Objetivos específicos

- Optimizar las condiciones de expresión de las proteínas recombinantes CYPR_{BM3} (TFFIS / MWV)
- Purificar la proteína recombinante (TFFIS / MWV)
- Caracterización catalítica de la enzima CYPR_{BM3}
- Evaluación de la transformación del profármaco tamoxifeno por la CYPR_{BM3}
- Analizar *in silico* el perfil inmunogénico de las cápsides de *bromovirus*

Capítulo 2. Metodología

2.1 Construcciones de CYPR_{BM3}

Los plásmidos utilizados fueron pRSFDuet-1-BM3-TFFIS (Resistencia a kanamicina, promotor T7, inducible por IPTG, contiene el gen que codifica para la CYPR_{BM3}, contiene las mutaciones R47T/S72F/A82F/F87I/L437S) y pRSFDuet-1-BM3-WMV (Resistencia a kanamicina, promotor T7, inducible por IPTG, gen que codifica para la CYPR_{BM3}, contiene las mutaciones R47W/A82M/F87V). Estos plásmidos fueron gentilmente donados por Prof. Manfred T. Reetz (Max-Planck-Institut für Kohlenforschung). Los plásmidos fueron digeridos mediante una reacción de 10 µL que contenía una solución tampón (Tango, Thermo Scientific) a una concentración final de 1X, 20 de U de NcoI y una concentración aproximada de 2 µg de ambos plásmidos. Las reacciones de digestión se incubaron a 37°C durante 4 h. Una vez concluida la digestión, los productos de la digestión se visualizaron en un gel de agarosa (1%).

2.2 Transformación genética

A partir del plásmido purificado se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, *E. coli* BL21(DE3) pLysS y *E. coli* BL21(DE3) mediante choque térmico. Para lo cual 1 µg de plásmido y 50 µL de células quimiocompetentes se mezclaron e incubaron en hielo por 30 min, 42°C por 2 min y en hielo nuevamente por 2 min. Posteriormente las células fueron recuperadas con 1 mL de medio LB en un tubo Eppendorf de 1.5 mL e incubadas durante 2 h con agitación constante (180 rpm) a 37°C. Finalmente se sembraron en placas Petri con medio LB sólido adicionado con kanamicina 50 mg/mL y se incubaron a 37°C por 18 h. Al finalizar el periodo de incubación se hizo el conteo de UFC y se calculó la eficiencia de transformación.

2.3 Expresión de las mutantes de CYPR_{BM3}.

Se utilizó la construcción pRSFDuet-1-BM3-TFFIS y pRSFDuet-1-BM3-WMV para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, *E. coli* BL21(DE3) pLysS y *E. coli* BL21(DE3)

mediante choque térmico. A partir de las colonias obtenidas se inoculó un pre-cultivo de 5 mL de medio LB suplementado con kanamicina 50 mg/mL para cada cepa y se incubó durante 18 horas a 37°C. A partir de este pre-cultivo se inocularon 25 mL de medio TB (6 g/L de bacto-triptona, 6 g/L de bacto-peptona, 24 g/L de extracto de levadura, 4 mL de glicerol, y 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos de potasio pH 7.4) se suplementó con kanamicina 50 µg/mL, 1 mM de MgCl₂, 1:1000 de solución metálica (30 g de FeCl₂·6 H₂O, 1 g de ZnCl₂·4H₂O, 0.2 g de CoCl₂·6 H₂O, 1 g de Na₂MoO₄·2 H₂O, 0.5 g de CaCl₂·2 H₂O, 1 g de CuCl₂ y 0.2 g de H₂BO₃; todo por litro de solución de HCl al 10%), 1:100 de una solución de glicerol al 30% saturada con glutamato, se incubó el medio a 37°C en agitación constante a 200 rpm hasta que los cultivos alcanzaron una OD₆₀₀= 0.6 y se indujeron con una concentración final de 1 mM de IPTG y se adicionó 1 mM (concentración final) de δ-ALA, posteriormente se incubaron durante 24 h a 25°C. La expresión de la enzima CYP se evaluó mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 10%, la presencia de bandas se reveló mediante tinción con azul de Coomassie R-250.

Posteriormente las células fueron cosechadas por centrifugación durante 15 min a 6 000 rpm, una vez descartado el medio de cultivo, las células fueron lavadas y resuspendidas en un buffer de lisis (buffer de fosfatos 100 mM, pH 7.8, 20 % de glicerol y 1 mM de PMSF), la lisis celular se realizó mediante 3 ciclos de 10 minutos de sonicación, cada ciclo consta de 9.9 segundos de sonicación y 9.9 segundos de descanso. Una vez terminado el protocolo de lisis, la mezcla de lisado celular es centrifugada a 13 000 rpm durante 40 minutos y la fracción soluble fue pasada por un filtro de 0.45 µm y almacenada para su posterior uso a 4°C.

2.4 Expresión de CYP_{BM3} en presencia de proteínas chaperonas.

El protocolo realizado se basa en una sola transformación con ambos plásmidos, es decir, el plásmido codificante de la enzima y el plásmido codificante del sistema de proteínas chaperonas. A partir del plásmido purificado se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* BL21(DE3) mediante choque térmico. Para lo cual 1 µg de plásmido codificante de la enzima y 100 ng de plásmido codificante del sistema de proteínas chaperonas y 50 µL de células quimiocompetentes se mezclaron e incubaron en hielo por 30 min, 42°C por 2 min y en hielo nuevamente por 2 min. Posteriormente las células fueron recuperadas con 1 mL de medio LB en un tubo Eppendorf de 1.5 mL e incubadas durante 2 h con agitación constante (180 rpm) a 37°C. Finalmente se sembraron en placas Petri con medio LB sólido adicionado con kanamicina 50 mg/mL (Marcador de selección del plásmido de la enzima) y cloranfenicol 34 mg/mL

(Marcador de selección del plásmido que codifica a las proteínas chaperonas) y se incubaron a 37°C por 18 h. Al finalizar el periodo de incubación se hizo selección de las colonias que crecieron con el doble marcador de selección y se procedió con el protocolo de expresión previamente descrito. Posteriormente se analizó la incorporación de 100 mg/L de riboflavina al protocolo ya descrito.

Los plásmidos para el sistema de chaperonas que se utilizaron fueron:

- pKJE7 (codifica el sistema dnaK-dnaJ-grpE, promotor araB, inductor L-arabinosa, resistencia a cloranfenicol).
- pG-Tf2 (codifica el sistema groES-groEL-tig, promotor Pzt-1, inductor tetraciclina, resistencia a cloranfenicol).

2.5 Purificación de las mutantes de CYPR_{BM3}.

Todos los protocolos de purificación se realizaron en un equipo de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) GE AKTA Prime Plus. Para la cromatografía de intercambio aniónico se utilizó una columna comercial de 1 mL con una matriz funcionalizada con dietilaminoetil (DEAE), la cual se equilibró con un buffer de Tris-HCl pH 8 y 100 mM de NaCl, una vez equilibrada, la muestra fue inyectada y eluida de la columna con un flujo de 1 mL/min con un límite de presión de 0.5 MPa. Posterior a esto, el gradiente de elución se llevó a cabo bajo el mismo flujo con una longitud de onda de 0.1 mM a 1 M de NaCl. Después, las fracciones eluidas en el pico característico de una longitud de onda de 280 nm, fueron analizadas para detectar actividad enzimática. Este ensayo se llevó a cabo en una placa de 96 pozos en donde se colocaron 20 µL en una mezcla total de 200 µL, la cual contenía 500 µM de 2,6-DMF y 300 µM de peróxido de hidrógeno, la reacción se llevó a cabo en buffer de Tris-HCl pH 8, la actividad enzimática se monitoreó con el aumento de absorbancia a una longitud de onda de 468 nm. Las fracciones que presentaron actividad se evaluaron mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 10%.

Por otro lado, la cromatografía de exclusión molecular se llevó a cabo en el equipo GE AKTA Prime Plus FPLC con una columna Sephacryl 100 HR 16/60, de manera similar la columna se equilibró con un buffer de Tris-HCl pH 8 y 100 mM de NaCl. Posteriormente las fracciones eluidas en el pico característico de una longitud de onda de 280 nm, fueron ensayadas para detectar actividad enzimática; este ensayo se llevó a cabo en una placa de 96 pozos en donde se colocaron 20 µL en una mezcla total de 200 µL, la cual contenía 500 µM de 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMF) y 300 µM de peróxido de hidrógeno, la reacción se llevó

a cabo en buffer de Tris-HCl pH 8, la actividad enzimática se monitoreó con el aumento de absorbancia a una longitud de onda de 468 nm. Las fracciones que presentaron actividad se evaluaron mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 10%.

2.6 Actividad enzimática de las mutantes de CYP dependiente de NADPH (CYPR).

Para determinar la actividad enzimática CYP dependiente de NADPH se utilizó el protocolo publicado en el 2011 por Kille S. y colaboradores (REF), en donde se monitorea por espectrofotometría el consumo de NADPH a una longitud de onda de 340 nm ($\epsilon_{340} = 6.22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), acoplado a esta medición también se seguirá la transformación de 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMF) ya que el producto de esta oxidación tiene un coeficiente de extinción molar de $14\ 800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 468 nm.

Las mediciones se realizaron en un buffer de Tris-HCl pH, con una concentración inicial de 2, 5, 15, 30, 60, 120, 240 μM de NADPH como donador de electrones y 500 μM de 2,6-DMF como sustrato. Todos los ensayos se realizaron en una placa de 96 pozos. Este mismo protocolo fue el que se utilizó para la determinación de las constantes cinéticas, con la variante de la concentración fija de NADPH de 2 μM y un rango de concentración de 2,6-DMF que varían desde 500 nM hasta 50 μM .

Para determinar la degradación de tamoxifeno se utilizó el protocolo descrito por Sánchez-Sánchez en el 2014, en el cual se utiliza un cromatógrafo HPLC (Agilent serie 1100) acoplado a una columna de fase reversa (Kinetex C₁₈). Se realizó una reacción con un volumen final de 0.5 mL, en la cual la concentración inicial de tamoxifeno fue de 200 μM y una concentración de enzima de aproximadamente 200 nM, la reacción se inició con la adición de 2 μM de NADPH, esta reacción se monitoreó en el HPLC a los 60 y 240 minutos, la reacción se llevó a cabo en buffer Tris-HCl 100 mM pH 8. La reacción fue detenida agregando un volumen de acetonitrilo 100% y centrifugando por 3 min a 13 000 rpm previamente a su inyección. El gradiente que se utilizó para la elución fue de 100 mM de acetato de amonio (pH 3) a 65% de acetonitrilo durante 10 minutos con un flujo de 0.75 mL/min; el producto fue monitoreando a una longitud de onda de 280 nm.

Los datos de velocidad inicial y concentración de sustrato, fueron utilizados para realizar la gráfica de doble recíproco (gráfica de Lineweaver-Burk) y se ajustaron por regresión no lineal a la ecuación ($V_0 =$

$V_{\max} * S / (K_M + S)$ utilizando una hoja de cálculo de Excel y graficándolo con el paquete ggplot2 del lenguaje de programación R.

2.7 Estudio in silico del perfil inmunológico de las cápsides de la familia bromovirus.

Para este análisis se tomó como referencia el protocolo establecido por González-Torres et al. en el 2018, en donde a partir de la secuencia de aminoácidos del estudio, es cargada en el servidor IEDB MHC II (<http://tools.iedb.org/mhcii/>) el cual busca probables epítomos de células T. Como está descrito en el trabajo mencionado, se utilizan los alelos que en conjunto forman el 95% de estos en células T; estos son HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0301, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0701, HLA-DRB1*0801, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB1*1301 y HLA-DRB1*1501. Como primer resultado, el servidor arrojó una base de datos, la cual fue depurada utilizando las herramientas de análisis de datos del paquete Excel de Office, estableciendo un corte del valor Ic_{50} igual o menor a 50, ya que este valor es inversamente proporcional al perfil inmunológico. Posterior a esto y de manera manual, se eliminaron secuencias repetida entre los distintos virus y los distintos alelos, dejando una serie de secuencias única y con un perfil altamente inmunogénico. Con estas secuencias y el paquete de visualización de ChimerUSC, se localizaron las secuencias sobre la estructura tridimensional del monómero de la cápside para cada virus.

Capítulo 3. Resultados

Para confirmar la identidad e integridad de las construcciones de CYP_{R_{BM3}}, se llevó a cabo la linealización de los plásmidos, y se continuo con la transformación genética de 3 distintas cepas de *E. coli* con ambas construcciones, pRSFDuet-1-BM3-TFFIS y pRSFDuet-1-BM3-WMV. La transformación se confirmó con el crecimiento de colonias bacterianas sobre una placa de medio solido adicionado con el antibiótico que funciona como marcador de selección dentro de los plásmidos utilizados, posteriormente se hizo un análisis cualitativo del nivel de expresión en las distintas cepas tomando al menos tres tiempos de inducción distintos, los resultados se visualizaron mediante la técnica de electroforesis desnaturante de proteínas.

Una vez obtenidas las mejores condiciones de expresión se realizó un cultivo bacteriano para purificar la proteína recombinante, se realizaron varias etapas de purificación y se estableció un protocolo final donde la pureza de la enzima activa no fue la ideal. Una vez obtenido estos resultados, se realizaron ensayos enzimáticos, para determinar la mayor velocidad catalítica en función del NADPH, se determinó la curva de saturación en función del sustrato 2,6-dimetoxifenol y finalmente se realizó un ensayo para corroborar la degradación del tamoxifeno por nuestra enzima.

3.1 Corroboración de construcciones

En esta etapa, se utilizó 1 µg de plásmido purificado para la linealización del mismo, la reacción de linealización se llevó a cabo con la enzima de restricción *NcoI*, lo cual genera un fragmento de DNA lineal de aproximadamente 7000 pb de bases, los resultados de esta reacción se muestran en la Figura 9. De manera paralela se realizó la doble digestión de los plásmidos

3.2 Resistencia a antibiótico

Una vez verificadas las construcciones (pRSFDuet-1-BM3-TFFIS y pRSFDuet-1-BM3-WMV), fueron utilizadas para realizar la transformación genética de 3 cepas de *Escherichia coli*, estas fueron Rosetta (DE3) pLysS, BL21 (DE3) pLysS y BL21 (DE3), estas tres cepas fueron transformadas y propagadas sobre placas de

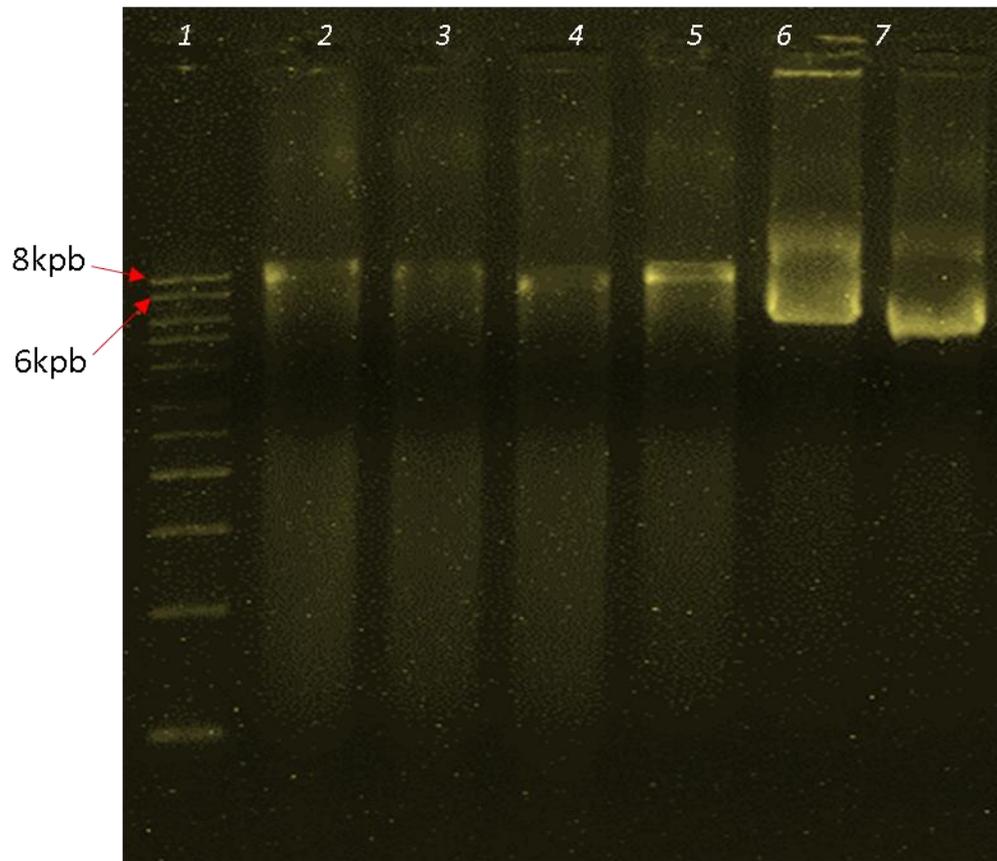


Figura 9. Linealización de plásmidos. Digestión sencilla de los plásmidos utilizados para la expresión de la enzima CYPR. Carril 1: Marcador de pesos molecular, carril 2 y 3: pRSFDuet-1-BM3-TFFIS linealizado (*NcoI*), carril 4 y 5: pRSFDuet-1-BM3-MV linealizado (*NcoI*), carril 6: pRSFDuet-1-BM3-TFFIS y carril 7: pRSFDuet-1-BM3-WMV.

Tabla 2 Eficiencia de transformación genética

Eficiencia de transformación (UFC / μg DNA)						
	BL21 (DE3) pLysS		BL21 (DE3)		Rosetta (DE3) pLysS	
Control	0		0		0	
pRSFDuet-WMV	3	877.19 ± 410.26	39	3545.32 ± 754.47	38	5116.95 ± 695.4
	9		35		49	
	12		23		53	
pRSFDuet-TFFIS	0	111.36 ± 90.92	59	6236.08 ± 553.06	34	3674.83 ± 867.35
	2		60		42	
	1		49		23	

medio solido LB suplementado con kanamicina (34 $\mu\text{g}/\text{mL}$), con el objetivo de seleccionar las colonias crecidas bajo el parámetro de transformación positiva. También se calculó la eficiencia de transformación de estos ensayos las cuales se presentan en la tabla 2, a pesar de que los valores son muy bajos, el objetivo de este cálculo es perfilar las cepas capaces de soportar la carga metabólica que implica la expresión de una enzima tan grande como lo es la del estudio.

3.3 Evaluación cualitativa del nivel de expresión

Una vez obtenida las colonias transformadas, se realizaron cultivos de expresión bajo el protocolo publicado por Manfred T. Reetz, et. al., 2011, a este análisis se le incorpora la variable de tiempo de expresión, por lo que se determinó el mejor tiempo de inducción para el mayor nivel de expresión heteróloga.

Los resultados de este análisis se visualizaron por medio de la técnica de electroforesis desnaturalizante de proteínas, las imágenes resultantes se muestran en la figura 10, donde se observan 3 geles, cada uno representa los distintos tiempos de inducción de cada cepa. De manera evidente, se visualiza que cualitativamente el mayor nivel de expresión está presente a las 18 y 24 horas en ambas cepas derivadas de *E. coli* BL21, esto se visualiza en los carriles 7 y 8 de la figura 10B y 10C; por lo que esta evidencia establece que los cultivos de expresión deberán de tener un tiempo de inducción de 24 horas para asegurar la máxima expresión.

3.4 Evaluación de la actividad catalítica

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de expresión, se evaluó la actividad enzimática de cada una de las combinaciones presentes entre las 3 cepas bacterianas y las dos construcciones que actualmente se están utilizando. Esta evaluación se realiza verificando la formación del producto de la oxidación del 2,6-dimetoxifenol el cual se puede monitorear por medio de espectrofotometría a una longitud de 468 nm, de esta manera se estudia la utilización de cofactores necesarios para esta actividad enzimática. En este caso se realizó el ensayo con NADPH, siendo el cofactor modelo para este trabajo y,

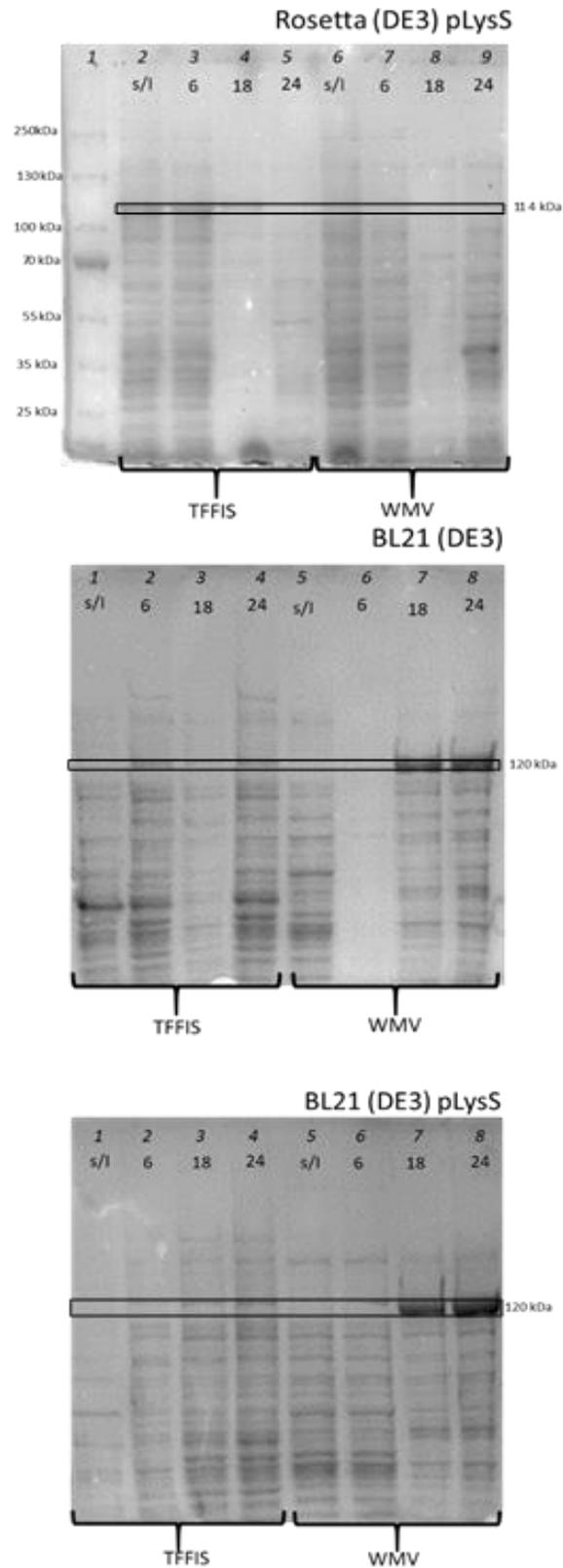


Figura 10. Cuantificación cualitativa de la expresión. Gel de electroforesis donde se evaluaron 3 tiempos de inducción para establecer las condiciones óptimas de expresión de la enzima CYP TFFIS/WMW. A) Fracciones solubles de la cepa transformada Rosetta (DE3) pLysS, B) Fracciones solubles de la cepa transformada BL21 (DE3), C) Fracciones solubles de la cepa transformada BL21 (DE3) pLysS

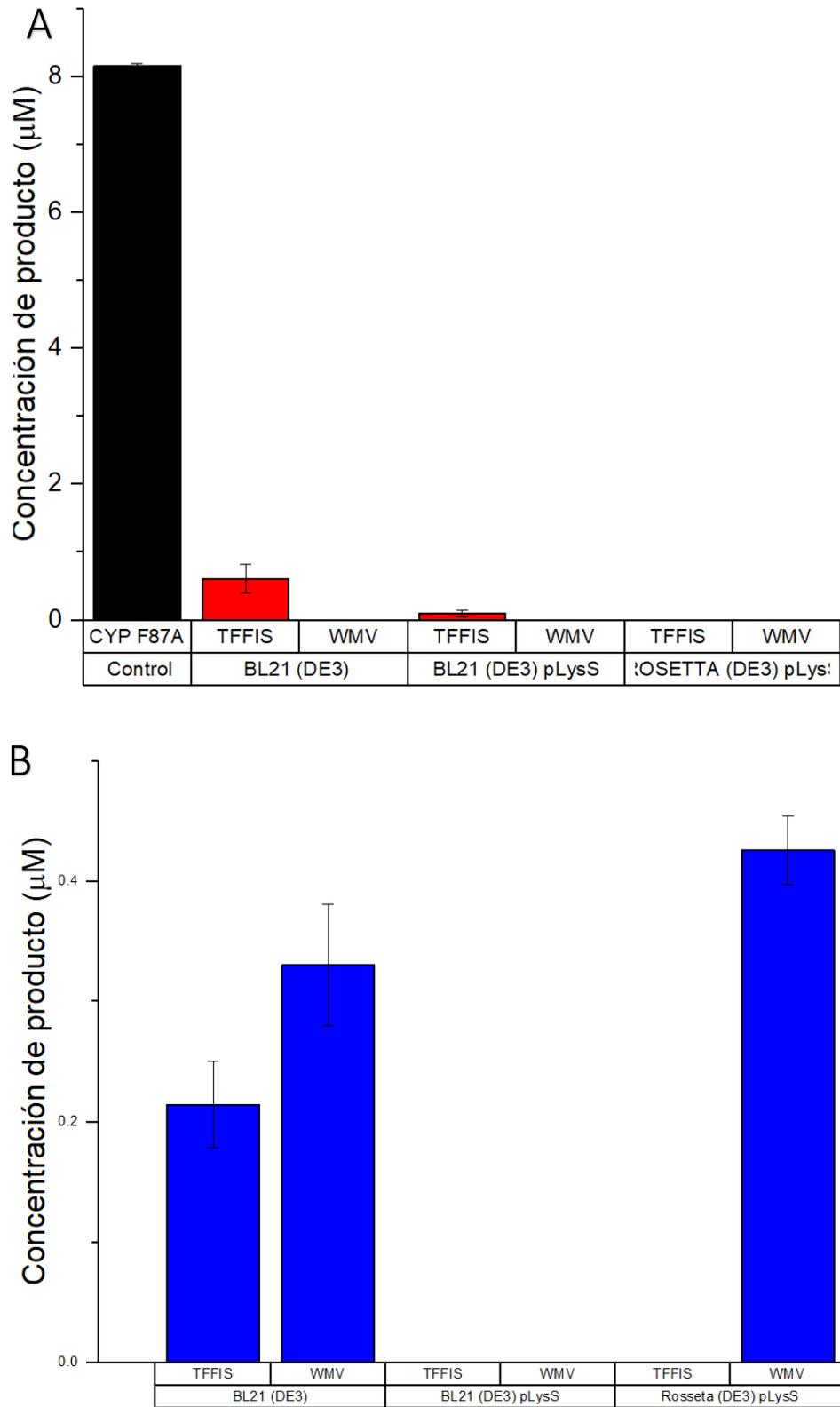


Figura 11 .Evaluación de la actividad enzimática a tiempo final, de las fracciones solubles del lisado celular de las distintas combinaciones. Grafica de la izquierda corresponde a la actividad con peróxido de hidrógeno y grafica de la derecha corresponde a la actividad con NADPH.

además, se evaluó también con peróxido de hidrógeno, siendo este ensayo como control de actividad en distintos puntos.

Para esto, los resultados se muestran en la figura 11, donde se grafica la concentración del producto de reacción a tiempo final. El ensayo de actividad con peróxido se presenta en la figura 11A, mostrando el resultado de una reacción por 30 minutos, mientras que en la figura 11B se muestran los resultados obtenidos de la actividad con NADPH, la cual duro 24 horas; la razón por la cual se utilizaron distintos tiempos es, que en al utilizar fracciones solubles de lisado celular, la concentración de la enzima recombinante es muy baja, por lo que necesita tiempos mayores de incubación, cabe mencionar que para la actividad con peróxido se estableció como límite 30 minutos, debido a que pasado ese tiempo no se observó cambios en la absorbancia a 468 nm.

Es clara la diferencia entre ambos ensayos, ya que en el caso de la actividad con NADPH el valor máximo que corresponde a la mutante WMV expresada en Rosetta es de 0.4 μ M, sin embargo, este perfil no se repite en la actividad con peróxido, ya que esta no presenta actividad, esto podría explicarse por un mal plegamiento de la enzima. Es importante aclarar que los resultados presentados ya cuentan con la sustracción de la actividad basal, por lo que, aunque no exista una oxidación en presencia de peróxido, la fracción soluble del lisado de Rosetta/WMV es apta para continuar la purificación ya que se podrá monitorear en función de la actividad; sin embargo, se decidió explorar una posible solución a la hipótesis del plegamiento erróneo, por lo que se utilizó un sistema de proteínas chaperonas para la expresión de la enzima CYP TFFIS / WMV.

3.5 Expresión heteróloga en presencia de proteínas chaperonas.

Los resultados de los ensayos de expresión en distintas cepas, sugieren que la falta de actividad y la alta producción de proteína (figura 11 y 10) podría ser originadas por un plegamiento erróneo de la enzima. Por esta razón que se planteó la expresión heteróloga en presencia de proteínas chaperonas, las cuales tienen como función mejorar el plegamiento de proteínas. Se utilizaron dos sistemas distintos de proteínas chaperonas, se usó el plásmido pKJE7, el cual expresa el sistema dnaK-dnaJ-grpE y también se probó el plásmido pG-Tf2, el cual expresa el conjunto groES-groEL-tig; ambos plásmidos se utilizaron para la transformación de células de BL21 (DE3) junto al plásmido pRSFDuet-1-BM3-TFFIS, dando como resultado pocas colonias con ambos marcadores de selección (kanamicina y cloranfenicol), estas colonias

fueron utilizadas para inducir la expresión de la enzima en cultivos de medio líquido. Las fracciones solubles del lisado celular se analizaron por electroforesis de proteínas y se cuantificó la actividad tanto con peróxido como con NADPH, estos resultados se comparan con los resultados previos y se muestran en la figura 12.

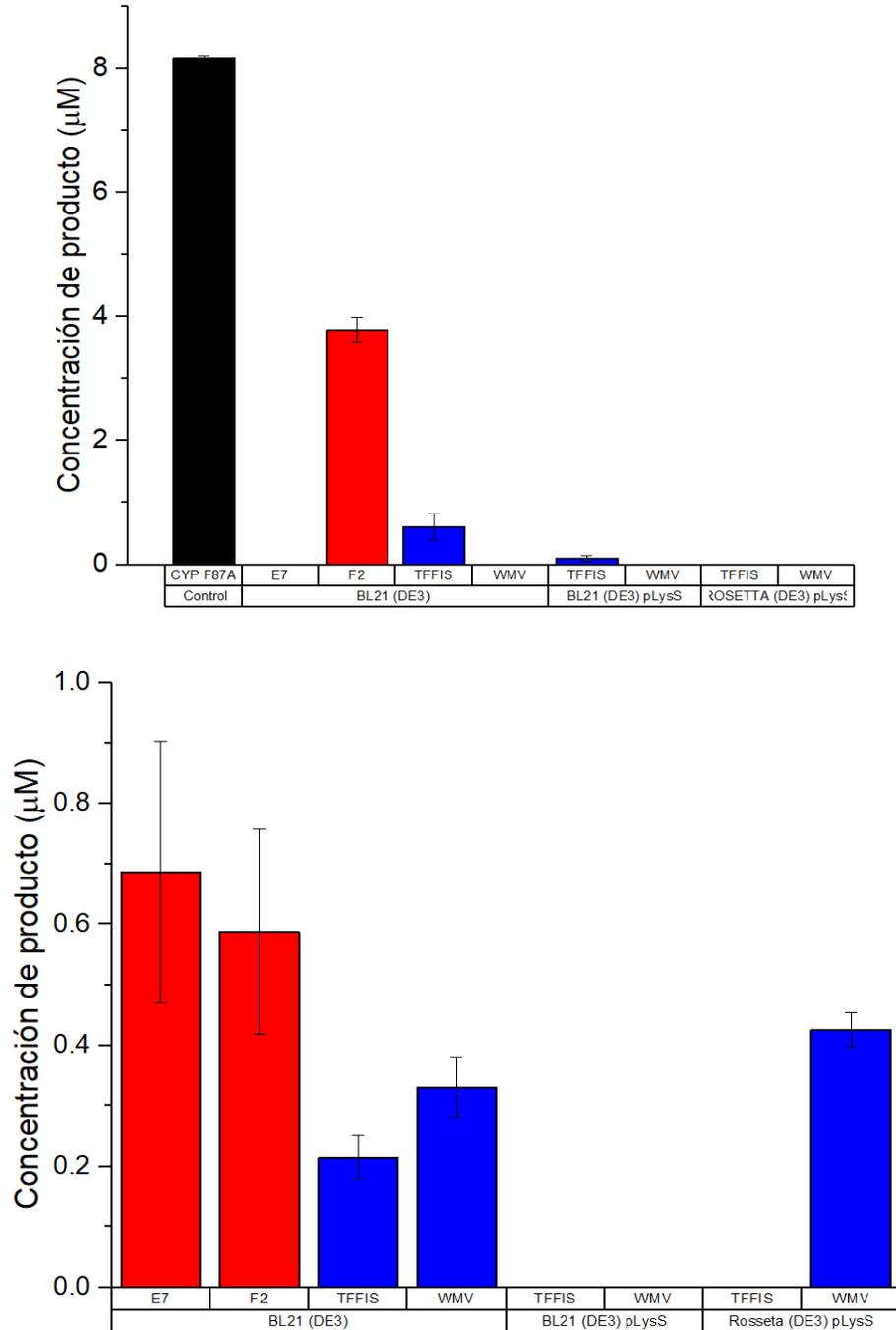


Figura 12. Actividad enzimática en presencia de proteínas chaperonas. Actividad enzimática evaluada con ambos cofactores de la enzima CYP-TFFIS expresada con dos sistemas de proteínas chaperonas.

Como se visualiza hay una gran diferencia en la actividad con ambos cofactores (peróxido y NADPH) en comparación con los resultados sin los sistemas de proteínas chaperonas (Figura 11), por lo que de esta manera se establece la posibilidad de purificar y caracterizar la enzima expresada en presencia del sistema de proteínas chaperonas groES-groEL-tig, el cual arrojó la mejor actividad enzimática.

Adicional al ensayo de actividad enzimática, se realizó un análisis electroforético de proteínas para corroborar el nivel de sobreexpresión sobre ambos sistemas de chaperonas, este análisis se realizó sobre la cepa con mayor actividad la cual fue BL21 (DE3); estos resultados se muestran en la figura 13.

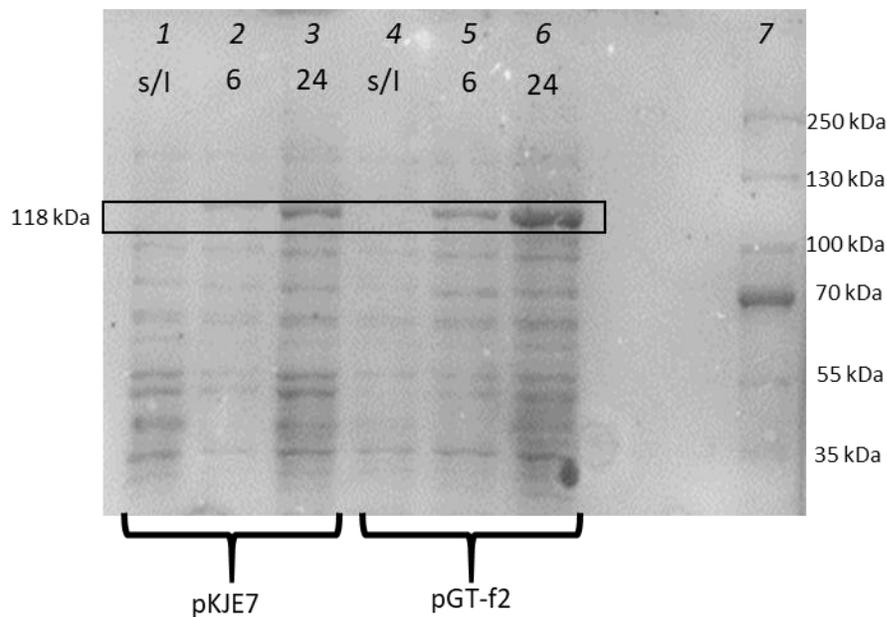


Figura 13. Análisis electroforético de la expresión heteróloga en presencia de proteínas chaperonas. Gel de electroforesis de proteínas de las fracciones solubles de distintas condiciones de expresión de la enzima CYP-TFFIS utilizando dos sistemas de proteínas chaperonas. Se evalúan dos tiempos de inducción 6 y 24 horas (carril 2,3 5 y 6) los cuales se comparan contra el control sin inducción de la misma construcción (carril 1 y 4).

3.6 Incorporación de riboflavina en el protocolo de expresión.

Después una extensa revisión bibliográfica con el objetivo de comprender la diferencia notoria entre la actividad enzimática con los dos cofactores probados, de manera consistente, un factor con el potencial de solucionar esta diferencia, fue la incorporación de riboflavina en el medio de cultivo, es por esta razón, por lo que se evaluó la incorporación de este compuesto en el protocolo de expresión. En esta

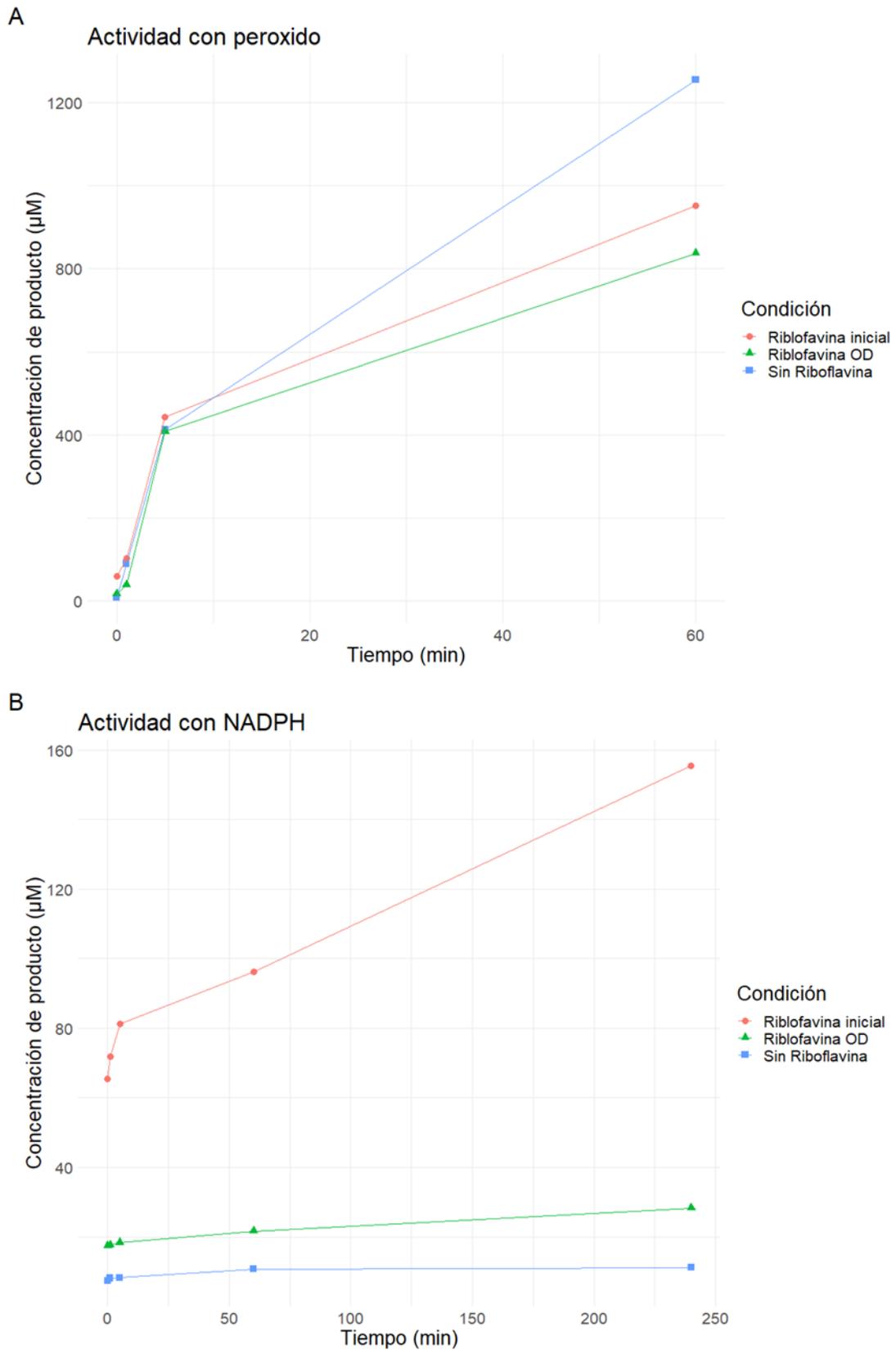


Figura 14. Evaluación de la incorporación de Riboflavina. Cinéticas de formación de producto para evaluar el papel de la incorporación de la riboflavina en el protocolo de expresión.

sección se evaluó una concentración de 100 mg/L de riboflavina, este nuevo componente del medio de expresión se incorporó en dos distintos puntos del crecimiento bacteriano, uno fue al inicio del cultivo y el otro fue en el momento en el que el cultivo llegó a una densidad óptica de 0.4. Los protocolos de expresión fueron los previamente descritos.

La incorporación fue evaluada determinando la actividad enzimática con dos cofactores de nuestra enzima CYPR_{BM3}, los cuales son el peróxido de hidrógeno y el NADPH, los resultados obtenidos de la actividad con peróxido de hidrógeno se muestran en la figura 14 A, mientras que los resultados de la actividad obtenida con NADPH se visualizan en la figura 14 B.

En ambas gráficas es claro que existe una actividad enzimática en los lisados celulares analizados, sin embargo, en la figura 14 B hay un aumento notorio en la actividad con NADPH de las células crecidas con riboflavina desde el inicio del cultivo. Estos resultados justifican la acción de la incorporación de riboflavina en los cultivos de expresión de nuestro sistema de CYPR_{BM3}.

3.7 Purificación de CYPR_{BM3}

Una vez establecidas las condiciones más óptimas para la expresión de la enzima CYPR_{BM3} activa con NADPH, se realizó la etapa de purificación de esta proteína catalítica. La CYPR_{BM3} al estar bajo un sistema de expresión que no se ve favorecido por alguna cromatografía de afinidad, el protocolo de purificación se planteó utilizando distintos tipos de cromatografía, como lo fue intercambio aniónico y exclusión molecular. Además, se probó un protocolo de enriquecimiento utilizando la precipitación con sulfato de amonio, siendo esta la primera etapa del proceso de purificación.

3.7.1 Precipitación con sulfato de amonio

Inicialmente se evaluó la precipitación con sulfato de amonio esto con una fracción soluble de un cultivo de expresión con las condiciones previamente establecidas. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 15, donde en la figura 15A se muestra el análisis electroforético y en la figura 15B se visualiza una gráfica de barras que representa la concentración de producto de la reacción a los cinco minutos; esta actividad representada se determinó con peróxido de hidrógeno y 2,6-DMF. Posteriormente

se realizó el ensayo con NADPH. Sin embargo, en esta ocasión no se logró detectar producto con una concentración de 200 μM , por lo que se estableció dejar fuera del protocolo de purificación este ensayo.

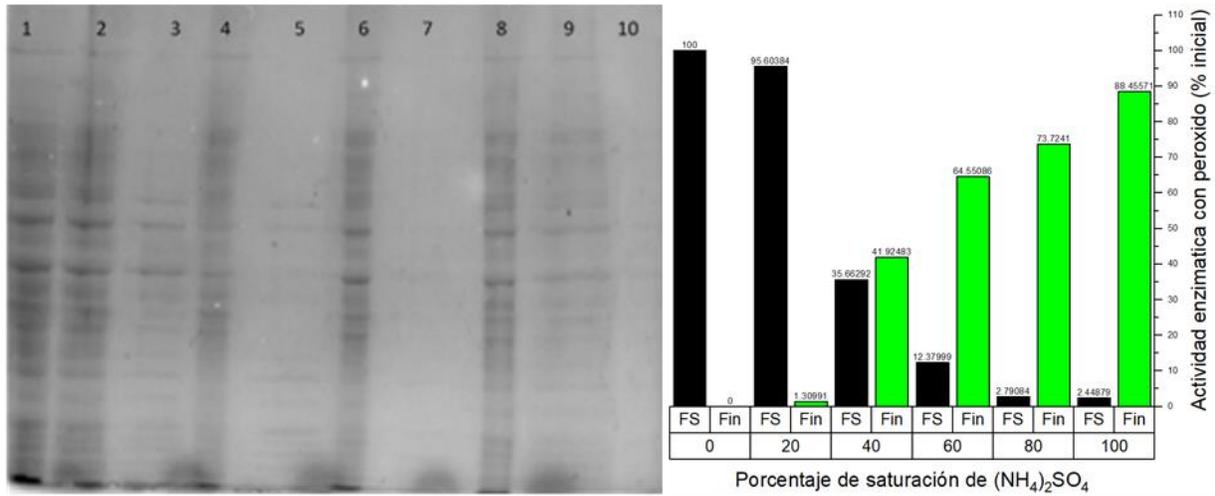


Figura 15. Resultados de la precipitación con sulfato de amonio. La precipitación con sulfato de amonio como etapa previa a la purificación para el enriquecimiento de la enzima en la fracción soluble. De lado derecho se muestra el perfil proteínico derivado del protocolo de precipitación con sulfato de amonio; carril 1: fracción soluble con 0% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; carril 2: fracción soluble con 20% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; carril 3: fracción soluble con 40% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; carril 4: fracción insoluble con 40% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; carril 5: fracción soluble con 60% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; carril 6: fracción insoluble con 60% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; carril 7: fracción soluble con 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; carril 8: fracción insoluble con 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; carril 9: fracción soluble con 100% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; carril 10: fracción insoluble con 100% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. De lado izquierdo, la representación gráfica del porcentaje de actividad presente después de la precipitación con sulfato de amonio: FS: fracción soluble, Fin: fracción insoluble.

3.7.2 Cromatografía por Intercambio aniónico

Al detectar la posible pérdida de actividad por la precipitación con sulfato de amonio, se procedió a realizar una cromatografía de intercambio aniónico directamente a la fracción soluble con actividad detectada utilizando NADPH, los parámetros de operación se establecen en la sección de metodología. Una vez terminada la cromatografía se llevó a cabo un análisis electroforético para verificar si se generó un enriquecimiento o purificación de la enzima CPR con un peso molecular de 120 kDa, este análisis se visualiza en la figura 16.

En la figura 16 se logra visualizar el enriquecimiento de una banda de 130 kDa en los carriles 7, 8 y 9; esta banda corresponde a la enzima CPR ya que previamente fue ubicada en los ensayos de expresión y junto al control (carril 2) se corrobora, adicionalmente se realizó un ensayo de actividad enzimática con

NAPH, los resultados de este ensayo coinciden con el perfil electroforético de la figura 16, es decir, los carriles 7, 8 y 9 son los que presentan la mayor actividad.

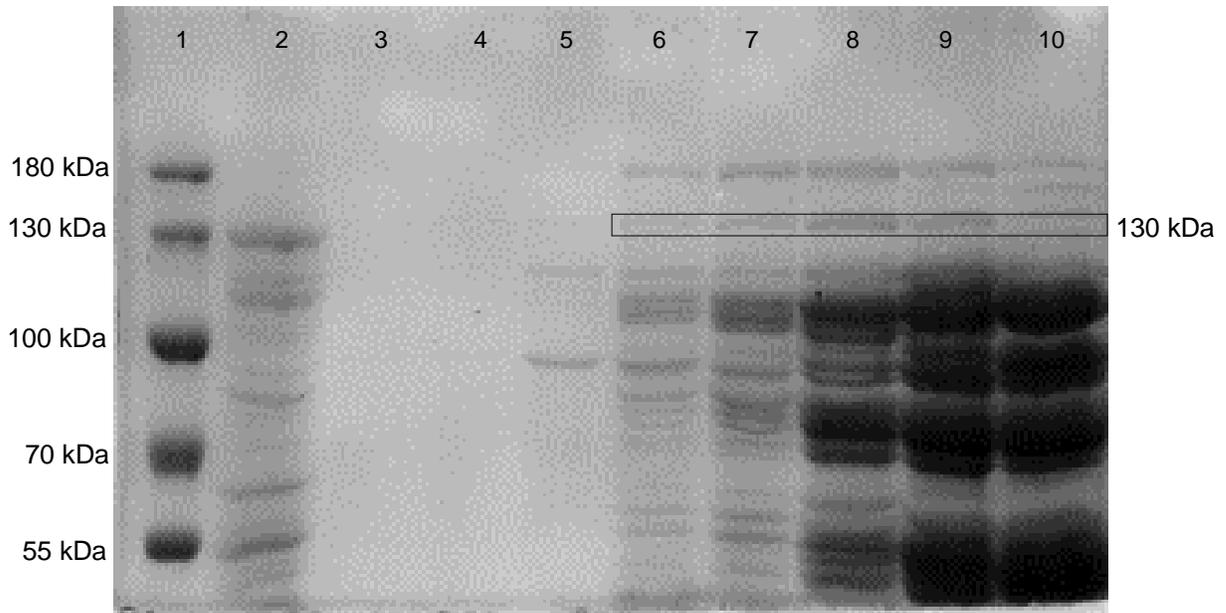


Figura 16. Perfil proteínico resultante de cromatografía de intercambio aniónico. Gel resultante de la electroforesis de las fracciones obtenidas por la cromatografía de intercambio aniónico. ; carril 1: Marcador de peso molecular ; carril 2: Muestra con actividad; carril 3-10: fracción del pico característico de la elución de la proteína.

Una vez concluido este ensayo se optó por juntar y concentrar las fracciones correspondientes a los carriles 6, 7 y 8 de la figura 16, con el objetivo de utilizar esta fracción activa para la cromatografía por exclusión molecular.

3.7.3 Cromatografía por exclusión molecular

Una vez obtenida una fracción soluble con enzima activa y previamente purificada por un paso de intercambio aniónico. Se realizó una cromatografía de exclusión molecular ya que como se observa en la figura 16, la banda de 130 kDa se encuentra sin proteínas vecinas a su peso molecular, por lo que la cromatografía de exclusión molecular, la cual se basa en la separación por diferencia del tamaño molecular, proponía un paso importante para el enriquecimiento y la purificación de esta enzima.

Los resultados de esta cromatografía se muestran en la figura 17, donde efectivamente se visualiza un enriquecimiento y una pureza mayor, sin embargo, no presenta un grado de pureza muy alto. La cromatografía por filtración en gel, nos muestra fracciones con una banda muy enriquecida a la altura de 130 kDa (carril 6, 7 y 8), la cual ya había sido previamente identificada como la enzima CYPR.

Con estos resultados podemos observar que el protocolo establecido de una secuencia de dos distintos tipos de cromatografía; primero intercambio aniónico y posteriormente exclusión molecular, plantean un tren de purificación eficiente, sin embargo, no es el más óptimo en parámetros de la pureza necesaria para la encapsidación, por lo que aún queda como perspectiva la optimización de la purificación de la enzima CYPR.

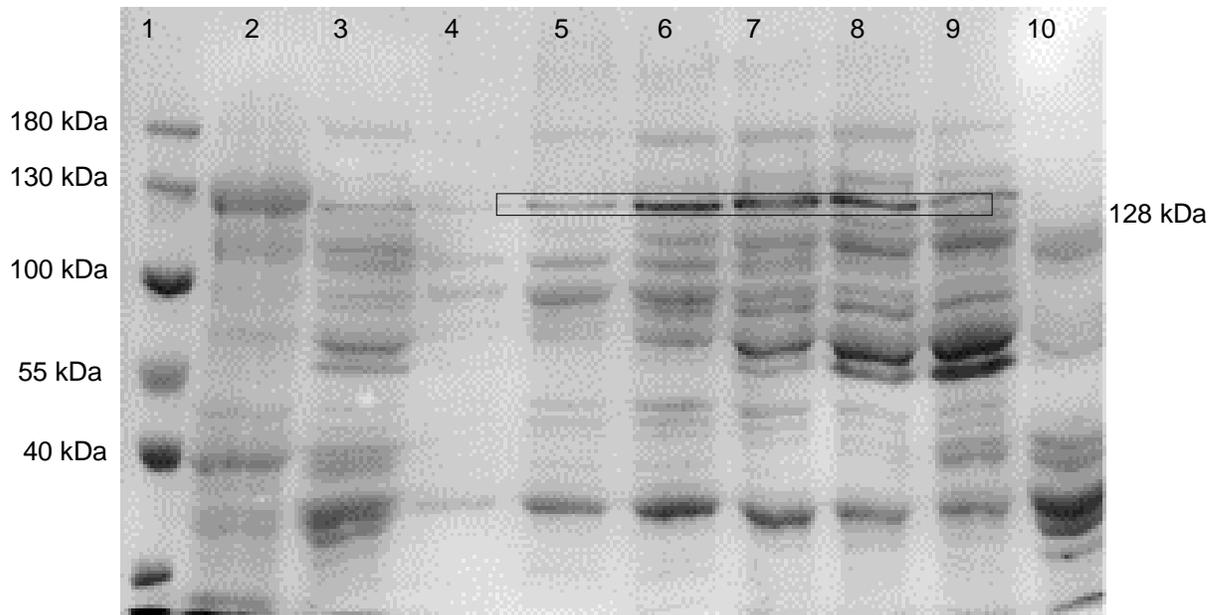


Figura 17. Perfil electroforético resultante de la cromatografía exclusión molecular. Gel resultante de la electroforesis de las fracciones obtenidas por la cromatografía de exclusión molecular. Carril 1, Marcador de peso molecular; carril 2, Muestra con actividad, carril 3-9: fracciones correspondientes a la elución de la proteína; carril 10; fracción intermedia del según pico de elución.

3.8 Actividad enzimática

Posteriormente a los protocolos de purificación, se decidió realizar ensayos enzimáticos con la mezcla de las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular, ya que esta fracción soluble de proteínas representa una purificación parcial y enriquecida de la enzima CPR. Evaluando la actividad con diferentes concentraciones de NADPH, se realizó la cinética de saturación con un sustrato modelo que

fue el 2,6-DMF y por último se realizó una prueba de la degradación del tamoxifeno en presencia de la fracción con actividad CPR.

3.8.1 Evaluación de concentración de NADPH.

Todos los ensayos previamente realizados se llevaron a cabo con una concentración fija de 200 μM de NADPH, en esta ocasión, con el objetivo de comprender el comportamiento de la CYPR. Bajo este concepto se realizó una cinética de producto en función del tiempo, con distintas concentraciones de NADPH dando como resultado los datos mostrados en la figura 18.

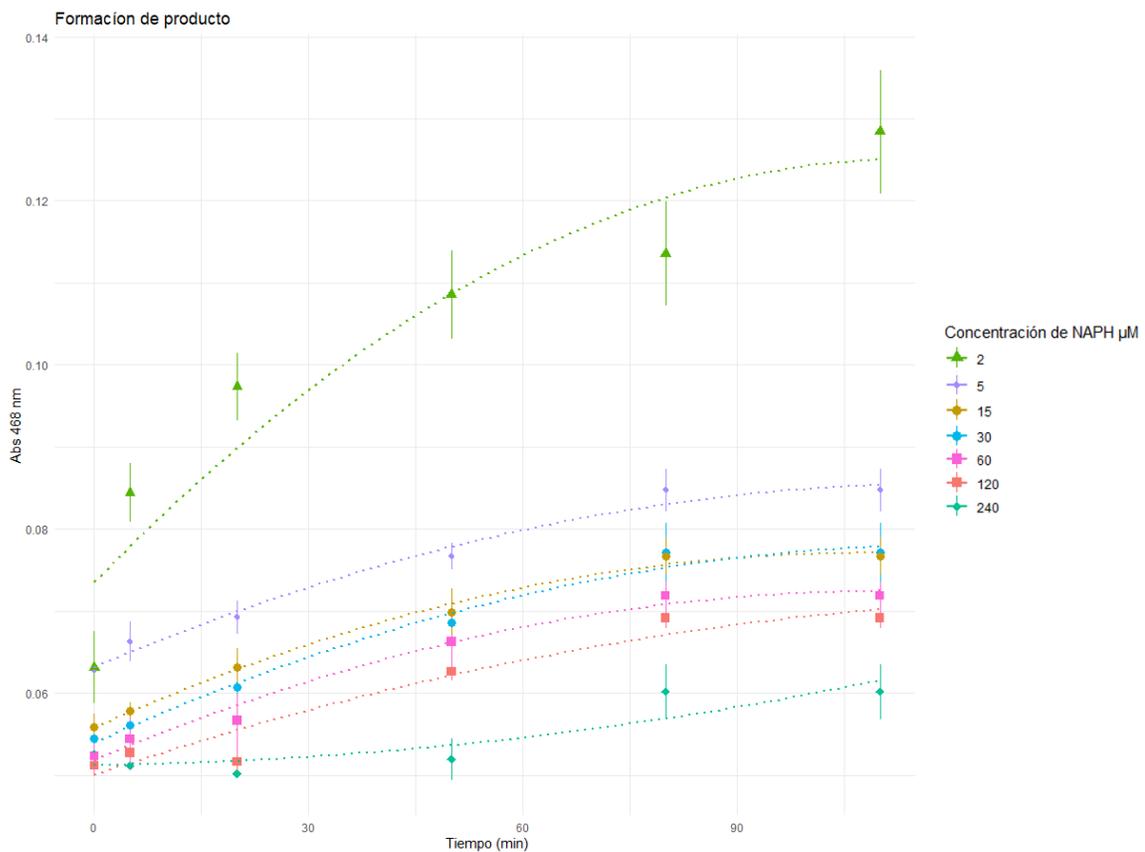


Figura 18. Cinética de formación de producto en función de la concentración de NADPH.

Como es evidente en la gráfica, el comportamiento de estas cinéticas no es el típico, ya que se esperaría que la velocidad de la formación de producto fuese mayor conforme la concentración de sustrato aumentara, sin embargo, en este caso, nuestra enzima CYPR presenta un comportamiento completamente opuesto a lo esperado.

A pesar del comportamiento relacionado a la concentración del NADPH, este experimento evidencio que usar una concentración mayor a 5 μM representa una reacción lenta e ineficiente, por lo que, a partir de aquí, los ensayos restantes se realizaron con una concentración de 2 μM con el objetivo de tener una reacción con una mayor velocidad.

3.8.2 Cinética de saturación

Posterior al análisis de las concentraciones de NADPH, se realizó la curva de saturación para conocer preliminarmente los parámetros cinéticos de la CYPR. Para este fin se utilizó una concentración final de 2 μM de NADPH y concentraciones desde 50 μM hasta 500 μM de 2,6-DMF; el cual es un sustrato modelo para la metabolización de profármacos con las enzimas tipo CYP.

La recta de saturación resultante se visualiza en la figura 19, de la cual se observa un comportamiento típico del modelo de Michaelis-Menten de la CPR en función del sustrato 2,6-DMF. Con estos datos se calcularon las constantes cinéticas que se presentan en la tabla 3, es importante establecer una comparación con los parámetros cinéticas previamente reportados, sin embargo, esto se debe de hacer con la perspectiva que los parámetros presentados en este trabajo son de una enzima parcialmente purificada. Una vez concluido este análisis se procedió a identificar si la enzima en cuestión presenta la capacidad de utilizar el tamoxifeno como sustrato.

Tabla 3. Constantes cinéticas de las enzimas tipo CYP

Enzima	$k_{cat}(\text{min}^{-1})$	$K_m (\mu\text{M})$	$k_{cat}/K_m (\text{min}^{-1}\mu\text{M})$
CYPR	0.186	236	0.0007
CYP _{BM3} 21B3*	141.2 (+3.7)	23.7(+2.7)	5.958

*Valores obtenidos de (Sánchez-Sánchez et al., 2014)

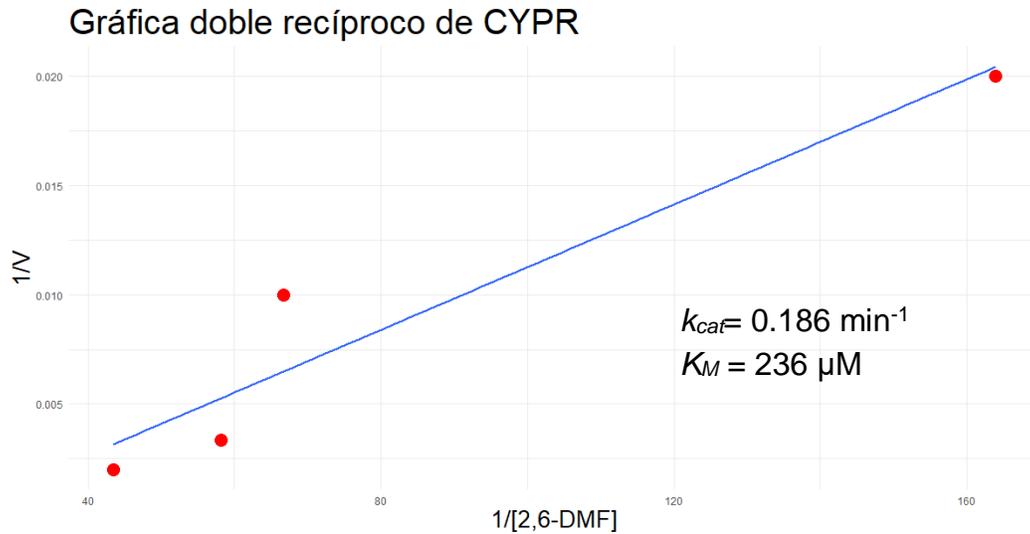


Figura 19. Gráfica de Lineweaver–Burk de la enzima CYPR_{BM3} con el sustrato 2,6-DMF. Los puntos representan los datos experimentales. La línea negra y continua representa la regresión de la doble recíproca siguiendo el modelo de Michaelis-Menten con los parámetros cinéticos mostrados en la tabla 3.

3.8.3 Degradación de tamoxifeno

Este ensayo se llevó a cabo usando las condiciones de reacción previamente descritas, las cuales fueron una concentración de 2 μM de NADPH y una concentración única de 200 μM de tamoxifeno, la degradación de este compuesto fue seguida por la disminución de la concentración la cual fue calculada utilizando una cromatografía de alta presión con una columna de fase reversa para detectar un pico característico del tamoxifeno con un área proporcional a su concentración en el medio de reacción. Los resultados de esta reacción se visualizan en la tabla 4, se logra establecer que a la hora de reacción se generó una degradación del tamoxifeno del 43% respecto a la concentración inicial. Este valor no presentó diferencia respecto al ensayo de las 4 horas. La disminución gráfica del pico del tamoxifeno se visualiza en la figura 20.

Tabla 4. Degradación de tamoxifeno.

<i>Tiempo (horas)</i>	<i>Área bajo la curva</i>	<i>Concentración (μM)</i>	<i>Porcentaje de transformación</i>
0	2313.53 \pm 77.8	200	0%
1	1484.67	128.60	35.7%
4	1231.57	106.46	46.8 %

Completado el análisis preliminar de la enzima $CYPR_{BM3}$ parcialmente purificado y con el objetivo de establecer un diseño de un nanorreactor con potencial anticancerígeno, se realizó un análisis *in silico* de la inmunogenicidad de las posibles cápsides virales que se pueden utilizar para la producción de esta nano-plataforma terapéutica.

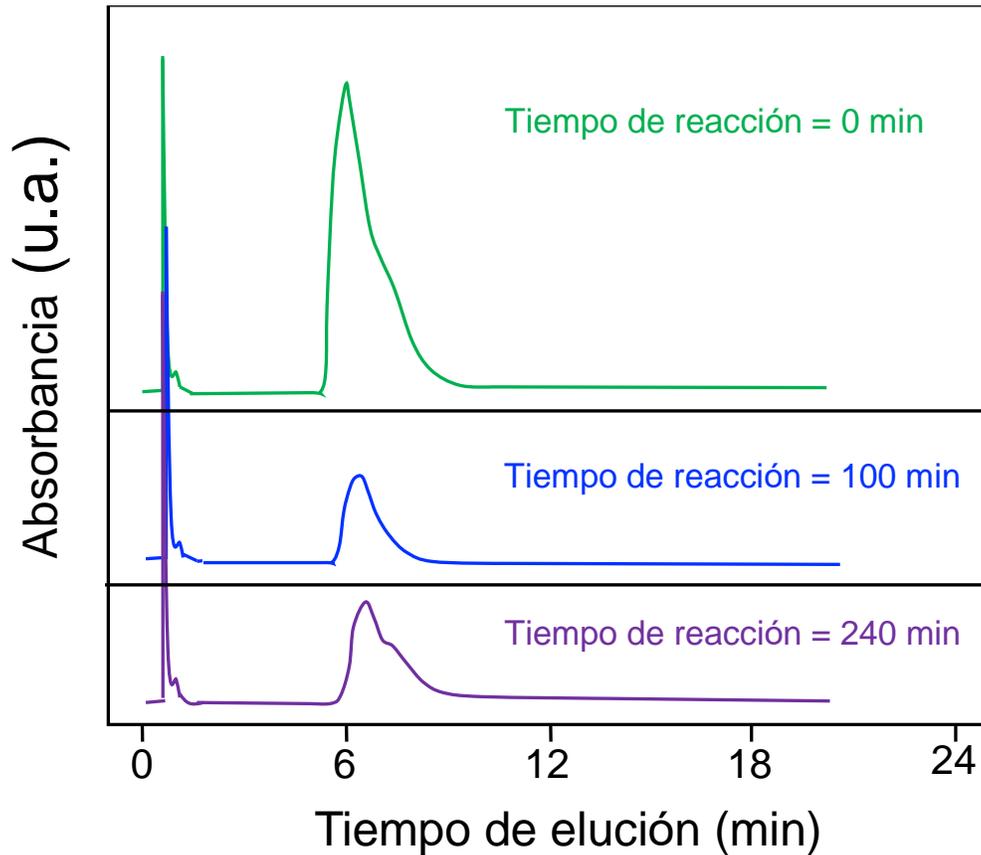


Figura 20. Disminución de la concentración de Tamoxifeno. Imágenes tomadas del cromatograma resultante del análisis de concentración de Tamoxifeno. En el panel súper se encuentra las dos curvas control: Control TAM, la cual es únicamente una solución de Tamoxifeno con la concentración utilizada para la reacción; Mezcla Rx s/enzima 3, esta muestra es toda la mezcla sin reacción sin enzima. El panel intermedio muestra los cromatogramas de los dos distintos tiempos que se analizaron de una reacción de transformación. En el panel inferior se muestran los dos tiempos de reacción y el control, con el objetivo de visualizar la diferencia en el área bajo la curva del pico característico del tamoxifeno.

3.9 Análisis in silico del perfil inmunológico de las cápsides virales.

Actualmente las cápsides de los virus del género *Bromovirus*, han sido ampliamente estudiadas como vectores para el diseño de plataformas terapéuticas. Las dos especies que se han perfilado como potentes plataformas son el virus del mosaico del bromo (BMV) y el virus del mosaico clorótico del caupí (CCMV), sin embargo, existe otras cuatro especies de este género que presentan un tamaño y una estructura idéntica a los dos mencionados, esto son el virus del mosaico del haba (BBMV), virus de la mancha amarilla de cassia (CYBV), virus de la mancha amarilla de melandrio (MYFV) y virus latente de la belleza de primavera (SBLV); estos 6 virus pertenecientes al mismo género dentro de la familia *Bromoviridae* presentan una cápside icosaédrica, con un número de triangulación de $T=3$ y un diámetro externo de 26 nm en promedio, estas particularidades físicas posicionan a estas cápsides como potenciales vehículos para la entrega de compuestos terapéuticos.

Por todo lo anterior es importante conocer su perfil inmunológico para comprender su potencial terapéutico, con este objetivo se realizó un análisis *in silico* donde se utilizó un servidor en línea para la predicción del reconocimiento de los epítomos presentes en las células T, esto siendo un reflejo del potencial inmunogénico que estas cápsides pudiesen llegar a tener. Inicialmente se cargan las 6 secuencias de aminoácidos que conforman la cápside de cada virus utilizando los alelos previamente descritos en la metodología, el resultado fue una base de datos que se depuró con un corte al valor 50 en el parámetro $Ic50$, el cual es un parámetro del reconocimiento de los epítomos de las células T, y que es inversamente proporcional al potencial inmunogénico de la secuencia. Estos datos se representan en la figura 21, donde en el eje horizontal se muestran todas las secuencias que presentaron un valor $Ic50$ menor a 50, mientras que en el eje vertical se visualiza dicho valor para cada secuencia agrupadas por virus.

Sin embargo, este primer resultado aun es muy amplio, por lo que se extrajeron las secuencias presentadas en la figura 21, para realizar un segundo filtro, el cual consistió en dos etapas, la primera de estas fue la eliminación de resultados duplicados por alelos y la segunda fue la comparación entre virus; esta última con el objetivo de descartar secuencias duplicadas entre virus. De esta manera se obtuvo un conjunto de secuencias con un alto perfil inmunogénico y agrupadas por virus (Tabla 5). El análisis de estas secuencias nos permitió identificarlas en la estructura tridimensional del monómero de la cápside para cada virus, estas representaciones las podemos visualizar en figura 22, donde se resaltan 2 tipos de secuencias en cada monómero, en color azul turquesa se ilustra la secuencia con mayor inmunogenicidad

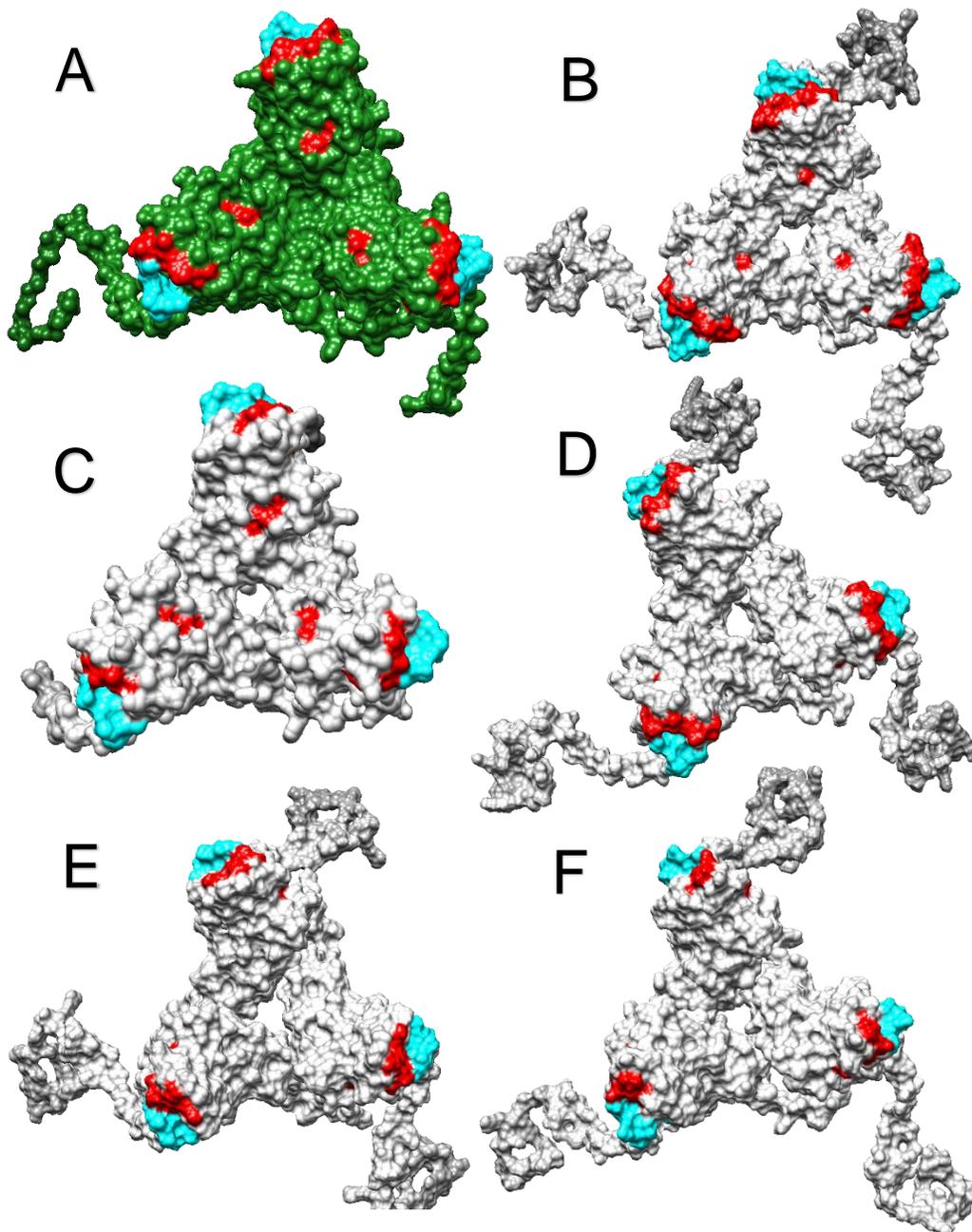


Figura 25. Localización física de las secuencias inmunogénicas. Recopilación de las estructuras tridimensional de los monómeros de la cápside de los 6 virus pertenecientes al género Bromovirus. La secuencia común entre los 6 virus se resalta con color azul turquesa, mientras que la secuencia con el mayor perfil inmunogénico única en cada virusa se resalta con color rojo. A) monómero de la cápside de BMV; B) monómero de la cápside de BBMV; C) monómero de la cápside de CCMV; D) monómero de la cápside de CYBMV; E) monómero de la cápside de MYFV; F) monómero de la cápside de SLBV

De esta manera establecemos que la inmunogenicidad presente en los monómeros de las cápsides presentan un patrón en los 6 virus, un patrón que puede ser mitigado con ingeniería genética utilizando como modelo las características de la secuencia presente en el monómero de BMV (figura 22 A), ya que reportes recientes establecen que esta cápside no genera una activación de macrófagos (Nuñez-Rivera et al., 2020).

Para concluir con los resultados obtenidos, finalmente se propone con evidencia suficiente, el diseño de un nanorreactor basado en la cápside del virus BMV en la cual se confinaría la enzima CYPR, que demostró tener capacidad de transformación de al menos uno de los profármacos más utilizados en el tratamiento de cáncer de mama, el tamoxifeno. En la figura 23 se presenta un esquema general de la estructura y mecanismo del nanorreactor propuesto.

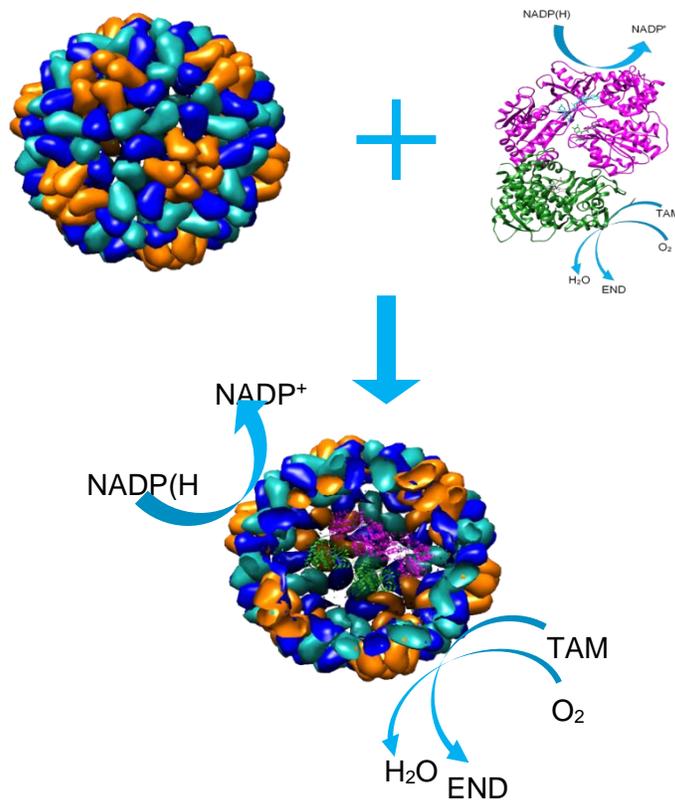


Figura 30. Diseño propuesto para un nanorreactor activador de Tamoxifeno. Estructura basal del diseño propuesto para la producción de un nanorreactor con actividad CYPRBM3 para la activación de profármacos para su uso terapéutico. A) Modelo tridimensional de la cápside de BMV (pdb 1JS9); B) Fusión in silico de dominio hemo de *Bacillus megaterium* (pdb 5JQV) y dominio reductasa de *Candida tropicalis* (pdb 6T1U). TAM (tamoxifeno), END (Endoxifeno).

Capítulo 4. Discusión

En este trabajo se utilizaron herramientas moleculares y bioinformáticas con el objetivo de obtener evidencia suficiente para justificar el diseño de un nanorreactor con las características necesarias para su uso terapéutico en el tratamiento de cáncer de mama. Se inició haciendo un breve análisis molecular de la identidad de los plásmidos utilizados que fueron donados por el Prof. Manfred T. Reetz; este análisis consistió únicamente en una digestión sencilla para corroborar el tamaño de dicho plásmido.

Después de esto se realizó un protocolo de transformación genética por choque térmico de 3 distintas cepas de expresión de la bacteria de *E. coli*, con el objetivo de optimizar el nivel expresión de la proteína recombinante, estos resultados se logran visualizar en la figura 10, donde es evidente que hay una sobreexpresión en ambas líneas derivadas de la cepa BL21, sin embargo, los resultados de actividad (Figura 11) mostraban un perfil diferente al patrón proteínico; esto nos dio la primer pauta en que se estaba generando un problema entre la expresión y la actividad catalítica de nuestra enzima.

Con la sospecha de un mal plegamiento de la enzima CYPR y una deficiencia en la actividad catalítica, se realizó una revisión bibliográfica, y se encontraron dos factores importantes para mejorar la expresión funcional de la CYPR, el uso de proteínas chaperonas (Rupasinghe et al., 2007; Yun et al., 2006) y la incorporación de riboflavina en el medio de expresión (Agrawal y Miller, 2013). Basándonos en estos reportes se decidió evaluar la expresión funcional de nuestra CYPR en presencia de dos sistemas de proteínas chaperonas, los cuales fueron dnaK-dnaJ-grpE y groES-groEL-tig, cada sistema se regula en plásmidos independientes, se seleccionaron estos plásmidos ya que son los que se utilizan en los reportes ya mencionados, principalmente el sistema groES-groEL-tig.

Por otro lado, se evaluó la incorporación de riboflavina en dos condiciones distintas durante el protocolo de expresión. Los resultados de esta modificación al protocolo de expresión se muestran en la figura 12, 13 y 14, donde es evidente que la incorporación de dichos elementos mejora significativamente la expresión funcional de la enzima CYPR.

Estos resultados pueden ser justificados por dos razones que presentan un potencial sinérgico entre ellas; por un lado, la presencia del sistema groES-groEL-tig, se sabe que este sistema proteínico se base en el concepto en el que una proteína mal plegada tiene expuesto su núcleo hidrofóbico en el medio

citoplasmático, por lo que este sistema de proteínas chaperonas se acopla a estos residuos hidrofóbicos y con el consumo de una molécula de ATP, la proteína mal plegada es confinada en una cavidad que promueve su correcto plegamiento, este mecanismo al ser concluido, libera una proteína con un plegamiento distinto al inicial al citosol, por lo que de esta manera promueve una conformación funcional.

Adicional a esto, la incorporación de riboflavina actúa directamente sobre el dominio reductasa, el cual es una flavoproteína con dos cofactores de flavina (FMN y FAD), estos cofactores son fundamentales para que se realice la transferencia de electrones al sitio catalítico de dominio hemo, es por esto que incorporar riboflavina, molécula que es precursor director de la síntesis de FAD y FMN, potencia la correcta adición de estos cofactores a la zona proteínica, además de que existen reportes recientes donde establecen que solo la unión de la molécula de riboflavina a una distancia no más de 10 angstrom del grupo hemo, puede haber transferencia de electrones a partir de moléculas como el NADPH sin la necesidad de tener un dominio adicional que contenga esta función (Zhang et al., 2019).

Una vez mejorada la expresión funcional de nuestra enzima CYPR, la siguiente etapa fue la purificación, desde el inicio se estableció que esta parte podría representar un gran reto debido a las características de la enzima y del plásmido de expresión en el que se encuentra, ya que este último no genera ninguna etiqueta para una cromatografía de afinidad. Es por esto que, el primer paso de esta etapa fue tratar de enriquecer la proteína en una fracción soluble mediante la precipitación de sulfato de amonio, los resultados de este análisis se presentan en la figura 15, en donde se reporta una pérdida total de la actividad con el sustrato de interés que es el NADPH.

Este fenómeno se recibió con incredulidad, sin embargo, después de una revisión bibliográfica, se encontró un protocolo para la remoción de los residuos de flavina utilizando sulfato de amonio (Hefti et al., 2003). Básicamente este protocolo establece que a concentraciones altas (mayores de 20%) las flavoproteínas pueden liberar los cofactores de flavina, lo cual se reflejaría en una nula actividad de la enzima. Este fenómeno se debe al perfil caotrópico que tiene el sulfato de amonio y aunque no hay reportes directos de este comportamiento entre el sulfato de amonio y cualquier enzima tipo citocromo P450, si lo hay con otro agente caotrópico, que es el cloruro de guanidinio (Munro et al., 1996). Con esta evidencia se estableció que la pérdida de actividad detectada después de la precipitación de sulfato de amonio se debe a un proceso conocido como desflavinación fomentada por moléculas que potencian las interacciones hidrofóbicas (agente caotrópico).

Posterior a este análisis, se descartó la posibilidad del enriquecimiento con sulfato de amonio y se planteó como primera etapa la purificación con intercambio aniónico, la cual se describe en la sección 3.7.2 de los resultados de este trabajo. Al concluir con este protocolo se realizó una purificación consecutiva a la anterior la cual es descrita en la sección 3.7.3 del mismo apartado. Como se muestra en estas secciones, los resultados obtenidos entran en la categoría de resultados esperados, a pesar de haber realizado dos pasos cromatográficos al final de la purificación de filtración de gel, la pureza obtenida de la CYPR no fue la más óptima, sin embargo, se logró tener una muestra claramente enriquecida.

La falta de pureza en esta última etapa puede deberse a varios factores, sin embargo, la razón más importante principalmente es que la muestra que fue inyectada no tuviese la pureza necesaria para este tipo de cromatografía, ya que al entrar una muestra a una columna de exclusión molecular con una población tan alta de proteínas, es posible que la resolución de la columna se ve abatida y la separación en función del tamaño fracase, pero, en la figura 17 se visualiza una clara banda enriquecida a la altura correspondiente de nuestra CYPR y aunque no se encuentre completamente limpia, es un grado de pureza razonable para una enzima que no tiene un sistema de purificación por afinidad. Por otro lado, esto no implica que sea el óptimo, ya que se pueden hacer más etapas en el tren de purificación para aumentar el nivel de pureza. Una de estas etapas puede ser una segunda cromatografía de intercambio aniónico, sin embargo, en este segundo paso con una matriz de intercambio fuerte, para así eliminar un mayor número de proteínas y poder tener una muestra enriquecida y lo suficientemente limpia para poder introducirla a la cromatografía de filtración en gel.

Se decidió que la muestra purificada en la que la enzima CYPR se encuentra enriquecida era adecuada para realizar la caracterización enzimática, como se muestra en la figura 18, lo primero que se hizo fue estudiar el comportamiento de esta enzima en distintas concentraciones de NADPH, como se logró observar presenta un perfil completamente contrario al esperado, ya que al ser el NADPH el sustrato para el dominio reductasa, se esperaba un aumento proporcional de la velocidad de reacción con la concentración de NADPH, sin embargo, el comportamiento fue opuesto, mientras la concentración de NADPH se incrementó la velocidad enzimática se veía disminuida. Este fenómeno no ha sido reportado en ninguna enzima del tipo citocromo P450, pero si en otras enzimas como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que forma parte de la ruta metabólica de las pentosas (Nogueira et al., 1986).

Se tiene bien estudiado y caracterizado que esta enzima y su regulación intracelular es el punto de control de esta ruta, ya que en el momento en que la relación entre $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ es igual o mayor a

1:9, la actividad es completamente abatida, es decir, cuando esta enzima que utiliza el sistema $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ está en presencia de una gran concentración de NADPH es inhibida; extrapolando esto, este comportamiento se ajusta al que se muestra en la figura 18. Es por esto, que se sospecha que nuestra enzima podría presentar un perfil de inhibición en concentraciones muy altas de su sustrato.

Una vez analizados estos datos, se estableció que, para evitar esta posible inhibición por sustrato, se utilizara la concentración más baja analizada, la cual equivale a $2 \mu\text{M}$ de NADPH, con esta concentración fija se realizó la cinética de saturación con el sustrato modelo para la monooxigenación el cual es el 2,6-DMF. No fue posible realizar una evaluación completa de la cinética enzimática mostrada en la figura 19, esto se debió solamente a la limitación de tiempo debido a la contingencia sanitaria que actualmente el mundo está viviendo (en el 2020 el virus SARS Cov 2 hizo que colapsara el sistema de salud a nivel global generando un confinamiento mundial y el cierre de las instituciones de educación e investigación). Aunque los datos experimentales podrían no ser los suficientes, estos se ajustaron a una recta usando el gráfico de doble recíproca de Lineweaver–Burk poder hacer una estimación de los parámetros cinéticos de nuestra enzima (CYPR) parcialmente purificada.

Teniendo ya una estimación previa del perfil catalítico de nuestra enzima, se continuo con uno de los ensayos con mayor peso en este trabajo, comprobar que nuestra CYPR fuese capaz de utilizar el tamoxifeno como sustrato. Este ensayo se detalla en los capítulos anteriores, y como se muestra en la tabla 4, con 4 horas de reacción se obtuvo un 46 % de degradación, esto da la pauta a poder establecer que la enzima CYPR tiene un gran potencial como proteína terapéutica.

De manera paralela a todo lo ya mencionado se estuvo realizando el análisis *in silico* del perfil inmunogénico de las cápsides de género de los virus de *Bromovirus*, aunque el análisis presentado no es muy robusto, el fundamento de este nació con un reporte en donde se establece que existe una gran diferencia inmunológica entre la cápside de BMV y CCMV (Nuñez-Rivera et al., 2020). En este reporte se evidencia que la cápside de CCMV genera una activación inmunológica, mientras que el BMV no lo hace. Esta es una observación muy curiosa ya que al pertenecer al mismo género dentro de la familia *Bromoviridae*, tienen un porcentaje de similitud en su secuencia de aminoácidos mayor al 70%. Núñez-Rivera justifica este fenómeno con la diferencia de la carga superficial entre ambas cápsides, sin embargo, profundizando un poco más en esta observación podemos establecer que esta diferencia de carga superficial se puede deber a esas pequeñas diferencias entre los aminoácidos más expuestos en la parte

superficial de la cápside, es por esto, que por medio de servidores se decidió buscar la cadena de aminoácidos con el potencial de activar esta respuesta inmune reportada en el artículo de Núñez-Rivera.

Es importante aclarar que las secuencias identificadas como las que pueden presentar el mayor perfil inmunogénico (tabla 5) coinciden en una única región de la cápside, estando estas en la parte más externa y expuesta a las células. Con este pequeño análisis *in silico*, se abre la posibilidad del diseño de cápsides menos inmunogénicas, al cambiar aminoácidos utilizando herramientas de ingeniería genética utilizando como base la secuencia de la cápside de BMV, esto si es necesario en un futuro.

Con todo esto dicho y analizado, se establece la evidencia suficiente para justificar el diseño de un nanoreactor basado en la cápside de BMV en donde se encontrará confinada la enzima CPYR, como se muestra en la figura 23.

Capítulo 5. Conclusiones

De manera general, se establece en esta tesis la evidencia fundamental para la producción y caracterización de nanorreactores con un posible potencial terapéutico en el tratamiento del cáncer de mama.

- El análisis molecular de los plásmidos donados fue verificado y se comprobó que codifican para la enzima CYPR_{BM3} de *Bacillus megaterium*.
- La incorporación de un sistema de proteínas chaperonas y riboflavina en el protocolo de expresión arrojaron resultados significativamente mejores a los previos a estas modificaciones.
- La utilización de sulfato de amonio para la precipitación de riboflavina es un protocolo que *a priori* no se debe hacer ya que se compromete la actividad catalítica de la enzima,
- Los protocolos de purificación (intercambio aniónico y exclusión molecular), arrojaron una fracción soluble enriquecida de la enzima CYPR parcialmente pura.
- Se observó que la CYPR podría presentar una inhibición por sustrato en concentraciones mayores a 20 μM .
- Se obtuvieron las constantes catalíticas de la CYPR parcialmente pura (K_M y k_{cat}).
- Se comprobó que la enzima CYPR parcialmente pura puede degradar el tamoxifeno.
- Se identificaron las secuencias con un mayor perfil inmunogénico de las cápsides del género *Bromovirus*.

Perspectivas

Es importante establecer que esta tesis establece varias perspectivas importantes, destacando entre ellas dos.

- Cambiar de plásmido de expresión la construcción de la CYPR para poder ser purificado por alguna cromatografía afinidad.
- Obtener una preparación con mayor pureza y caracterizarla cinéticamente
- Encapsidación de la CYPR en cápsides virales de BMV y su funcionalización con derivados de estrógenos para su direccionamiento a células tumorales de mama.
- Ensayos de la efectividad del tratamiento con nanorreactores in vivo en modelos murinos.
- Realizar ensayos de confinamiento de la CYPR y verificar los cambios en su perfil cinético.

Literatura citada

- Agrawal, V., Miller, W. L. 2013. P450 Oxidoreductase: Genotyping, Expression, Purification of Recombinant Protein, and Activity Assessments of Wild-Type and Mutant Protein. En I. R. Phillips, E. A. Shepard, & P. R. Ortiz de Montellano (Eds.), *Cytochrome P450 Protocols* (Third). Springer Protocols: New York. pp. 225–238.
- Azizgolshani, O., Garmann, R. F., Cadena-Nava, R., Knobler, C. M., Gelbart, W. M. 2013. Reconstituted plant viral capsids can release genes to mammalian cells. *Virology*, 441(1), 12–17. doi:10.1016/J.VIROL.2013.03.001
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. 2018. 394 CA: A Cancer Journal for Clinicians Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA CANCER J CLIN*, 68, 394–424. doi:10.3322/caac.21492
- Chauhan, K., Hernandez-Meza, J. M., Rodríguez-Hernández, A. G., Juárez-Moreno, K., Vazquez-Duhalt, R. 2018. Multifunctionalized biocatalytic P22 nanoreactor for combinatory treatment of ER+ breast cancer. *J Nanobiotechnol*, 16, 17. doi:10.1186/s12951-018-0345-2
- González Espinoza, I. R., Villarreal Garza, C., Juárez León, O. A., Adel Álvarez, L. A., Cruz López, J. C., Téllez Bernal, E. 2015. Cáncer de mama con receptores hormonales positivos: tratamiento adyuvante, primera línea en cáncer metastásico y nuevas estrategias (inhibición de mTOR). *Gaceta Mexicana de Oncología*, 14(5), 277–292. doi:10.1016/j.gamo.2015.11.001
- Hartmann Jornada, D., Felipe, G., Fernandes, S., Chiba, D. E., Ferreira De Melo, R., Leandro, J., Santos, D., Chung, M. C., Rades, T., Grohgan, H., Löbmann, K. 2015. The Prodrug Approach: A Successful Tool for Improving Drug Solubility. doi:10.3390/molecules21010042
- Hefti, M. H., Vervoort, J., Van Berkel, W. J. H. 2003. Deflavination and reconstitution of flavoproteins. *European Journal of Biochemistry*, 270(21), 4227–4242. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03802.x
- Hoskins, J. M., Carey, L. A., McLeod, H. L. 2009. CYP2D6 and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. doi:10.1038/nrc2683
- Hrycay, E. G., Bandiera, S. M. 2015. Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Reaction Mechanisms of Cytochrome P450 Enzymes. doi:10.1007/978-3-319-16009-2_1
- Ingelman-Sundberg, M., Sim, S. C., Gomez, A., Rodriguez-Antona, C. 2007. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacogenetic and clinical aspects. *Pharmacology & Therapeutics*, 116(3), 496–526. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.09.004
- Irrázaval O, M. E. 2011. Tamoxifeno y antidepresivos: ¿Antagonistas en la prevención del cáncer de mama? *Revista médica de Chile*, 139(1), 89–99. doi:10.4067/S0034-98872011000100013
- Lee, L. A., Niu, Z., Wang, Q. 2009. Viruses and Virus-Like Protein Assemblies-Chemically Programmable Nanoscale Building Blocks. *Nano Res*, 2, 349–364. doi:10.1007/s12274-009-9033-8
- Lee, S., Lee, K. H., Song, M., Lee, D. 2011. Building the process-drug-side effect network to discover the relationship between biological Processes and side effects. doi:10.1186/1471-2105-12-S2-S2
- Levin, E. R. 2005. Integration of the Extranuclear and Nuclear Actions of Estrogen. En *Mol Endocrinol* (Vol. 19). de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1249516/pdf/nihms3732.pdf>
- Manikandan, P., Nagini, S. 2018. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review.

- Current Drug Targets, 19(1). doi:10.2174/1389450118666170125144557
- Munro, A. W., Coggins, J. R., Lindsay, J. G., Kelly, S., Price, N. C. 1996. DEFLAVINATION OF CYTOCHROME P450 BM3 BY TREATMENT WITH GUANIDINIUM CHLORIDE. de <https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article-pdf/24/1/19S/529805/bst024019s.pdf>
- Munro, A. W., Leys, D. G., McLean, K. J., Marshall, K. R., Ost, T. W. B., Daff, S., Miles, C. S., Chapman, S. K., Lysek, D. A., Moser, C. C., Page, C. C., Dutton, P. L. 2002, mayo 1. P450 BM3: The very model of a modern flavocytochrome. Trends in Biochemical Sciences, Vol. 27. doi:10.1016/S0968-0004(02)02086-8
- Nogueira, M., Garcia, G., Mejuto, C., Freire, M. 1986. Regulation of the pentose phosphate cycle Cofactor that controls the inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase by NADPH in rat liver. En Biochem. J (Vol. 239). de <https://portlandpress.com/biochemj/article-pdf/239/3/553/589472/bj2390553.pdf>
- Nuñez-Rivera, A., Fournier, P. G. J., Arellano, D. L., Rodríguez-Hernandez, A. G., Vazquez-Duhalt, R., Cadena-Nava, R. D. 2020. Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes. Beilstein J. Nanotechnol, 2020, 372–382. doi:10.3762/bjnano.11.28
- Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Järvinen, T., Savolainen, J. 2008. Prodrugs: design and clinical applications. Nature Reviews Drug Discovery, 7(3), 255–270. doi:10.1038/nrd2468
- Rodríguez, J. A., Martínez, L. M., Cruz, N., Cóbbita, A. L. 2014. REVISIÓN Terapia génica para el tratamiento del cáncer Josefa. Revista Colombiana de Cancerología, 18(1), 27–40. de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-90152014000100005
- Rupasinghe, S. G., Duan, H., Frericks Schmidt, H. L., Berthold, D. A., Rienstra, C. M., Schuler, M. A. 2007. High-yield expression and purification of isotopically labeled cytochrome P450 monooxygenases for solid-state NMR spectroscopy. En Biochim Biophys Acta (Vol. 1768). de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>
- Sánchez-Sánchez, L., Cadena-Nava, R. D., Palomares, L. A., Ruiz-García, J., Koay, M. S. T., Cornelissen, J. J. M. T., Vazquez-Duhalt, R. 2014. Chemotherapy pro-drug activation by biocatalytic virus-like nanoparticles containing cytochrome P450. Enzyme and Microbial Technology, 60, 24–31. doi:10.1016/j.enzmictec.2014.04.003
- Sánchez-Sánchez, L., Tapia-Moreno, A., Juárez-Moreno, K., Patterson, D. P., Cadena-Nava, R. D., Douglas, T., Vazquez-Duhalt, R. 2015. Design of a VLP-nanovehicle for CYP450 enzymatic activity delivery. Journal of Nanobiotechnology, 13(1), 66. doi:10.1186/s12951-015-0127-z
- Santiago, C., Santiago, C., Bandrés, F., Bandrés, F., Gómez Gallego, F., Gómez Gallego, F. 2002. Polimorfismos de citocromo p450: papel como marcador biológico. Medicina del Trabajo, 11(3), 130–140.
- Shimada, T., Fujii-Kuriyama, Y. 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. Cancer Science, 95(1), 1–6. doi:10.1111/j.1349-7006.2004.tb03162.x
- Singh, M. S., Francis, P. A., Michael, M. 2011. Tamoxifen, cytochrome P450 genes and breast cancer clinical outcomes. The Breast, 20(2), 111–118. doi:10.1016/J.BREAST.2010.11.003
- Soto, C. M., Ratna, B. R., Hess, H., Jaeger, L. 2010. Virus hybrids as nanomaterials for biotechnology This review comes from a themed issue on Nanobiotechnology Edited. Current Opinion in Biotechnology, 21, 426–438. doi:10.1016/j.copbio.2010.07.004
- Subramani, R., Nandy, S. B., Pedroza, D. A., Lakshmanaswamy, R. 2017. Role of Growth Hormone in Breast

- Cancer. doi:10.1210/en.2016-1928
- Tapia-Moreno, A., Juarez-Moreno, K., Gonzalez-Davis, O., Cadena-Nava, R. D., Vazquez-Duhalt, R. 2017. Biocatalytic virus capsid as nanovehicle for enzymatic activation of Tamoxifen in tumor cells. *Biotechnology Journal*, 12(6), 1600706. doi:10.1002/biot.201600706
- Tsang, J. Y. S., Tse, G. M. 2019. Molecular Classification of Breast Cancer. *Advances In Anatomic Pathology*, 0(0), 1. doi:10.1097/PAP.0000000000000232
- Van De Waterbeemd, M., Snijder, J., Tsvetkova, I. B., Dragnea, B. G., Cornelissen, J. J., Heck, A. J. R. 2016. Examining the Heterogeneous Genome Content of Multipartite Viruses BMV and CCMV by Native Mass Spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 27, 1000–1009. doi:10.1007/s13361-016-1348-6
- Villavicencia-Queijeiro, A. 2012. La mitocondria como fábrica de cofactores: biosíntesis de grupo hemo, centros Fe-S y nucleótidos de favlina (FMN/FAD). En D.R. © TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas (Vol. 116).
- Williams, P. A., Cosme Jose., Ward, A., Jhoti, Angove, H. C., Vinkovic, D. M., Harren. 2003. Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *NATURE*, 424, 464–468. doi:10.1038/nature01817
- Yun, C.-H., Yim, S.-K., Kim, D.-H., Ahn, T. 2006. Functional Expression of Human Cytochrome P450 Enzymes in *Escherichia coli*. *Current Drug Metabolism*, 7, 411–429.
- Zhang, C., Lu, M., Lin, L., Huang, Z., Zhang, R., Wu, X., Chen, Y. 2019. Riboflavin Directly Mediates the Dealkylation by Microbial Cytochrome P450 Monooxygenases. *bioRxiv*, 801928. doi:10.1101/801928
- Zhang, X., Li, X., You, Q., Zhang, X. 2017, octubre 20. Prodrug strategy for cancer cell-specific targeting: A recent overview. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 139. doi:10.1016/j.ejmech.2017.08.010