

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

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



**Doctorado en Ciencias
en Nanociencias**

Nanorreactor con actividad lacasa como agente antitumoral

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

Presenta:

Carlos Alejandro Medrano Villagómez

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Carlos Alejandro Medrano Villagómez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Director de tesis

Dr. Andrés Zárate Romero

Dra. Patricia Juárez Camacho

Dra. Marcela Ayala Aceves

Dra. María Verónica Villagrana Escareño



Dra. Catalina López Bastidas
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

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

Nanorreactor con actividad lacasa como agente antitumoral

Resumen aprobado por:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Director de tesis

El cáncer representa un problema de salud pública a nivel mundial, en parte debido a la ausencia de tratamientos que actúen de manera específica sobre las células cancerosas. La quimioterapia, basada en la administración sistémica de fármacos, aunque puede ser muy efectiva, frecuentemente genera graves efectos secundarios; a nivel celular, uno de los principales problemas es la desregulación de la actividad del citocromo P450, que es una familia de enzimas hepáticas responsable de activar los profármacos en el cuerpo humano. Por ello, es fundamental explorar alternativas terapéuticas más selectivas. Una propuesta emergente es el uso de enzimas tipo lacasa para aplicaciones biomédicas, particularmente en oncología. En este trabajo se estudió la formación de nanorreactores mediante la encapsidación de la lacasa de *Corioloopsis gallica* en partículas tipo virus (VLPs) formadas por la proteína de capa del virus del mosaico del bromo (BMV). Se modificó químicamente la superficie de la lacasa para mejorar su interacción electrostática durante la formación de los nanorreactores. Asimismo, se evaluó la biotransformación de un conjunto de profármacos en presencia de la enzima, y los productos generados fueron purificados y caracterizados. Se analizó la citotoxicidad de los profármacos activables (procarbazona, doxorubicina e irinotecán) en combinación con la lacasa en células de leucemia MOLT-4, con el objetivo de establecer condiciones para tratamientos conjuntos. La viabilidad celular se evaluó mediante citometría de flujo utilizando tinciones con FDA y PI, y se determinó la variación en las poblaciones apoptóticas mediante el kit comercial CellEvent™ Caspase-3/7. Como parte de los resultados, se estableció un protocolo para la síntesis y purificación de nanorreactores funcionales. Se demostró que la lacasa es capaz de activar profármacos, generando metabolitos con mayor actividad citotóxica. Además, se observó un efecto sinérgico entre la lacasa y los profármacos, así como un aumento en la población apoptótica, lo cual representa una vía prometedora para inducir muerte celular dirigida en cáncer.

Palabras clave: Cáncer, Lacasa, Nanorreactor, Profármaco, Apoptosis.

Abstract of the thesis presented by **Carlos Alejandro Medrano Villagómez** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Nanoscience.

Nanoreactor with laccase activity as an antitumor agent.

Abstract approved by:

Dr. Rafael Vázquez Duhatl
Thesis director

Cancer is a global public health issue, in part due to the lack of treatments that specifically target cancer cells. Chemotherapy, based on the systemic administration of drugs, although it can be very effective, frequently generates serious side effects. At the cellular level, one of the main problems is the deregulation of cytochrome P450 activity, a family of hepatic enzymes responsible for activating prodrugs in the human body. It is therefore essential to explore more selective therapeutic alternatives. One promising approach currently under investigation is the use of laccase-type enzymes for biomedical applications, particularly in cancer treatment. This study focuses on developing nanoreactors based on the encapsidation of laccase from *Coriolopsis gallica* within virus-like particles (VLPs) formed by the coat protein from brome mosaic virus (BMV). To enhance electrostatic interactions during the nanoreactor formation, the surface of the laccase enzyme was chemically modified. The biotransformation of a series of prodrugs in the presence of laccase was evaluated, and the resulting products were subsequently purified and characterized. The cytotoxicity of laccase-activated prodrugs—procarbazine, doxorubicin, and irinotecan—was assessed in the MOLT-4 leukemia cell line to establish optimal conditions for combined treatments. Based on these results, cell viability was analyzed using flow cytometry with FDA and PI staining, and changes in apoptotic populations were determined with the CellEvent™ Caspase-3/7 detection kit. A protocol was established for the synthesis and purification of nanoreactors composed of *Coriolopsis gallica* laccase and BMV coat protein. It has been demonstrated that laccases can oxidize prodrugs, producing active metabolites with enhanced cytotoxicity. Additionally, the cytotoxic effect of the enzyme on the MOLT-4 leukemia cell line was confirmed. A synergistic effect on cell viability was observed when laccase was combined with the prodrugs. Furthermore, analysis of cell death profiles revealed that the presence of laccase significantly increased the proportion of apoptotic cells—an ideal mechanism for selectively inducing cancer cell death.

Keywords: Cancer, Laccase, Nanoreactor, Prodrug, Apoptosis

Dedicatoria

*Esta tesis está dedicada a mi familia, a mis padres,
a mi hermana y sobre todo a MÍ.*

“If You're Going Through Hell, Keep Going”

- Winston Churchill

Agradecimientos

Agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM (CNyN) por ser parte de este camino tanto académica como administrativamente. Así mismo, a la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la aportación de la beca para la realización de mis estudios de posgrado y financiación de la investigación.

Al doctor Rafael Vázquez Duhalt, quien por más de 6 años ha fungido como un director y una inspiración en mi camino científico; hace casi más de 10 años (aproximadamente en el 2016), durante una clase en mi carrera universitaria tuve la fortuna de conocer un libro que me marcó para siempre, un libro donde se fundían dos áreas increíbles, un libro escrito por quien ahora es y será parte de mi futuro científico, este libro es Termodinámica Biológica escrito por un gran ser humano y científico excepcional el Doctor Rafael Vázquez Duhatl.

Al doctor Andrés Zárate Romero, quien se convirtió de mentor a colega y amigo, a la Doctora Verónica Villagrana quien me transmitió todos sus conocimientos del tema asociado mi tesis, a la Doctora Marcela Ayala quien siempre tuvo palabras de aliento y motivación para continuar con el proyecto y quien siempre me ayudaba a aprender más y más sobre mi tema de estudio, y a la Doctora Patricia Juárez, quien con sus comentarios y visión siempre ayudó a que mi proyecto y formación fuera más integral y redonda.

Al Doctor Oscar González Davis quien actualmente es técnico académico del departamento de bionanotecnología, quien además de todo siempre ha sido un compañero y amigo fiel, además de un gran mentor, gracias a su TOC me ha ayudado a ser una persona más disciplinada y ordenada.

A la maestra Itandehui Betanzo, quien es la técnico administrativo del departamento y siempre hacia todo lo posible, con su manera tan peculiar, de conseguirnos recurso y cumplir nuestros caprichos cuando requerimos cosas para el laboratorio.

Definitivamente a todo el Grupo Chain Lab, quien está bajo la coordinación del Doctor Rubén Darío Nava, quien aunque nunca tuvo un compromiso formal con mi formación, siempre confió en mi trabajo y me transmitía su conocimiento.

A mi grupo de amigos más cercanos, Elizabeth Loredo, Martha Mariana, Kendra Ramírez, Leonado Lara, Lizeth, quien siempre me ha estado apoyando tanto dentro como fuera del ámbito científico.

Por supuesto a toda mi familia que ha creído en mí, y que desde la distancia siempre me han apoyado. A mi madre, quien me ha enseñado a ser una persona fuerte y resiliente, a mi padre quien me ha enseñado el valor de la disciplina y que ha sido mi red de apoyo, a mi hermana que me ha demostrado su amor día con día.

A todas esas personas que han formado parte del camino y que hoy no están o no forman parte de la conclusión de este capítulo, a todos aquellos sentimientos que llegaron y se fueron, a todas aquellas dudas y frustraciones que forjaron el camino y que ahora son solo un recuerdo, a todos los fantasmas que susurraban “no se podrá”, a todos esos momentos, gracias, ya que este capítulo ha concluido gracias todos ustedes.

Y por supuesto, lo más importante de todo, a mí y a mi resiliencia y disciplina, que en ocasiones me derrumbó y que varias veces el camino se nublada, pero aquí seguimos y que a pesar de MUCHOS contratiempos de todo tiempo, seguimos y seguiremos.

SEMPER AD MELIORA

Tabla de contenido

Página

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	x
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Cáncer: Problemática de salud pública	1
1.2 Antecedentes	3
1.2.1 Lacasas.....	3
1.2.2 Nanomedicina	6
1.3 Hipótesis.....	7
1.4 Objetivos	7
1.4.1 Objetivo general	7
1.4.2 Objetivos específicos.....	8
Capítulo 2. Metodología	9
2.1 Análisis <i>in silico</i>	9
2.1.1 Preparación de la proteína receptora	9
2.1.2 Preparación de los sustratos modelo.....	9
2.1.3 Definición de la caja de búsqueda (grid box)	10
2.1.4 Acoplamiento rígido	10
2.1.5 Análisis de interacciones proteína–ligando	10
2.1.6 Preparación de los ligandos	11
2.1.7 Configuración y ejecución del acoplamiento flexible	11

2.1.8	Análisis de los resultados	12
2.2	Purificación y funcionalización de lacasa.	12
2.3	Caracterización de la lacasa	12
2.4	Modificación superficial de lacasa	13
2.5	Purificación de proteína de BMV	13
2.6	Producción y purificación de nanorreactores	14
2.7	Cuantificación de proteína y actividad enzimática de nanorreactores.....	15
2.8	Caracterización morfológica y fisicoquímica de nanorreactores	15
2.9	Biotransformación de profármacos	16
2.9.1	Preparación de soluciones estándar de fármacos	16
2.9.2	Condiciones de reacción para la biotransformación.....	16
2.9.3	Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	16
2.9.4	Identificación de productos de transformación.....	18
2.10	Análisis <i>in vitro</i>	18
2.10.1	Mantenimiento de células MOLT-4.....	18
2.10.2	Curva de calibración de rojo neutro.....	19
2.10.3	Evaluación de citotoxicidad y estimación de IC ₅₀ con rojo neutro.	19
2.11	Evaluación de viabilidad por citometría.....	20
2.12	Evaluación de poblaciones apoptóticas	22
2.13	Análisis estadísticos.....	22
Capítulo 3.	Resultados.....	24
3.1	Análisis <i>in silico</i>	24
3.2	Caracterización catalítica de la lacasa de <i>Corioliopsis gallica</i>	26
3.3	Producción y caracterización de nanorreactores.....	29
3.4	Biotransformación de profármacos.	32
3.5	Evaluación <i>in vitro</i>	35
Capítulo 4.	Discusión	43

4.1	Análisis <i>in silico</i>	43
4.2	Caracterización de lacasa	43
4.3	Formación y caracterización de nanorreactores.....	45
4.4	Biotransformación de profármacos por nLac.....	49
4.5	Evaluación <i>in vitro</i> de VLP-nLac y VLP-saLac	51
Capítulo 5.	Conclusiones	55
Capítulo 6.	Perspectivas	57
Literatura citada		58
Anexos		62

Lista de figuras

Figura	Página
1. Características distintivas del cáncer.	1
2. Estructura cristalográfica de lacasa de <i>Coriopsis gallica</i> (PDB 4A2E).	4
3. Esquema del protocolo de ensamble y purificación de nanorreactores.	14
4. Representación de las moléculas usadas para el docking.	26
5. <i>Docking</i> flexible.	27
6. Representación de proteínas involucradas en la encapsidación.	28
7. Evaluación de protocolo.	30
8. Caracterización microscópica de nanorreactores de la relación 1:9.	31
9. Evaluación de tres relaciones másicas para formación de nanorreactores.	31
10. Estabilidad temporal de nanorreactores 1:9.	32
11. Biotransformación de profármacos.	33
12. Cromatograma de ESI-MS de irinotecán.	34
13. Cromatograma de ESI-MS de doxorubicina.	35
14. Espectros de masas de los productos aislados de la reacción de la procarbazona y lacasa.	36
15. Resultado de la caracterización <i>in vitro</i> de MOLT-4.	38
16. Resultados de la citometría FDA/PI de la combinación con doxorubicina.	39
17. Resultados de la citometría FDA/PI de la combinación con irinotecán.	40
18. Resultados de la citometría FDA/PI de la combinación con procarbazona.	41
20. Representación de las poblaciones en distinto estadio celular de muerte.	42
21. Comparación de la estructura saLac.	44
22. Mecanismo propuesto para la oxidación de la procarbazona	52
23. Citogramas de controles para la tinción FDA/PI.	62
24. Citogramas de la doble tinción para determinar las poblaciones estadios celulares de muerte.	63

Lista de tablas

Tabla	Página
1 Parámetros para el análisis de la biotransformación por HPLC.....	17
2 Valores de la energía de afinidad aparente entre la lacasa de <i>C. gallica</i> y tres sustratos modelos de reacción.	25
3 Carga superficial de la lacasa de <i>C. gallica</i>	28
4 Constantes catalíticas obtenidas de la cinética de saturación con el modelo de Michaelis-Meten.....	29
5 Resumen de los parámetros obtenidos de la caracterización in vitro de MOLT-4	37

Capítulo 1. Introducción

1.1 Cáncer: Problemática de salud pública

El Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU. define al cáncer como la enfermedad celular por la cual se genera un crecimiento descontrolado (neoplasia) y la diseminación de dichas células a otras partes del cuerpo (metástasis). Esta enfermedad se ha definido con base a un conjunto de características distintivas, que han aumentado en su número desde que fueran establecidas por primera vez en el año 2000.

Inicialmente Hanahan y Weinberg propusieron seis propiedades para definir el cáncer, sin embargo, una década después, ellos mismos aumentaron cuatro más y para la última actualización de dichas características se enlistaron 14 características (Hanahan, 2022) (Figura 1).

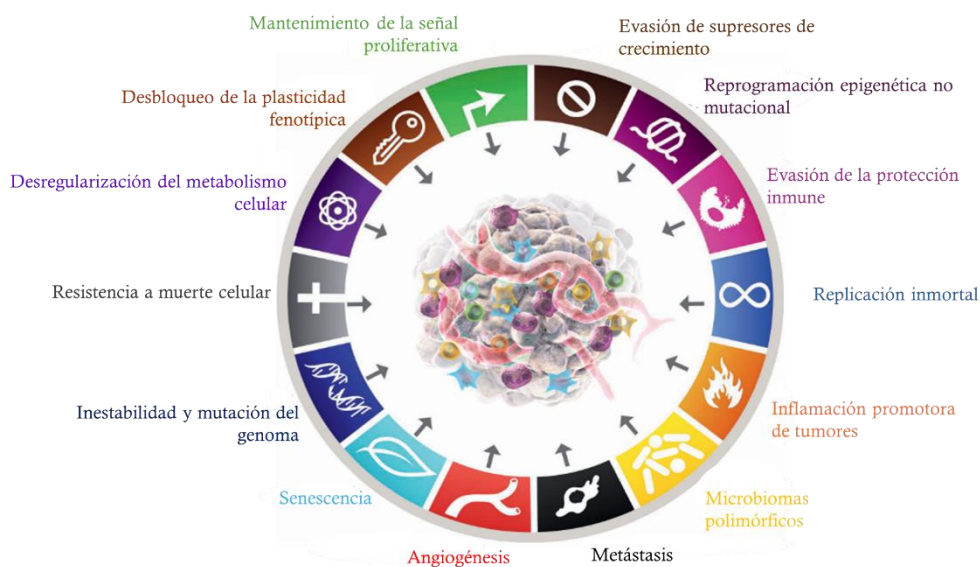


Figura 1. Características distintivas del cáncer. Figura tomada y traducida de Hanahan 2022

Dicha heterogeneidad en características físicas y moleculares, posicionan al cáncer como 1 de las 3 causas que lideran la muerte en 177 de 183 países, generando 1 de cada 6 muertes (16.8%) y 1 de cada 4 muertes por enfermedades no contagiosas (22.8%) (Bray et al., 2024).

Existen parámetros poblacionales para caracterizar esta enfermedad como la incidencia, la cual se define como el número de nuevos caso de manera anual; y la mortalidad dada por el número de muertes asociadas para esta enfermedad.

En 2024 la incidencia global del cáncer fue de 19,964,811 casos representando el 0.25% de la población mundial mientras que la mortalidad reportada fue de 9,736,779 caso lo cual equivale 0.12% de la población mundial, por otro lado, para nuestro país, la incidencia en el mismo año fue de 207,154 casos (0.16% de la población nacional) y la mortalidad fue de 96,210 (0.77% de la población nacional) (Bray et al., 2024).

Existen varios tratamientos para el cáncer, entre ellos la quimioterapia, la cual se basa en la administración sistémica de un agente citotóxico el cual podría carecer de selectividad, generando efectos secundarios que afectan negativamente a la calidad de vida del paciente. Por lo tanto, la investigación y desarrollo de agentes terapéuticos más específicos y menos tóxicos, ha ganado prioridad en los años más recientes (Wang et al., 2021).

Para minimizar la citotoxicidad inespecífica, los fármacos quimioterapéuticos han sido diseñados como profármacos, los cuales deben de ser transformados dentro del cuerpo del paciente para adquirir su capacidad citotóxica, dicha transformación es realizada principalmente por una familia de enzimas llamadas citocromos P450 (CYP450) (Huttunen et al., 2008; Xu & Mcleod, 2001).

El genoma humano contiene alrededor de 57 genes codificantes de enzimas tipo CYP450, siendo una tercera parte los relacionados con el metabolismo de los xenobióticos. Estas proteínas se encuentran en mayor concentración en el hígado e intestino, sin embargo, también se encuentran en menores concentraciones en riñón, cerebro, pulmones, testículos, piel y bazo (de Montellano, 2013).

Las enzimas CYP450 tienen una gran diversidad de reacciones catalíticas, como son: la hidroxilación, desalquilación, oxigenación y epoxidación, siendo las más comunes. Mientras que las más inusuales que también pueden llevarse a cabo son reducción, deshidrogenación, ruptura oxidativa de estrés, engolamiento y formación de anillos, ruptura de aldehídos, oxidación por un electrón, entre otros, sin embargo, la principal reacción que se lleva a cabo en la activación de profármacos es la oxidación del sustrato por medio de una reacción de monooxigenación y el mecanismo de esta reacción está ampliamente descrito en la literatura (Guengerich, 2001; Mansuy, 1998).

Adicionalmente a lo anterior, existen reportes que demuestran la disminución de la expresión de los CYP450 en tejido tumoral y tejido no tumoral adyacente al tumor (Zhao et al., 2012), siendo una de las principales causas de la baja especificidad del uso de profármacos; es por esto por lo que la búsqueda de alternativas para la activación de estos profármacos es una nueva estrategia para mejorar el tratamiento del cáncer.

Basándonos en que la principal reacción que se lleva a cabo para la activación de profármacos es la oxidación de estas moléculas, proponemos un tratamiento combinado utilizando la enzima oxidorreductasa, lacasa, como agente terapéutico con la capacidad de oxidar una gran variedad de sustratos, y de esta manera hacer más eficiente la activación de profármacos y presentar un efecto antitumoral.

Por lo que en dicho trabajo se abordará la hipótesis del uso de este tipo de enzimas como agente activador de profármacos y que adicionalmente a este efecto, pueda llegar a presentar un efecto propio contra células cancerosas, aportándole adicionalmente un efecto anticancerígeno.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Lacasas

Las lacasas son enzimas que se encuentran en bacterias, hongos, plantas e insectos, estas tienen aplicación en la biorremediación, debido principalmente a la degradación de colorantes, pesticidas, compuestos fenólicos, hidrocarburos aromáticos, antibióticos y fármacos presente en suelos y aguas (Arregui et al., 2019).

Siendo un campo altamente estudiado la biorremediación de fármacos, siendo esta aplicación un lado de la moneda, ya que se ha demostrado la disminución de estas moléculas en muestras ambientales utilizando lacasa, sin embargo, la caracterización de los productos de dicha reacción se desconoce, esbozando un nuevo potencial farmacológico después de la biotransformación.

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas que contienen átomos de cobre en su sitio activo los cuales son esenciales en el proceso de oxidación de compuestos orgánicos y como resultado del ciclo catalítico reducen oxígeno para formar moléculas de agua (Figura 2).

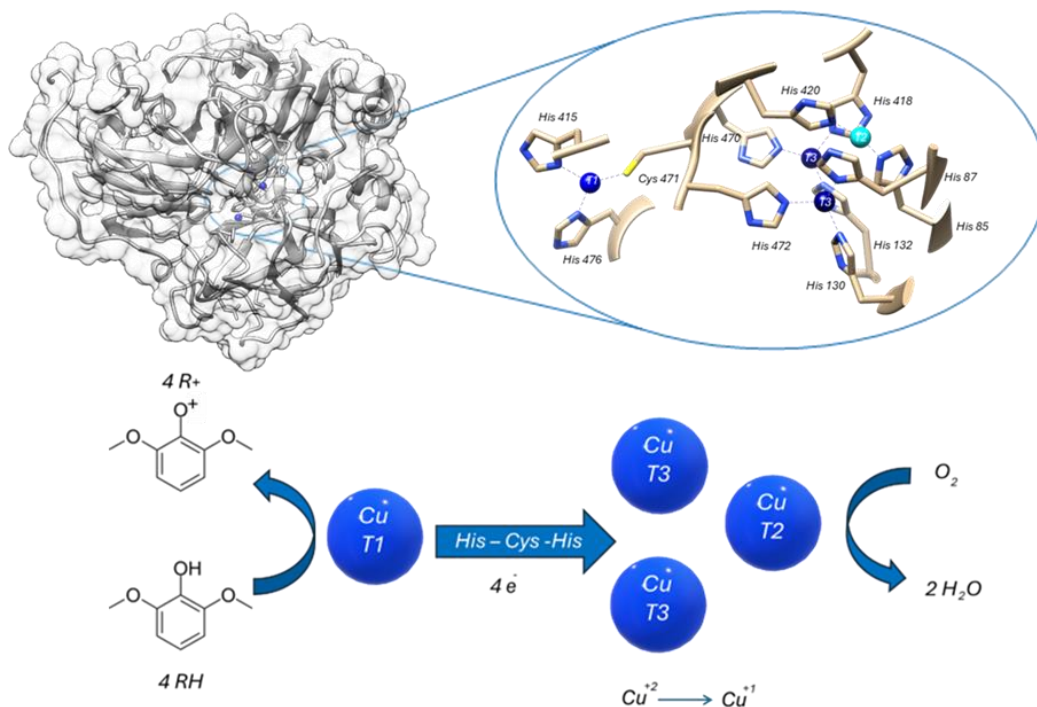


Figura 2. Estructura cristalográfica de lacasa de *Corioloipsis gallica* (PDB 4A2E). La estructura proteínica se encuentra de color gris y los átomos de cobre se representan con esferas azules. De lado derecho se encuentra un acercamiento del sitio catalítico donde se visualizan los átomos de cobre coordinados con sus respectivas histidinas y en la parte inferior de la imagen, se esquematiza la reacción general de oxidorreducción que se cataliza con esta enzima

El ciclo catalítico está mediado por 4 átomos de cobre que son clasificados en función a sus características espectrofotométricas, teniendo un átomo de cobre llamado T1, el cual realiza la sustracción de un electrón del sustrato para iniciar la oxidación y tiene un máximo de absorbancia a 600 nm, esta característica es la responsable de que estas proteínas presenten su color azul; adicionalmente se encuentran tres átomos de cobre, uno clasificado como T2 y dos como T3.

Estas enzimas contienen un núcleo bimetálico de cobre, el cual es denominado T3, en esta zona es donde llegan los electrones procedentes de la oxidación del sustrato que se trasladan desde el T1 a través de la coordinación de las histidinas y la cisteína en esta región.

Cuando los electrones llegan a esta zona T2/T3, se lleva a cabo la reducción del oxígeno molecular para la formación de moléculas de agua, el balance general indica que se requieren 4 electrones para la reducción

de un átomo de oxígeno y, por lo tanto, para la formación de dos moléculas de agua; haciendo que la reducción del oxígeno dependa directamente del poder redox del T1.

Considerando que las lacasas son unas de las enzimas con mayor potencial redox, por lo que estas proteínas son ideales para la oxidación de una variedad muy amplia de compuesto orgánicos, como los profármacos (Jones & Solomon, 2015; Román et al., 2010).

Por otro lado, las aplicaciones en área biomédica de las enzimas tipo lacasa son muy pocas, por lo que representa un área de oportunidad para encontrar nuevas rutas de biotransformación de fármacos incluso de metabolización.

La lacasa al ser una enzima que oxida un sustrato y reduce oxígeno molecular a agua, representa una ruta de activación de profármacos debido a que la reacción principal que catalizan las enzimas CYP450, son oxidaciones.

Los reportes para el uso de una lacasa para fines terapéuticos son muy pocos, sin embargo, ya se ha reportado que al utilizar ciertos compuestos orgánicos como hidroquinonas (Wellington & Kolesnikova, 2012), catecol y cumarina (Qwebani-Ogunleye et al., 2017) como sustratos en reacciones catalizadas por lacasa, se generan compuestos que fueron aislados, purificados, caracterizados y evaluados presentando una mayor actividad citotóxica evaluada sobre líneas tumorales de cáncer que el sustrato sin transformación enzimática.

Por otro lado, la inmovilización de un agente terapéutico es una propuesta con evidencia que demuestra un incremento en su efecto por lo que la inmovilización de enzimas como la lacasa, puede ser un mecanismo que potencie el posible efecto terapéutico (Arca-Ramos et al., 2016; P. S. Chauhan et al., 2019; Galliker et al., 2010; Silva-Torres et al., 2019; Vandertol-Vanier et al., 2002). Sin embargo, esta ruta con fines biomédicos ha sido vagamente explorando.

Existen reportes en donde se ve un efecto positivo en la citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales, por ejemplo, al generar micro geles dependientes del pH (Majerská et al., 2019), al inmovilizar lacasa sobre nanotubos de carbono (Min et al., 2018), o sobre nanopartículas de plata (Chauhan et al., 2019), siendo este último el que abre el camino al uso de sistemas nanométricos.

1.2.2 Nanomedicina

La nanomedicina es el área emergente de la nanotecnología aplicable a la medicina que propone mejoras en los tratamientos terapéuticos usando plataformas nanométricas para transportar y entregar fármacos o compuestos terapéuticos.

Estos nanovehículos han sido enfocados al tratamiento del cáncer, mediante la creación de sistemas de entrega de compuestos terapéuticos, específicamente dirigidos a células tumorales (Meel et al., 2019). Entre estos esfuerzos existe el confinamiento de enzimas en nanoplateformas con el objetivo de que sean entregadas de manera intracelular.

Este mecanismo genera una ventaja sustancial con respecto al tratamiento sistémico, ya que al tener focalizada la reacción enzimática en un ambiente intracelular específico, los beneficios del agente terapéutico se mantienen y se disminuyen los efectos secundarios asociados a la poca especificidad.

Los trabajos actuales se centran en las nanopartículas liposomales y poliméricas, pero están surgiendo nuevas investigaciones sobre la ingeniería de cápsides virales como nanopartículas proteicas no infecciosas, denominadas partículas similares a virus (VLP) (Chauhan et al., 2018; Sánchez-Sánchez et al., 2014, 2015; Tapia-Moreno et al., 2017).

Las VLPs son nanopartículas autoensambladas y homogéneas derivadas de las proteínas de cubierta de las cápsides virales. Ellas carecen de su genoma natural y, por tanto, no son infecciosas. Las VLP son una clase emergente de vehículos de administración dirigida con el potencial de superar las limitaciones de otras nanopartículas.

En los últimos años, varios grupos han demostrado que las VLP pueden empaquetar y administrar cargas terapéuticas como fármacos quimioterapéuticos, ARNsi, aptámeros de ARN, proteínas y péptidos (Rohovie et al., 2017).

Las VLP de virus de planta han recibido menos atención en comparación con los complejos virales de bacteriófagos y mamíferos. Sin embargo, debido a su fácil producción, manipulación y estructura simple, los virus de plantas resultan atractivos para algunas aplicaciones biomédicas. Los bromovirus, como el virus del mosaico clorótico de caupí (CCMV) o el virus del mosaico del bromo (BMV), se han propuesto

como bionanopartículas para el desarrollo de plataformas de administración de fármacos en diversas terapias y como agentes de diagnóstico por imagen, especialmente en cáncer (Nuñez-Rivera et al., 2020).

Las cápsides de estos virus son estructuras que resultan del ensamblaje de 180 proteínas idénticas con simetría T=3, formando una cápsula icosaédrica con un diámetro de 28 nm. La región N-terminal de la proteína de la cápside es altamente básica y está cargada positivamente, lo que facilita la unión al genoma de ARN viral (Cadena-Nava et al., 2012).

Además, esta proteína de la cápside tiene la capacidad de confinar moléculas aniónicas, tales como ARN heterólogos (Azizgolshani et al., 2013), enzimas (Sánchez-Sánchez et al., 2014), fármacos (Tscheuschner et al., 2023) o nanopartículas de oro (Sun et al., 2007), gracias a la complementariedad de carga. También es posible dirigir estas cápsides hacia células específicas mediante la funcionalización de su superficie externa (Gillitzer et al., 2002).

Mencionado todo lo previo, en este trabajo se investigó el potencial de la lacasa de *Coriolopsis gallica* como enzima oxidorreductasa, similar al CYP450, en la activación de profármacos y a su vez, comprobar que esta enzima al ser confinada dentro de las VLPs de BMV mantendrá su perfil catalítico de oxidación y presentará un potencial efecto antitumoral al ser evaluado sobre líneas celulares de cáncer y líneas celulares sanas.

1.3 Hipótesis

La lacasa de *Coriolopsis gallica* nanoconfinada en cápsides virales tendrá un efecto antitumoral y activará profármacos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Confinar la lacasa de *Coriolopsis gallica* en nanopartículas derivadas de virus y evaluar su potencial como agente antitumoral y como activador de profármacos.

1.4.2 Objetivos específicos

- Estudiar de manera *in silico* la posible activación de los profármacos por la oxidación mediada por lacasa.
- Caracterizar catalíticamente la lacasa de *Coriolopsis gallica*.
- Diseñar, producir, purificar y caracterizar los nanorreactores con actividad lacasa.
- Caracterizar la transformación de diferentes profármacos catalizados por lacasa.
- Evaluar *in vitro* la citotoxicidad de los nanorreactores en presencia de profármacos
- Analizar la respuesta celular al tratamiento combinado de nanorreactor y profármaco.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Análisis *in silico*

Con el objetivo de identificar los residuos involucrados en las interacciones entre la lacasa de *Coriolopsis gallica* y tres sustratos modelo (ABTS, siringaldazina y guayacol), se realizó un acoplamiento molecular rígido utilizando AutoDock Vina, seguido de un análisis detallado de las interacciones mediante el programa LigPlot+.

2.1.1 Preparación de la proteína receptora

La estructura tridimensional de la lacasa fue obtenida desde el Protein Data Bank (PDB), seleccionando la estructura con el código 4A2H de *Coriolopsis gallica* disponible con una resolución de 1.84 Å. La preparación estructural se llevó a cabo con el programa chimera (Pettersen et al., 2004), mediante el cual se eliminaron todas las moléculas de agua y ligandos no relacionados con la actividad enzimática, posteriormente se minimizó la estructura.

Además, en el programa AutoDock Tools (ADT), se adicionaron hidrógenos polares para permitir una adecuada representación de las interacciones de tipo puente de hidrógeno. Se asignaron las cargas parciales tipo Gasteiger y la proteína se guardó en formato PDBQT. Dado que el enfoque fue un *docking* rígido, no se definieron residuos flexibles dentro del sitio activo; la proteína se mantuvo completamente rígida durante todo el proceso de acoplamiento.

2.1.2 Preparación de los sustratos modelo

Las estructuras de los tres sustratos seleccionados fueron descargados desde la base de datos PubChem en formato SDF. Posteriormente, fueron convertidos a formato MOL2 para la minimización de sus energías; Una vez optimizadas, las estructuras fueron importadas a AutoDock Tools, donde se definieron los enlaces rotables y se asignaron las cargas parciales correspondientes. Finalmente, cada ligando fue guardado en formato PDBQT.

2.1.3 Definición de la caja de búsqueda (grid box)

El sitio activo de la lacasa fue identificado en función de la localización de los átomos de cobre involucrados en el mecanismo catalítico, así como de la información estructural disponible en la literatura. Se definieron las coordenadas del centro de la caja de búsqueda de modo que abarcara completamente el centro catalítico y los residuos circundantes; las coordenadas del centro de la caja fueron $x=6.36$, $y=-21.71$ y $z=-26.73$, mientras que la longitud en cada eje fue de 40 Å.

El tamaño de la caja fue ajustado para cubrir adecuadamente la región catalítica, permitiendo a cada sustrato modelo explorar orientaciones posibles dentro del sitio activo. Las dimensiones y coordenadas fueron especificadas en el archivo de configuración para AutoDock Vina.

2.1.4 Acoplamiento rígido

El acoplamiento molecular se realizó empleando AutoDock Vina, conservando la rigidez tanto de la proteína como de los ligandos. Esto se logró definiendo cero grados de libertad rotacional para los ligandos en los archivos PDBQT generados, y sin especificar residuos flexibles en la proteína. Para cada sustrato, se generó un archivo de configuración individual, incluyendo las coordenadas de la caja de búsqueda, el número de posiciones de acoplamiento (establecido en 10) y un valor de exhaustividad de 8.

Las simulaciones se llevaron a cabo en una estación de trabajo con capacidad de cómputo adecuada, obteniéndose como resultado una serie de posibles conformaciones de acoplamiento, ordenadas por energía libre de afinidad (ΔG en kcal/mol).

2.1.5 Análisis de interacciones proteína–ligando

Las conformaciones con menor energía de acoplamiento (ΔG más negativas) fueron seleccionadas como más favorables para cada sustrato. Estas estructuras fueron visualizadas inicialmente en UCSF Chimera para confirmar su ubicación en el sitio activo y verificar su orientación. Posteriormente, se utilizó el programa LigPlot+ para generar representaciones bidimensionales de las interacciones entre los sustratos y los residuos del sitio activo. Para ello, los complejos proteína–ligando seleccionados fueron convertidos

a formato PDB y analizados en LigPlot+, el cual identifica de forma automática las interacciones de tipo puente de hidrógeno y contactos hidrofóbicos relevantes.

El análisis permitió identificar los residuos involucrados directamente en la estabilización de cada sustrato dentro del sitio catalítico de la lacasa, proporcionando información clave sobre la complementariedad estructural y la afinidad potencial de cada uno. Estos resultados fueron utilizados para establecer los residuos involucrados y proceder al Docking flexible.

2.1.6 Preparación de los ligandos

Los ligandos para evaluar fueron obtenidos desde la base de datos PubChem en formato SDF. A continuación, las estructuras moleculares fueron minimizadas y se identificaron los enlaces simples que permiten rotación libre, esenciales para permitir la flexibilidad del ligando durante el proceso de acoplamiento con AutoDock Tools, se añadieron hidrógenos y se asignaron cargas parciales, guardando finalmente cada ligando en formato PDBQT.

Los ligandos utilizados para esta etapa fueron ABTS, siringaldazina, guayacol, Ifosfamida, flutamida, dacarbacina, fluracilo, tamoxifeno, irinotecán, doxorubicina y procarbazona.

2.1.7 Configuración y ejecución del acoplamiento flexible

Para la simulación de acoplamiento flexible, se utilizó AutoDock Vina, el cual permite un tratamiento flexible de los ligandos y los residuos seleccionados, el resto de la proteína se mantuvo rígida durante el proceso, los ligandos fueron considerados completamente flexibles en sus enlaces rotables previamente definidos.

Se generó un archivo de configuración .txt que incluía las rutas a los archivos PDBQT de proteína rígida, los residuos flexibles de la proteína y el ligando, las coordenadas de la caja de búsqueda, el tamaño de esta en los ejes X, Y y Z, y otros parámetros como el número de posiciones de acoplamiento (configurado a 10) y una exhaustividad de 8.

Las simulaciones se ejecutaron en una estación de trabajo con sistema operativo Linux, y cada corrida generó un archivo de salida con las diferentes conformaciones posibles del ligando unido a la proteína, ordenadas por afinidad de unión (kcal/mol).

2.1.8 Análisis de los resultados

Las conformaciones resultantes de cada acoplamiento fueron analizadas en función de su energía libre de unión, seleccionando aquellas con los valores más negativos como las más probables desde el punto de vista termodinámico. Con estos resultados se analizó el posicionamiento del sustrato, su energía de afinidad y la distancia entre el átomo donador de cada ligando y el átomo de cobre T1.

2.2 Purificación y funcionalización de lacasa.

La lacasa de *Coriopsis gallica* UAMH 8260 fue producida como se reportó previamente (Román et al., 2010) y almacenada en glicerol al 50% a -80°C. Antes de su uso, la enzima se dializó contra un tampón fosfato 100 mM a pH 6 para eliminar el glicerol, y se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR, GE Healthcare), recogiendo selectivamente las fracciones centrales para obtener proteína con la máxima pureza posible, la cual fue evaluada mediante electroforesis SDS-PAGE y visualizada con tinción azul de Coomassie. Toda la proteína utilizada para la realización de este proyecto fue donada por la Dra. Marcela Ayala Aceves.

2.3 Caracterización de la lacasa

Para evaluar la actividad catalítica se utilizó el protocolo publicado por Silva-Torres y colaboradores en 2019, que consiste en un ensayo colorímetro monitoreado por espectrofotometría. Se utilizó como sustrato el 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) en una concentración de 50 μ M en un amortiguador de acetatos 100 mM a un pH de 4.5. Esta reacción fue monitoreada por el incremento de la absorbancia a una longitud de onda de 436 nm y un coeficiente de extinción de 29,300 $M^{-1} cm^{-1}$ (Wolfenden & Willson, 1982). Las condiciones de del buffer se replicaron para la evaluación de actividad usando siringaldazina y guayacol; para siringaldazina se monitoreó a 530 nm y un coeficiente de extinción de

64,000 M⁻¹ cm⁻¹ (Chefetz et al., 1998; Tinoco et al., 2001) y para el guayacol se monitoreo a 470 nm a y un coeficiente de extinción de 26,600 M⁻¹ cm⁻¹ (DePillis et al., 1991).

La unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto bajo condiciones estándar.

2.4 Modificación superficial de lacasa

Para la modificación de la carga superficial de la proteína, la funcionalización se realizó siguiendo el protocolo descrito por Klapper y Klotz en 1972. La funcionalización se realizó utilizando anhídrido succínico en un tampón de borato, manteniendo el pH entre 9.0 y 9.5 mediante la adición de NaOH. La proporción enzima/anhídrido succínico utilizada fue de 1:50 (p/p) (Klapper & Klotz, 1972). La reacción se finalizó con la adición de tampón acetato a pH 4.5. Finalmente, la proteína se recuperó mediante diafiltración la cual se realizó por centrifugación utilizando un filtro de 10 kDa.

2.5 Purificación de proteína de BMV

Inicialmente, se purificó el virus a partir de plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) previamente infectadas con el virus del mosaico del bromo (BMV) siguiendo el protocolo descrito por Nuñez-Rivera et al. (2020). Una vez obtenido el virus aislado, se purificó la proteína de la cápside siguiendo el protocolo descrito por Cadena-Nava et al. (2012).

En resumen, los viriones de BMV se dializaron contra tampón de desensamble (0.5 M CaCl₂, 50 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA) a 4°C durante 24 horas utilizando una membrana de 14 kDa (Spectrum Laboratories). Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga Thermo Scientific™ Micro CL17R para obtener una fracción libre de ARN.

Esta fracción soluble se ultracentrifugó a 40,000 rpm durante 90 min a 4°C en una ultracentrífuga Beckman Coulter Optima XPN-100 con un rotor de ángulo fijo 90-Ti. El sobrenadante se dializó inmediatamente contra tampón de almacenamiento de proteínas (1 M NaCl, 20 mM Tris, pH 7.2). La fracción resultante contenía la proteína de cubierta (CP) purificada. La concentración y pureza de la CP se evaluaron mediante espectrofotometría UV-Vis en un Nanodrop 200c (Thermo Scientific™).

Sólo se utilizaron fracciones con una relación A_{260}/A_{280} de 0.6 a 0.8 para la producción y purificación enzimática del nanorreactor, ya que esta relación nos indica la proporción entre RNA y proteína, lo que se traduce en la pureza de dicha proteína.

2.6 Producción y purificación de nanorreactores

Los nanorreactores enzimáticos (VLP-Lac) se produjeron encapsidando lacasa nativa o modificada dentro de VLP's de BMV. Este protocolo se realizó basándose en todos los reportes previos y generando un proceso nuevo en donde se acoplan las fases de síntesis y purificación, dicho protocolo se esquematiza en la figura 3.

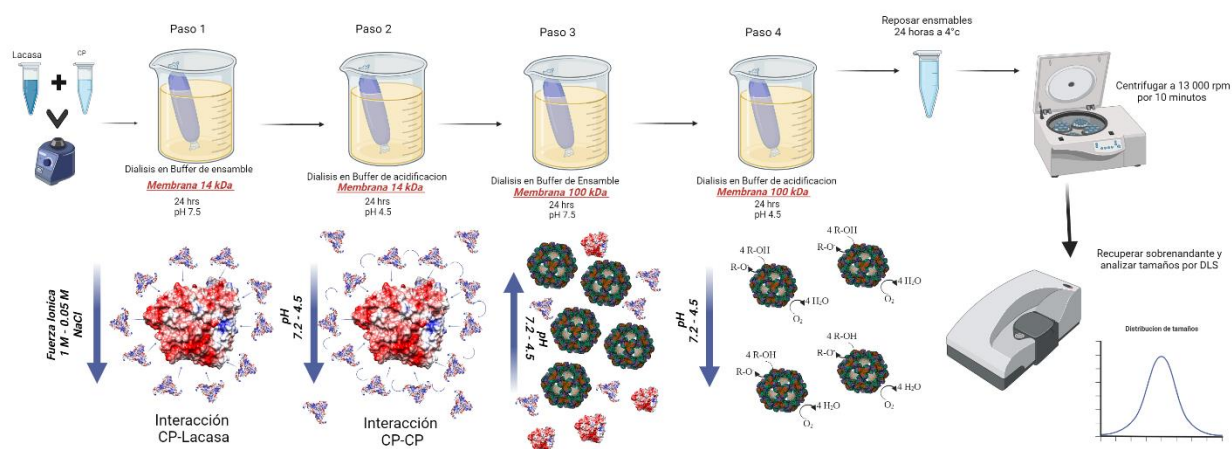


Figura 3. Esquema del protocolo de ensamblaje y purificación de nanorreactores.

El protocolo inicia con la mezcla de lacasa y proteína de capa según la relación másica que se desea evaluar; la mezcla de proteínas fue disuelta en un tampón de almacenamiento de proteínas (1 M NaCl, 20 mM Tris, pH 7.2) e incubada a 4°C en agitación rotacional por una hora, posteriormente a esto fue dializada contra un tampón de ensamble (50 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris, pH 7.2) durante 24 horas a 4°C.

Posteriormente, la mezcla se sometió a diálisis contra un tampón de acidificación (50 mM de acetato de sodio y 8 mM de acetato de magnesio, pH 4.5) durante 24 horas a 4°C para inducir la formación de la cápside en presencia de moléculas de lacasa. Para este proceso de diálisis en dos pasos, se empleó una membrana de 14 kDa (Spectrum Laboratories).

A continuación, la etapa de purificación consistió en el uso de una membrana de 100 kDa para realizar dos diálisis secuenciales, la primera contra el buffer de ensamble y la segunda contra el buffer de acidificación, ambos pasos se dejaron a 4°C por 24 horas. Por último, para eliminar los agregados, la suspensión de nanorreactores se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrifugadora Thermo Scientific™ Micro CL17R, y el sobrenadante se pasó por un filtro de 0.22 µm (Verex Vial; Phenomenex) para obtener nanorreactores purificados.

2.7 Cuantificación de proteína y actividad enzimática de nanorreactores

La actividad de la lacasa para la enzima libre y los nanorreactores enzimáticos se estimó espectrofotométricamente un buffer de acetatos 100 mM a pH 4.5. La oxidación de ABTS se monitorizó a 436 nm ($\epsilon_{436} = 29,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La proteína total se determinó con el Pierce™ BCA Protein Assay utilizando albúmina de suero bovino como estándar de proteína y el protocolo mejorado, el cual consiste en realizar la dispersión de la muestra en la solución del kit y dejar incubar las muestras por 30 minutos en un horno a 60°C. Una unidad de lacasa se define como la proteína necesaria para oxidar 1 µmol de ABTS por minuto

2.8 Caracterización morfológica y fisicoquímica de nanorreactores

La morfología y el tamaño del nanorreactor purificado se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM, Hitachi modelo SU8230) operada a 30 kV. Antes del análisis STEM, las partículas se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2%.

Adicionalmente se utilizó la dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés) para determinar el diámetro hidrodinámico de nuestras partículas, esta técnica se base en la medición del movimiento browniano a través de las fluctuación en la intensidad de un haz de luz, dichas fluctuación en la dispersión de luz están directamente relacionados con el tamaño de la partícula, por otro lado, la determinación de la carga superficial fue obtenido el potencial Zeta de nuestras partículas, ambas técnicas se realizaron en el Zetasizer Nano (Nano-ZS, Malvern Instruments).

2.9 Biotransformación de profármacos

2.9.1 Preparación de soluciones estándar de fármacos

Para la evaluación de la biotransformación de la enzima lacasa, se seleccionó una serie de profármacos en función a su estructura y sus grupos funcionales susceptibles a oxidación, los cuales, principalmente son hidroxilos y grupos aminas; dichos profármacos se tomaron de la publicación de Huttunen (2008); estos profármacos fueron ifosfamida, flutamida, dacarbacina, tegafur, tamoxifeno, irinotecán, doxorubicina y procarbazona.

Las soluciones madre de cada fármaco se prepararon siguiendo las indicaciones del proveedor, con una concentración inicial de 1 mg/mL. Estas soluciones fueron posteriormente diluidas en buffer de reacción para alcanzar concentraciones de trabajo típicas de 200 μ M. Los compuestos fueron adquiridos en su forma pura a partir de proveedores certificados y almacenados a condiciones controladas hasta su uso experimental.

2.9.2 Condiciones de reacción para la biotransformación

Las reacciones de biotransformación se llevaron a cabo en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, en un volumen final de 0.5 mL, conteniendo el fármaco a una concentración de 200 μ M y lacasa a una concentración de 5 U/mL. Las reacciones se realizaron en buffer acetato (100 mM, pH 4.5) y se mantuvieron en agitación constante e incubación a 37°C durante tiempos variables (0.5, 2.0 y 24 hrs) para monitorear el progreso de la reacción, se incluyeron controles sin enzima (blancos). Al finalizar el tiempo de incubación, se procedió a su análisis por HPLC.

2.9.3 Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El análisis de los productos de biotransformación se realizó en un sistema de HPLC Agilent serie 1100 equipado con bomba cuaternaria, sistema de inyección automática y detector UV-Vis.

Condiciones cromatográficas estándar:

- **Columna:** Supelco Discovery© C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm)
- **Fase móvil:** Buffer A (agua con 0.1% ácido trifluoroacético) y Buffer B (acetonitrilo con 0.1% ácido trifluoroacético).
- **Método:** Gradiente de 0 al 100% de Buffer B por 30 minutos.
- **Flujo:** 1.0 mL/min
- **Detección:** entre 203–370 nm, dependiendo del fármaco analizado
- Volumen de inyección: 10 µL

Se utilizaron estándares de referencia para cada fármaco, permitiendo la comparación de tiempos de retención y la cuantificación mediante curvas de calibración. La aparición de picos adicionales en los cromatogramas, ausentes en los controles, fue interpretada como evidencia de biotransformación. La cuantificación de los productos fue realizada por integración del área bajo la curva, y los datos fueron expresados como porcentaje de conversión en relación con el fármaco original. Las condiciones específicas para cada fármacos se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 1 .Parámetros para el análisis de la biotransformación por HPLC.

Fármaco	λ detección (nm)	Tiempo de retención (min)
Ifosfamida	203	13.30
Flutamida	230	17.22
Dacarbacina	370	9.9
Tegafur	266	4.0
Tamoxifeno	260	17.60
Irinotecán	220	13.35
Doxorrubicina	230	13.55
Procarbazina	260	10.90

2.9.4 Identificación de productos de transformación

En caso de detectarse picos nuevos con tiempos de retención consistentes, se procedió a recolectar las fracciones correspondientes mediante recolección manual. Estas fracciones fueron posteriormente analizadas por espectroscopía UV y eventualmente por espectrometría de masas (LC-ESI-MS y GC-MS.) para una identificación del peso molecular y la naturaleza química de los productos.

Los productos de la transformación de la lacasa se analizaron por LC-MS en un sistema de cromatografía líquida Agilent 1260 acoplado a un espectrómetro de masas Thermo LCQdeca. La fuente de ionización química atmosférica (APCI) funcionó en modo de iones positivos. Se utilizó una columna Waters XBridge BEH C18 (ID 2.1 mm × longitud 50 mm, tamaño de partícula 2.5 µm) para la separación LC utilizando agua con 0.1 % de ácido fórmico como fase móvil A y metanol como fase móvil B. El caudal LC se fijó en 0.30 mL/minuto. Este análisis se realizó en la Molecular Mass Spectrometry Facility de la Universidad de California en San Diego.

2.10 Análisis *in vitro*

2.10.1 Mantenimiento de células MOLT-4

La línea celular MOLT-4, correspondiente a células T humanas derivadas de leucemia linfoblástica aguda, fue adquirida de un banco celular certificado (ATCC MOLT-4-CRL-1582) y mantenida en condiciones estériles en una cabina de bioseguridad clase II. Las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con:

- 10% de suero fetal bovino (FBS)
- 1% de penicilina-estreptomicina (100 U/mL y 100 µg/mL)
- 2 mM de L-glutamina.

Las células fueron mantenidas en incubadora a 37°C, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, en frascos de cultivo tipo T-25. El medio fue renovado cada 2–3 días, y las células fueron sub-cultivadas cuando alcanzaron una densidad celular de $1.5 - 2.0 \times 10^6$ células/mL. La viabilidad celular para los estudios de citotoxicidad se realizó utilizando el rojo neutro como indicador, el protocolo que continuación se describe ya ha sido reportando previamente (Repetto et al., 2008).

2.10.2 Curva de calibración de rojo neutro.

Para establecer una relación cuantitativa entre el número de células viables y la absorbancia a 540 nm (longitud de onda característica del rojo neutro), se generó una curva de calibración. Se sembraron distintos números de células en placas de 96 pozos.

Luego se incubaron durante 4 h con medio suplementado con rojo neutro (concentración final 40 µg/mL), terminado la incubación la placa se centrifugó por 7 minutos a 120 g, se removió el medio y las células se lavaron con PBS al menos dos veces; se solubilizó el colorante internalizado por lisis celular con una solución de Etanol: Ácido acético: agua (5:1:4), la absorbancia se midió a 540 nm.

Los datos obtenidos se graficaron como absorbancia frente al número de células, obteniendo una curva de regresión lineal ($r^2 > 0.98$). Esta curva permitió convertir las lecturas de absorbancia de los ensayos de citotoxicidad en estimaciones relativas del número de células viables.

2.10.3 Evaluación de citotoxicidad y estimación de IC₅₀ con rojo neutro.

Para conocer los valores de IC₅₀ de cada uno de los elementos involucrados en el sistema nanorreactor – fármaco, se realizaron curvas de dosis respuesta de los fármacos a evaluar y de la lacasa, esto se realizó sembrando 5×10^5 células MOLT-4 por pozo en placas de 96 pozos (100 µL/pozo), se evaluó una serie amplia de concentraciones de los fármacos y de lacasa, las células se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Los tratamientos se realizaron por triplicado y los controles incluidos fueron PBS y DMSO (10 % final), así como un control blanco (medio sin células).

Al finalizar la incubación con los compuestos, se adicionaron 20 µL de solución de rojo neutro a cada pozo (concentración final 40 µg/mL) y se incubaron 4 h. Posteriormente, se eliminó el medio y se lavaron con

PBS. El colorante absorbido se liberó añadiendo 100 μ L de solución de lisis y la absorbancia se midió a 540 nm usando un lector de microplacas.

Al tener el valor de absorbancia de cada punto evaluado, se restó el valor del control blanco y utilizó la regresión lineal para calcular el número de células viables en cada condición y se calculó el porcentaje de viabilidad usando la siguiente formula:

$$Viabilidad\ relativa\ (\%) = \left(\frac{\# Células_{muestra}}{\# Células_{PBS}} \right) * 100 \quad (1)$$

Estos datos de viabilidad relativa (%) se graficaron contra la concentración logarítmica de los fármacos y la lacasa para tener la curva dosis-respuesta. El ajuste de curvas se realizó mediante un modelo logístico de cuatro parámetros (4PL), utilizando software especializado GraphPad Prism definido por la ecuación:

$$Y = b + \frac{t - b}{1 + \left(\frac{X}{IC_{50}} \right)^{HillSlope}} \quad (2)$$

donde Y es la viabilidad relativa, X la concentración, t y b los valores máximos y mínimos de viabilidad, $HillSlope$ la pendiente de la curva, e IC_{50} . El ajuste fue considerado adecuado si el coeficiente de determinación (R^2) fue igual o superior a 0.95. El valor de IC_{50} fue reportado en μ M, con su respectivo intervalo de confianza (IC 95%).

2.11 Evaluación de viabilidad por citometría

Conociendo las curvas de dosis respuesta de los fármacos a evaluar, así como de la lacasa libre, se procedió a estimar la viabilidad de los tratamientos combinados, con el objetivo evidenciar el efecto sinérgico entre el fármaco y la lacasa (libre y nanorreactor), se estableció utilizar los valores IC_{20} de cada uno de los elementos para dar rango a una mayor citotoxicidad.

Esta estimación se realizó mediante citometría de flujo con doble tinción directa, tinción de células vivas con diacetato de fluoresceína (FDA) y tinción de células muertas con yoduro de propidio (PI). Los controles para este experimento establecidos fueron:

- Control positivo de viabilidad: PBS
- Control positivo de muerte: DMSO (20% final)
- Fármaco IC₂₀ (nM)
- Lacasa libre IC₂₀ (U/mL)
- VLP-saLac (misma concentración que lacasa libre en U/mL)
- Virus (misma concentración de proteína total de nanorreactores)

Con el objetivo de extrapolar las condiciones previamente evaluadas en las placas de 96 pozos, se escaló a la placa de 24 pozos para el tratamiento de mayor número de células, lo cual es crucial para el análisis por citometría. Para este ensayo se sembraron un total de 5×10^5 células en 500 microlitros de medio, se dejaron reposar por 16 horas y posterior a esto, los tratamientos correspondientes se añadieron al pozo por un tiempo de 24 horas.

Al concluir el tiempo de incubación, las células se cosecharon y lavaron con PBS a temperatura ambiente dos veces, esto se realizó con 1 mL de PBS y una centrifugación a 200 g por 5 minutos. Al concluir este paso, las células se tiñeron con diacetato de fluoresceína (FDA) a una concentración de 40 nM final y se dejaron incubando a temperatura ambiente por al menos 30 minutos, pasado este tiempo se le agregó a las muestras correspondientes yoduro de propidio (PI) a una concentración final de 10 µg/mL, he inmediatamente se procedió a su lectura en el citómetro.

De manera adicional se realizó la matriz de compensación de fluorescencia para establecer y contrarrestar el solapamiento entre los espectros de fluorescencia de ambos colorantes. Todos los datos obtenidos fueron procesados con el software propio del equipo. El porcentaje de Viabilidad se determinó usando la siguiente ecuación.

$$Viabilidad\ relativa\ (\%) = \left(\frac{Eventos\ FDA^+ / PI^-}{Eventos\ totales - Eventos\ FDA^- / PI^-} \right) * 100 \quad (3)$$

2.12 Evaluación de poblaciones apoptóticas

Para este análisis el diseño experimental y las condiciones de cultivo se replicaron de la sección anterior, la diferencia yace en la tinción para este análisis, se realizó utilizando un kit comercial para detectar la activación de caspasas, se utilizó el kit CellEvent™ Caspase-3/7.

Para este ensayo se adiciona una condición establecida en el manual del kit, que es la inducción positiva de apoptosis, en este caso fue la incubación de las células MOLT-4 con 100 μ M de irinotecán, este control junto al control de DMSO se usaron para generar la matriz de compensación para esta tinción.

El porcentaje de la población en cada uno de los estadios de muerte celular se calcularon con la siguiente formula:

$$\text{Estadio de muerte celular (\%)} = \left(\frac{\text{Eventos en } Q_1/Q_2/Q_3/Q_4}{\text{Eventos totales}} \right) * 100 \quad (4)$$

El tratamiento de todos los datos obtenidos por citometría se procesó bajo el mismo flujo de trabajo, el cual se realizó sobre los diagramas de dispersión, inicialmente se excluyen los eventos asociados a basura celular en la gráfica FSC vs SSC, los eventos restantes se grafican sobre SSC-A vs SSC-H para definir los eventos individuales y eliminar los eventos asociados a células pegadas entre sí, con este filtro se grafican sobre el doble indicador para definir los cuadrantes y las poblaciones positivas, todo este tratamiento se hace considerando la matriz de compensación generada para cada sistema.

2.13 Análisis estadísticos

La comparación de los datos de diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad se evaluó mediante Shapiro-Wilk, las pruebas de Tukey y ANOVA unidireccional. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó utilizando la «Shapiro-Wilk Test Calculator» y la «Outlier Calculator» disponibles en «Statistics Kingdom» (<https://www.statskingdom.com/index.html>) y el «VassarStats: Website for Statistical Computation» disponible en línea del Vassar College, NY-EE.UU. (<http://faculty.vassar.edu/lowry/anova1u.html>).

Todos los resultados de los experimentos realizados *in vitro* utilizando células, se graficaron con una licencia oficial de GraphadPrism, donde se procesa y ahí mismo se realizaron los análisis estadísticos, para la comparaciones de barras se realizó un ANOVA de una vía y un post estudio tipo Sidak.

Capítulo 3. Resultados

En esta sección se presentan los resultados obtenidos de la experimentación asociada a los objetivos específicos previamente descritos para lograr el objetivo general y comprobar la hipótesis planteada en esta tesis. Los resultados se muestran en el mismo orden en el que se presentaron los objetivos específicos. Iniciando con un análisis *in silico* de la lacasa de *C. gallica* con sus modelos sustratos y posteriormente con las molécula a evaluar, a continuación, se presenta la caracterización catalítica de dicha enzima, en las dos versiones estudiadas, para dar paso a la síntesis y caracterización de los nanorreactores; de manera paralela se estudió la biotransformación de los fármacos, para concluir con la evaluación *in vitro* del sistema.

3.1 Análisis *in silico*

El análisis se inició con la selección del modelo de la enzima lacasa de *Coriolopsis gallica*, la estructura que se utilizó para este análisis fue la depositada en el Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) por de la Mora y colaboradores en 2012. Dicho modelo se obtuvo por la difracción de rayos X del cristal de dicha enzima con una resolución de 1.84 Å, el código que se le asignó es 4A2H, dicha estructura fue minimizada para ser utilizada en los acoplamientos moleculares.

Para la primera etapa se realizó un acoplamiento rígido entre la lacasa y tres sustratos modelos de reacción ABTS, siringaldazina y guayacol, estos acoplamiento se realizaron con el software de acceso libre AutodockVina®, el cual fue desarrollado para conocer la energía libre de unión (FEB por sus siglas en inglés, Kcal/mol) entre el sustrato y el ligando. Al concluir se analizaron los resultados en el programa LigPlot+ para determinar los residuos involucrados en la interacción enzima-sustrato; estos resultados se muestran en la tabla 2.

Con estos resultados se procedió a seleccionar los residuos para el acoplamiento flexible, estos residuos están resaltados con color verde en la tabla 2; como se observa los residuos seleccionados son los que median la interacción con el sustrato por medio de puentes de hidrogeno; dentro de esta selección se descartó el residuo His476, ya que este es la histidina de coordinación para el átomo de cobre T1, por lo que se dejó fijo. Adicionalmente se incluyeron residuos con interacciones hidrofóbicas basados en la flexibilidad y la cercanía de estos con el sustrato.

Tabla 2. Valores de la energía de afinidad aparente entre la lacasa de *C. gallica* y tres sustratos modelos de reacción.

<i>Sustrato</i>	<i>Energía de Afinidad (Kcal/mol)</i>	<i>Residuos involucrados en la interacción con el sustrato</i>	
		<i>Puentes de hidrogeno</i>	<i>Contactos hidrofóbicos</i>
ABTS	-6.0	Asp 226 Ser285	<i>Val 489</i> <i>Asn 284</i> Phe 352 <i>Pro 411</i> <i>Gly 412</i> <i>His 476</i>
Siringaldazina	-5.3	Asn 284 Ser 285 <i>His 476</i>	Val 183 <i>Pro 184</i> Thr 185 <i>Asp 266</i> <i>Asn 284</i> <i>Phe 352</i> <i>Pro 411</i> <i>Gly 412</i> Ile 473
Guayacol	-3.8	Asp 226 Asn 284 Ser 285	<i>Pro 184</i> <i>Gly 412</i>

Con las condiciones previamente mencionadas se realizaron los acoplamiento flexibles entre la enzima y la serie de sustratos seleccionados con el objetivo de hipotetizar la posible oxidación de dichas moléculas problemas, con esto en mente se utilizaron 3 parámetros principalmente: 1) la posición de la molécula en el acoplamiento, ya que esta debería de tener una interacción o cercanía con la región catalítica de la lacasa; 2) la energía de afinidad aparente entre la molécula y la proteína y 3) la distancia entre el átomo donador propuesto y el cobre T1, estas tres condiciones en cada una de las moléculas son necesarias para sugerir su posible oxidación por la lacasa de *C. gallica*.

Las estructuras de los fármacos seleccionados se muestran en la figura 4 así como los sustratos modelo de reacción usados como control, el esqueleto de las moléculas se visualiza en negro mientras que en color rojo se resalta el átomo donador de electrones que proponemos puede ser sujeto a la oxidación.

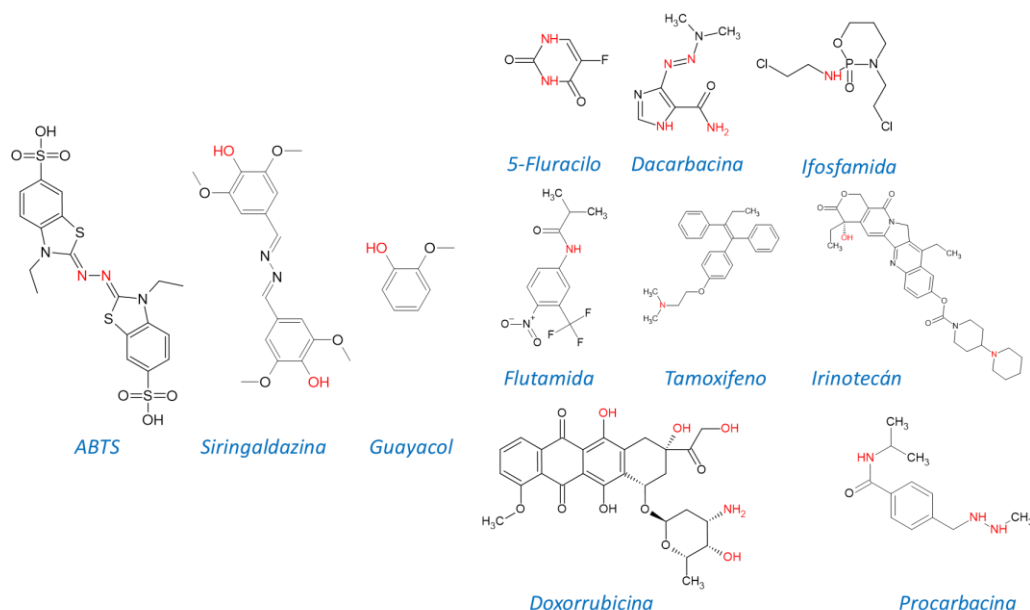


Figura 4. Representación de las moléculas usadas para el docking. La estructura de dichas moléculas se muestra en color negro mientras que los átomos que proponemos como donadores de electrones se colorean en rojo. Las moléculas usadas fueron obtenidas del servidor PubChem en formato SMILES, mientras que la visualización y edición se realizó en el software ChemSketch (FreeWare) 2024.1.2

Los resultados de los acoplamientos flexibles se visualizan en la figura 5, donde se representa el resultado del mejor acoplamiento flexible entre la lacasa y cada una de las moléculas, en la parte inferior de cada panel se coloca la energía libre de afinidad aparente (ΔG) y la distancia entre el átomo donador y el cobre T1.

3.2 Caracterización catalítica de la lacasa de *Coriopsis gallica*

Las propiedades fisicoquímicas y catalíticas de la lacasa nativa de *Coriopsis gallica* (n-Lac) ya han sido reportadas previamente. La lacasa se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular y la pureza se verificó mediante SDS-PAGE, el cual mostró una única banda. La carga superficial de la n-Lac mostró ser de alrededor de -7 mV; esta reportado que la carga superficial de la molécula es crucial para encapsidación dentro de las VLPs de BMV (Daniel et al., 2010); por lo que esta carga tan cercana a la neutralidad genera un área de oportunidad para su mejora.

El potencial zeta se refiere a las propiedades electroquímicas cerca de una superficie sólida en una solución acuosa. En las proteínas, el potencial zeta está determinado por grupos funcionales cargados en la

superficie. Esta distribución de carga se puede esquematizar con el software Chimera UCSF, el cual calcula el potencial electrostático según la ley de Coulomb (Fig. 6). Las estructuras tridimensionales de la lacasa de *C. gallica* (ID: 4A2E) y de la proteína de cubierta del BMV (ID: 1JS9) se obtuvieron en el Protein Data Bank.

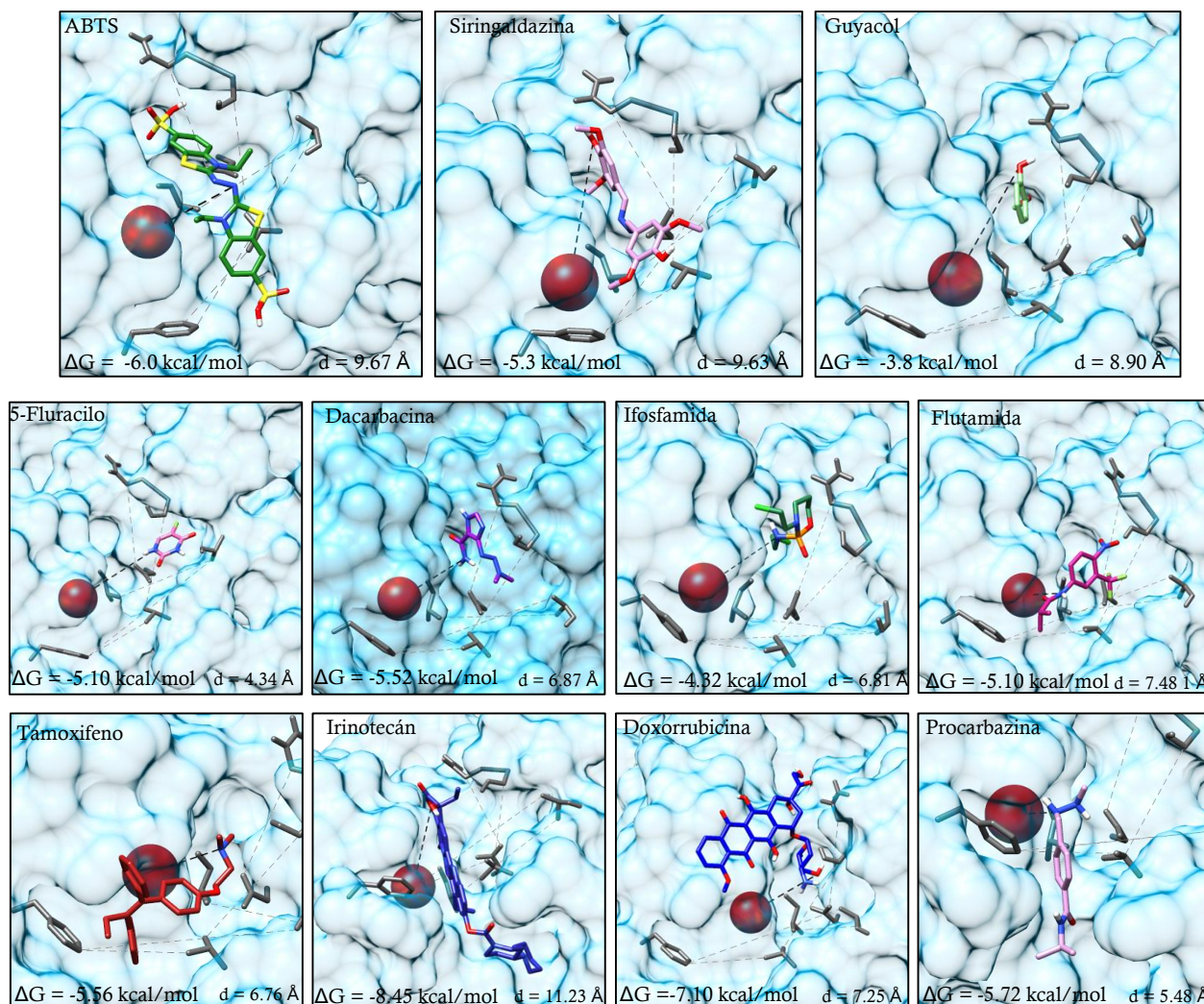


Figura 5. Docking flexible. Visualización de los resultados obtenidos del *docking* flexible, en cada imagen se presenta en la estructura de lacasa (superficie transparente en azul cielo), el átomo de cobre T1 (color rojo), los residuos flexibles (color gris) y cada una de las moléculas estudiadas.

Una superficie más negativa daría lugar a una mejor complementariedad de cargas y, por tanto, a una mejor encapsulación de la enzima. Por lo tanto, la lacasa nativa (n-Lac) se modificó químicamente con anhídrido succínico (Klapper & Klotz, 1972) para convertir los grupos amino libres disponibles en la superficie de la proteína en grupos carboxílicos libres, con el fin de aumentar las cargas negativas en la superficie de la molécula de lacasa (sa-Lac).

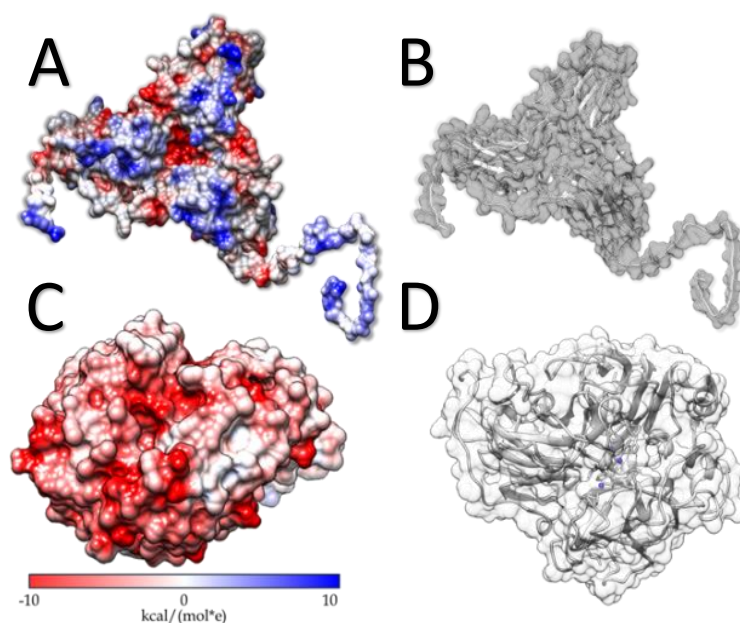


Figura 6. Representación de proteínas involucradas en la encapsidación. A y B representaciones gráficas de la proteína de capa de BMV (PDB 1JS9). C y D representaciones gráficas de la lacasa de *C. gallica*. A y C representación del potencial electrostático de la superficie. B y D, representación superficial de la proteína.

Tras esta modificación química, la carga superficial obtenida de la lacasa modificada fue significativamente más negativa, alrededor de -22 mV (Tabla 3), favoreciendo así la encapsidación de nuestra proteína catalítica.

Tabla 3. Carga superficial de la lacasa de *C. gallica*.

<i>Enzima</i>	<i>Potencial Zeta (mV)</i>
<i>n-Lac</i>	-7.59 ± 0.75
<i>sa-Lac</i>	-21.75 ± 2.0

Teniendo dos versiones de la misma enzima, la nativa y la modificada en su superficie, se procedió a estudiar su comportamiento catalítico esto realizando cinéticas de saturación con 3 sustratos modelo y calculando sus constantes catalíticas las cuales se presentan en la tabla 4.

Una vez verificada la actividad catalítica en la versión modificada (sa-Lac), se continuo con ensamble de los nanorreactores, los cuales consisten en el confinamiento de la lacasa dentro de las cápsides de BMV.

Tabla 4. Constantes catalíticas obtenidas de la cinética de saturación con el modelo de Michaelis-Meten

Sustrato	Enzima	K_M (μM)	V_{max} ($\mu M/min$)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($min \cdot \mu M^{-1}$)
ABTS	n-Lac	118.15 ± 24.47	35.71 ± 2.55	3571 ± 255	30.2 ± 10.4
	sa-Lac	329.73 ± 29.53	31.71 ± 0.99	3171 ± 99	9.6 ± 3.3
Siringaldazina	n-Lac	11.80 ± 2.063	94.03 ± 6.34	9403 ± 634	796.8 ± 307.7
	sa-Lac	9.09 ± 2.59	6.51 ± 0.73	651 ± 73	71.6 ± 28.1
2,6-DMP	n-Lac	19.97 ± 1.49	25.5 ± 0.61	1275 ± 30.5	63.8 ± 20.4
	sa-Lac	25.32 ± 2.06	9.94 ± 0.3	497 ± 15	19.6 ± 7.2

3.3 Producción y caracterización de nanorreactores

Muchos protocolos han sido publicados para el reensamble y confinamiento de partículas a partir de la proteína de BMV para la formación de VLPs, sin embargo, en este trabajo se utilizó una metodología nueva donde se acopla la fase de formación de los nanorreactores con la fase de purificación, ambas etapas en un solo protocolo; dicho protocolo se describe en el capítulo de metodología y ahí mismo se presenta un esquema de este (Figura 3); el cual consiste en una serie secuencial de diálisis.

Al ser una metodología nueva, se decidió evaluar la reproducibilidad de este proceso considerando principalmente la formación y pureza de los nanorreactores obtenidos; se utilizaron dos parámetros poblacionales de las nanopartículas para evaluar este fenómeno, la distribución de tamaños, el cual se midió por dispersión dinámica de luz, y el índice de polidispersión (PDI), el cual se calculó con la siguiente ecuación (5):

$$PDI = \left(\frac{STDV}{\bar{x}_{dh}} \right)^2 \quad (5)$$

En donde STDV es la desviación estándar de la población y X_{dn} indica el diámetro promedio de la población. Dichos resultados se encuentran representados en la figura 6 donde se evaluó específicamente una relación másica de 1:9, con el objetivo de evaluar la reproducibilidad del protocolo, demostrando que la formación de nanorreactores es consistente. Además, se evidencia la formación de partículas con tamaños mayores al tamaño del virus (Figura 7A), sin embargo, poblacionalmente el comportamiento no es significativamente diferente al virus (Figura 7B).

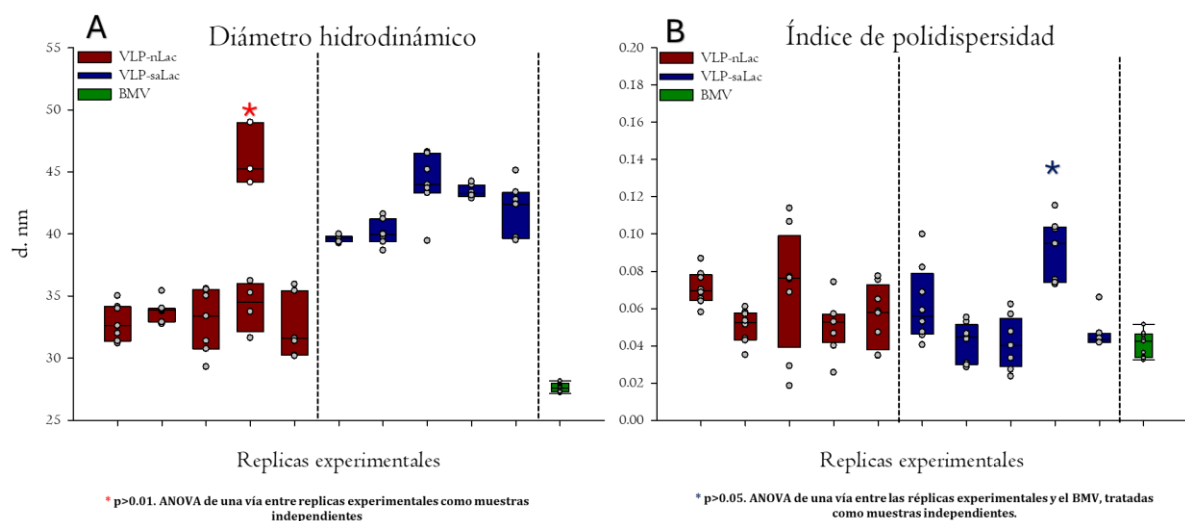


Figura 7. Evaluación de protocolo. Se realizaron 5 réplicas experimentales con una relación másica de 1:9, cada replica se analizó por medio de dispersión dinámica de luz para determinar su diámetro hidrodinámico y con los datos obtenidos se calculó el PDI de cada una de las réplicas, obteniendo datos reproducibles entre cada una de las muestras.

De esta manera se procedió a evaluar distintas relaciones másicas entre la enzima y la proteína, dichos resultados se representan en la figura 8 donde se grafica la distribución de tamaños, el PDI y la actividad específica de los nanorreactores. Dejando claro que catalíticamente la mejor relación es la 1:9 en ambas versiones del nanorreactor VLP-nLac y VLP-saLac (Figura 8C).

Siendo esta relación la que se visualizó por microscopia electrónica de transmisión (TEM), los resultados de dicha caracterización de muestras en la figura 9; exhibiendo que en ambos casos (VLP-nLac y VLP-saLac) el diámetro hidrodinámico es bastante similar al del virus nativo del BMV que es de 28 nm. Conociendo las características de los nanorreactores 1:9, se monitorearon temporalmente por hasta un mes para conocer su estabilidad estando almacenados en buffer de acidificación, los resultados se muestran en la figura 10.

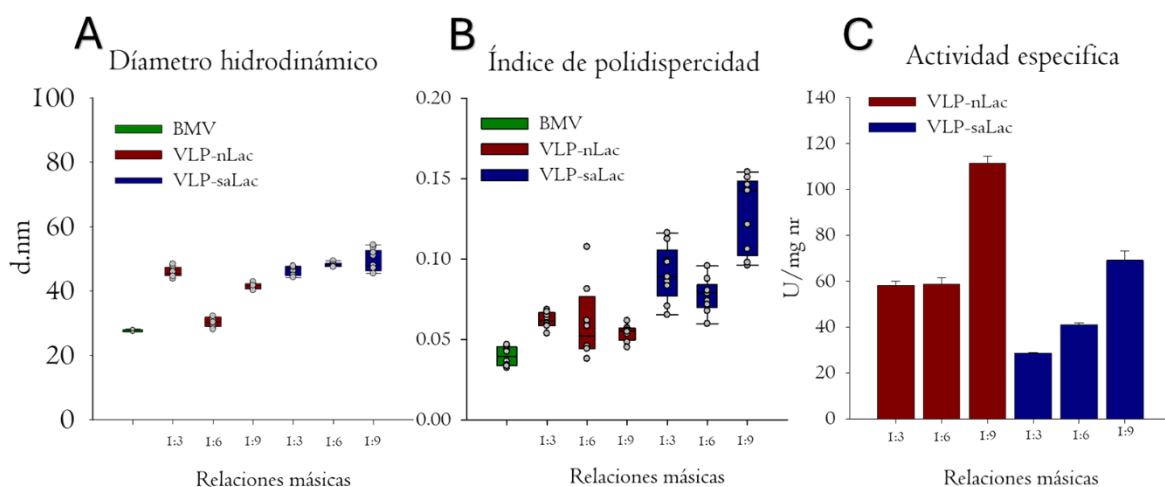


Figura 9. Evaluación de tres relaciones másicas para formación de nanorreactores. Se evaluaron 3 relaciones másicas por medio de dispersión dinámica de luz, se calculó su PDI y se determinó la actividad específica con el sustrato ABTS, obteniendo los resultados presentados en la gráfica, donde los mejores resultado en cuestión de actividad fueron para la relación másica 1:9.

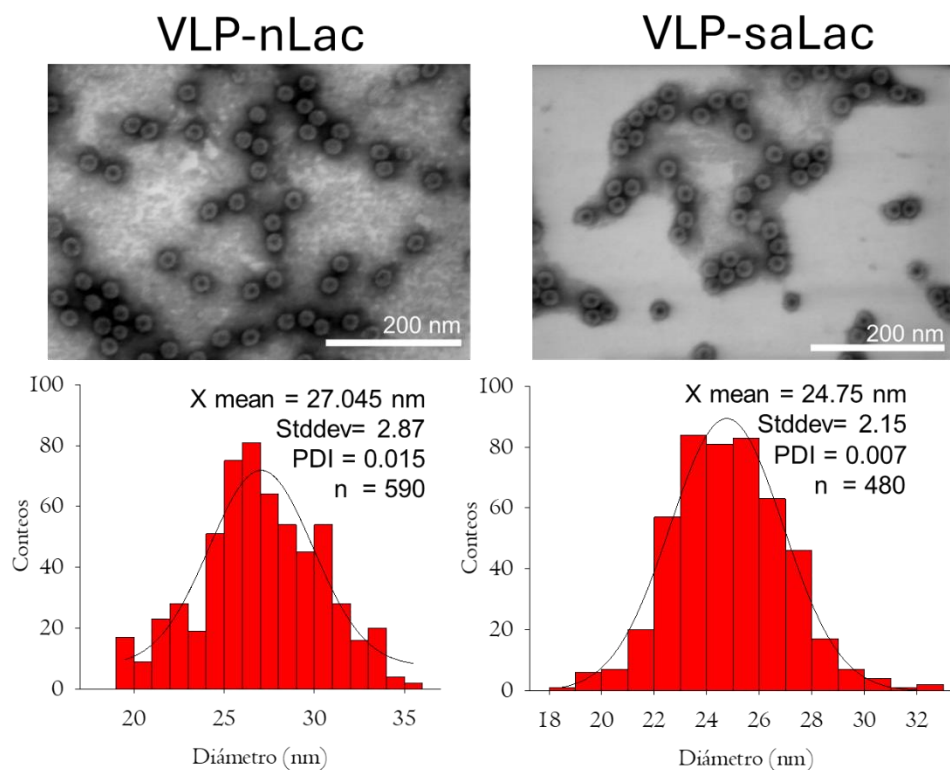


Figura 8. Caracterización microscópica de nanorreactores de la relación 1:9. Caracterización por microscopia electrónica de transmisión don se evaluaron ambas versiones de los nanorreactores, las fotografías obtenidas se muestran en la parte superior de la imagen en donde cada una tiene su etiqueta correspondiente, y en la parte inferior, se muestra el histograma obtenido de las mediciones de cada una de las partículas visualizadas para obtener su distribución de tamaños característico.

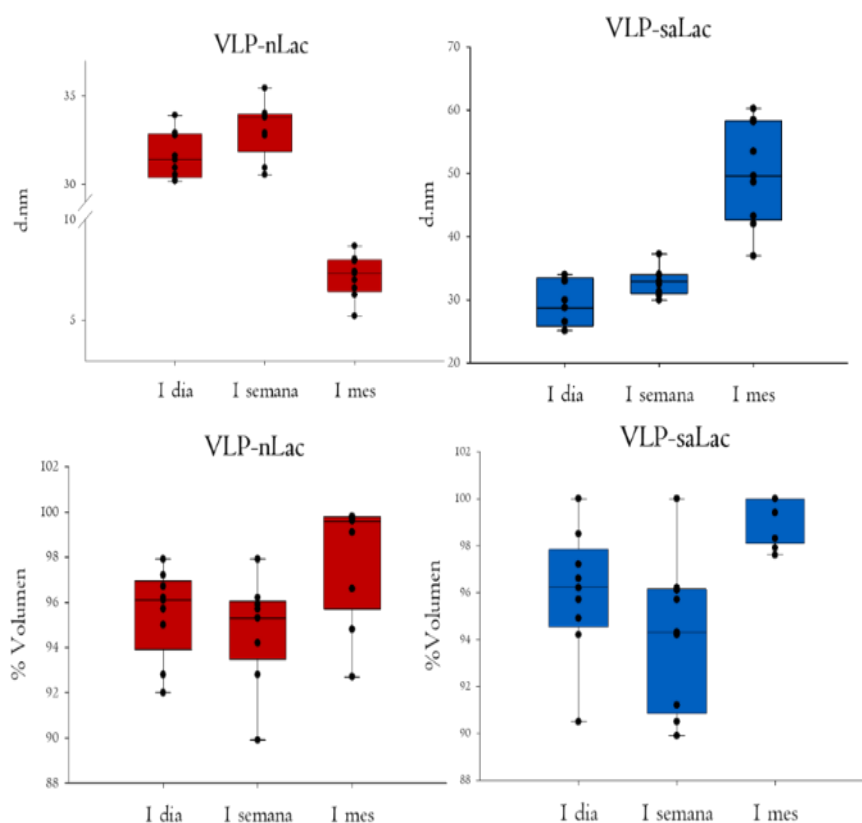


Figura 10. Estabilidad temporal de nanorreactors 1:9. Evaluación de la estabilidad a distintos tiempos de cada una de las versiones de los nanorreactors, los cuales fueron almacenados en buffer de acidificación, en la parte superior se muestra el promedio de los diámetros hidrodinámicos obtenidos para cada tiempo de evaluación mientras que, en la parte inferior se muestra el porcentaje en volumen de la población principal la cuál es la que se grafica en el panel superior de la misma gráfica. Cada versión del nanorreactor está identificada de un color distinto, para las VLP-nLac son las gráficas de color rojo y para las VLP-saLac son las gráficas de color azul.

3.4 Biotransformación de profármacos.

De manera párela a la síntesis y caracterización de los nanorreactors se evaluó la biotransformación de un conjunto de profármacos por la lacasa. A partir del reporte de Huttenen y colaboradores de 2008, se seleccionó un conjunto de profármacos que contaran en su estructura con al menos un grupo hidroxilo, un grupo anilina o un grupo amina, los cuales son los grupos funcionales con mayor susceptibilidad a ser transformados por las lacasas, obteniendo de esta forma un conjunto de fármacos los cuales son: dacarbacina (DCZ), tegafur (TGF), ifosfamida (IFD), flutamida (FTD), irinotecán (IRT), fluracilo (FCL), tamoxifeno (TAM), procarbazona (PBZ) y doxorubicina (DOX).

Estos fármacos se caracterizaron por medio de HPLC para monitorear establecer su biotransformación con lacasa libre y establecer el potencial de los nanorreactores para la activación de profármacos, los resultados de este ensayo se muestran en la figura 11.

Al considerar un mínimo de 20% de biotransformación a las 24 horas como reacción positiva en la biotransformación, se obtuvo que los profármacos que potencialmente puede ser activados fueron flutamida, irinotecán, fluracilo, tamoxifeno, procarbazina y doxorubicina, siendo estos dos últimos los que presentaron una biotransformación cercana al 100 % en presencia de la lacasa.

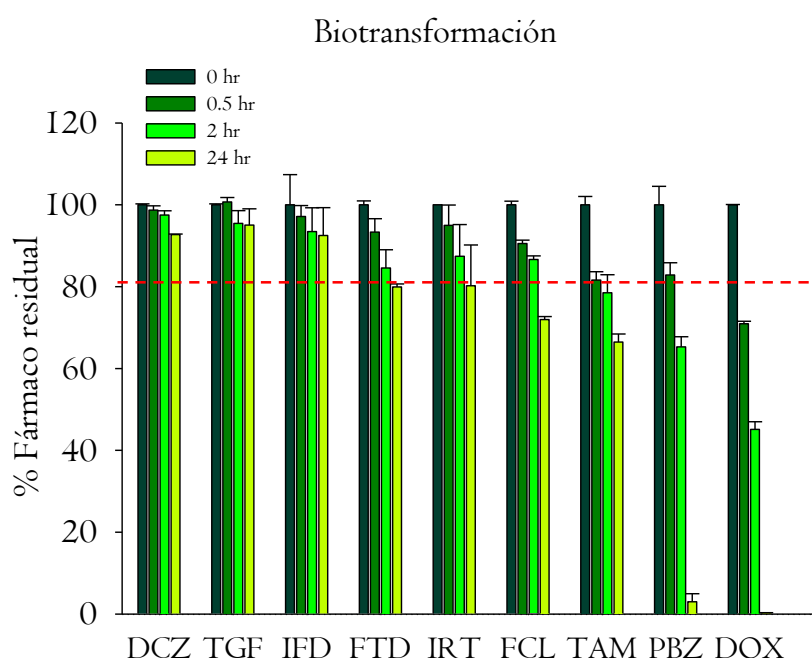


Figura 11. Biotransformación de profármacos. Evaluación del fármaco residual en la reacción con 5 U/mL de lacasa a distintos tiempos. DCZ (dacarbacina), TGF (tegafur), IFD (ifosfamida), IRT (irinotecán), FCL (fluracilo), TAM (tamoxifeno), PBZ (procarbazina) y DOX (doxorubicina). La línea rojo-punteada indica una disminución del 20%, lo cual es el parámetro que se estableció como mínimo necesario para considera una biotransformación positiva.

Partiendo de estos resultados se realizó un segundo análisis de biotransformación, en esta ocasión, usando una cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas mediado por ionización por electrospray. (LC-ESI-MS). Esta técnica nos permite además ver la disminución del fármaco en la reacción y también identificar productos a partir de moléculas con pesos moleculares específicos que se obtienen con esta técnica.

En este caso, no en todos los fármacos positivos de biotransformación por HPLC se pudieron identificar los productos con la información obtenido por LC-ESI-MS; los productos identificados fueron a partir de irinotecán, doxorrubicina y procarbazona. Siendo de este último del cual se logró identificar varias moléculas provenientes de la reacción.

Para la reacción con irinotecán, el principal producto fue el fármaco sin transformar, sin embargo, se identificó en concentración un compuesto con un peso molecular de 619.32 $[M+H]^+$ o de 618.27 g/mol, por lo que se hipotetiza que este compuesto es el APC (7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino] carboniloxicamptotecina) el cual es un producto de la metabolización del irinotecán por el CYP45034A (Smith et al., 2004) el espectro de masas y la estructura química se muestran en la figura 12.

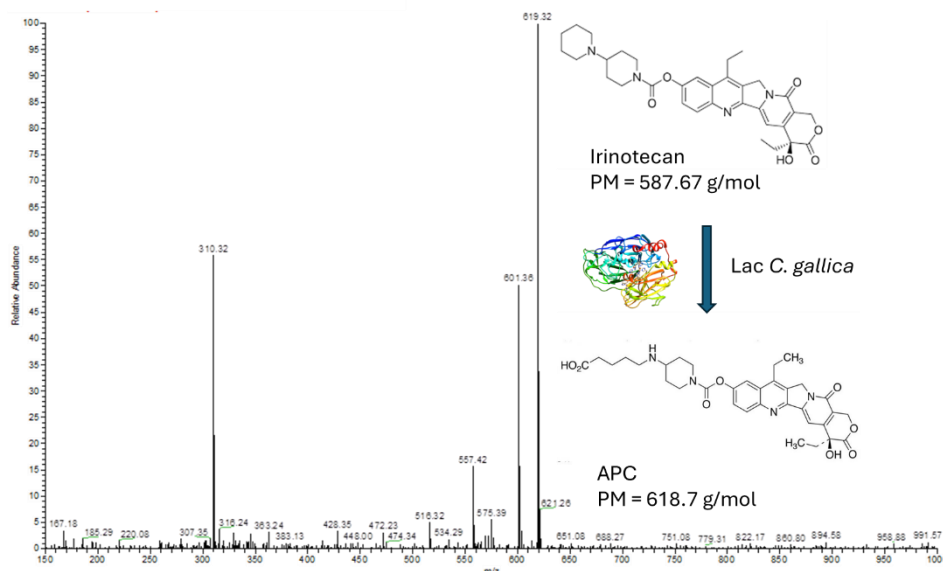


Figura 12. Cromatograma de ESI-MS de irinotecán. Espectro del producto principal de la biotransformación del irinotecán en presencia de lacasa. Esquema de la reacción de irinotecán a APC.

Por otro lado, para la reacción con la doxorrubicina se encontró principalmente la versión hidroxilada de este fármaco la cual, si presenta un menor toxicidad que el metabolito principal, sin embargo, esta versión de la doxorrubicina ya ha sido encontrada en el metabolismo de células cancerosas MCF-7 y se ha reportado que no presenta cardiotoxicidad (Wang et al., 2019); el espectro de masas y las estructuras se muestran en la figura 13.

El producto principal de la reacción de la procarbazina con lacasa presenta un peso molecular de 192.09 $[M+H]^+$ o 191.23 g/mol, este dato posiblemente es del compuesto 4-formil-N-isopropil-benzamida (Figura 13), por otro lado, también fueron detectados los compuestos metilazoxyprocarbazina y 4-carboxi-N-isopropil-benzamida, estos resultados se muestran en la figura 14.

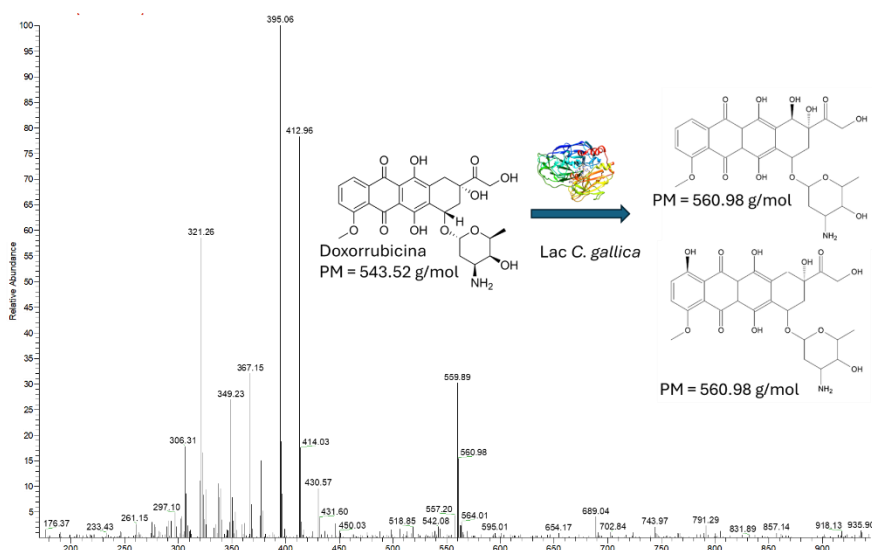


Figura 13. Cromatograma de ESI-MS de doxorubicina. Espectro del producto principal en la reacción de biotransformación de la doxorubicina en presencia de lacasa. Esquema de la reacción de doxorubicina y las dos estructuras propuesta de la versión hidroxilada de la doxorubicina. La estructura en la zona superior es la reportada por X. Wang et al, 2019 y la estructura en la zona inferior es una moléculas propuesta.

Concluyendo los análisis de la biotransformación de los profármacos por lacasa, se procedió a la evaluación *in vitro* de los elementos del sistema y en conjunto.

3.5 Evaluación *in vitro*

Al concluir los estudios relacionados con la biotransformación / activación de profármacos, se procedió a realizar los experimentos en cultivo celular, se tomó la decisión de evaluar los tres fármacos previamente descritos; irinotecán, doxorubicina y procarbazina, a la línea celular MOLT-4 siendo esta un modelo de leucemia; este cáncer es tratado con procarbazina a nivel terapéutico.

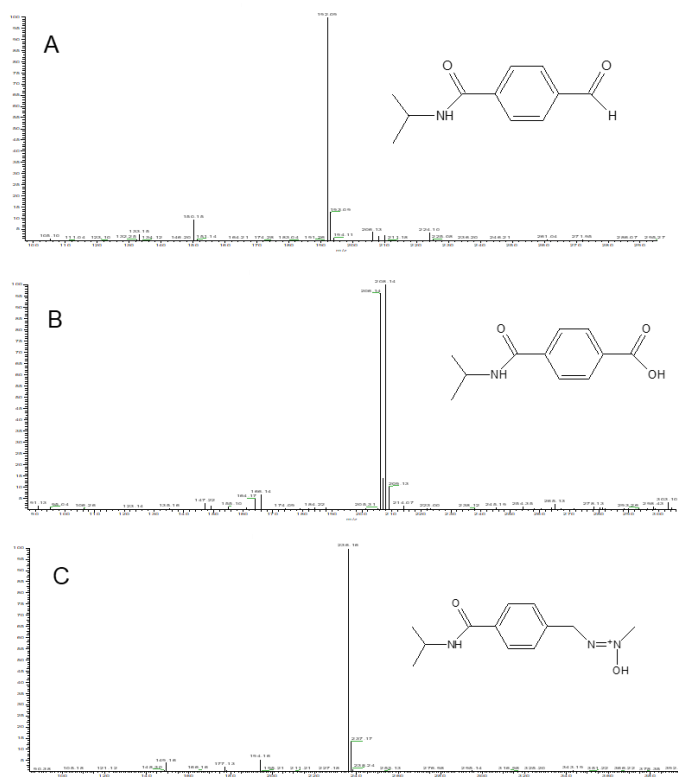


Figura 14. Espectros de masas de los productos aislados de la reacción de la procabazina y lacasa. Espectros con sus respectivas estructuras químicas propuestas, obtenidos de los productos purificados por HPLC de la reacción entre la procabazina y la lacasa.

Debido a la interferencia catalítica de la lacasa en la reacción oxidorreducción asociados a los protocolos tradicionales de viabilidad como el MTT / MTS; inicialmente se estandarizó un protocolo para la evaluación de viabilidad celular basado en la internalización de un colorante como lo es el rojo neutro.

El rojo neutro en condiciones fisiológicas (pH 7.2) presenta una carga neutra, lo cual le permite ser internalizado por medio de canales iónicos que están presentes en la célula, los cuales se usan para mantener el pH intracelular, este colorante toma un carácter catiónico al llegar al ambiente lisosomal (pH 4.5), por lo que adquiere una alta afinidad por a los lípidos de la membrana y así la acumulación del colorante es una repuesta directa al estado metabólico de la célula, este colorante no es sujeto a transformación por lacasa.

El primer paso fue hacer la cinética de internalización la cual consiste en contrastar un numero de células conocidas contra la absorbancia a 540 nm de la solución obtenida por la lisis celular, la metodología ya está descrita en su sección correspondiente, la evaluación se realizó en una escala de cero a 150,000

células por pozo, los resultados de este análisis se representan en la figura 15 A, seguido a esto, se realizó la cinética de crecimiento (Figura 15 B), este resultado aportó información para realizar las curvas dosis repuesta de los 3 fármacos y lacasa, contra las células MOLT4, las gráficas se visualizan en la Figura 15 C; los resultados se resumen en la tabla 5.

Tabla 5. Resumen de los parámetros obtenidos de la caracterización in vitro de MOLT-4

Regresión línea de número de células vs abs 254 nm			
$y = 1.1 * 10^{-6}x + 0.01617$			
Parámetros de cinéticas de crecimiento			
n = número de generaciones	r = tasa de duplicación		PDT = Tiempo de duplicación
n = 1.71	r = 0.56		PDT = 42.3
Valores obtenidos de las curvas dosis respuesta			
Lacasa	Doxorrubicina	Irinotecán	Procarbazina
IC ₅₀ = 1.18 µM / 0.88 U/mL	IC ₅₀ = 28.23 nM	IC ₅₀ = 184 nM	IC ₅₀ = 86 nM
IC ₈₀ = 0.27 µM / 0.2 U/mL	IC ₂₀ = 10 nM	IC ₂₀ = 50 nM	IC ₂₀ = 15 nM

Una vez determinados los IC₂₀ de los elementos individuales involucrados en el sistema de estudio, se utilizaron estos valores para evaluar el posible efecto sinérgico en la combinación de enzima libre y nanorreactor en presencia de los 3 fármacos propuestos, esta fase se evalúa en dos etapas, ambas con citometría, la etapa inicial fue determinar la viabilidad y muerte celular con una doble tinción, usando indicadores fluorescentes directos, para el caso de células vivas se utilizó la molécula FDA (diacetato de fluoresceína) y para la las células muertas se utilizó yoduro de propidio.

La segunda etapa, fue evaluar las poblaciones en distintas fases de muerte celular, este último ensayo se realizó con un kit comercial que detecta la actividad caspasa 3/7 que indica la activación de muerte por apoptosis y se contrasta con un colorante de marcaje de muerte que es el 7-ADD.

En la primer etapa se determinó el porcentaje de células vivas, es decir, células que dan positivo al marcaje de FDA; y también se determine el porcentaje de células muertas (PI+), en todos los caso se utilizaron los controles correspondientes y sus citogramas respetivos se presentan en el anexo 1 (Figura 21), para los resultados obtenidos de la combinación con la doxorrubicina, se presentan en la figura 16, para los obtenidos para irinotecán en la figura 17 y para la procarbazina, los resultados están en la figura 18.

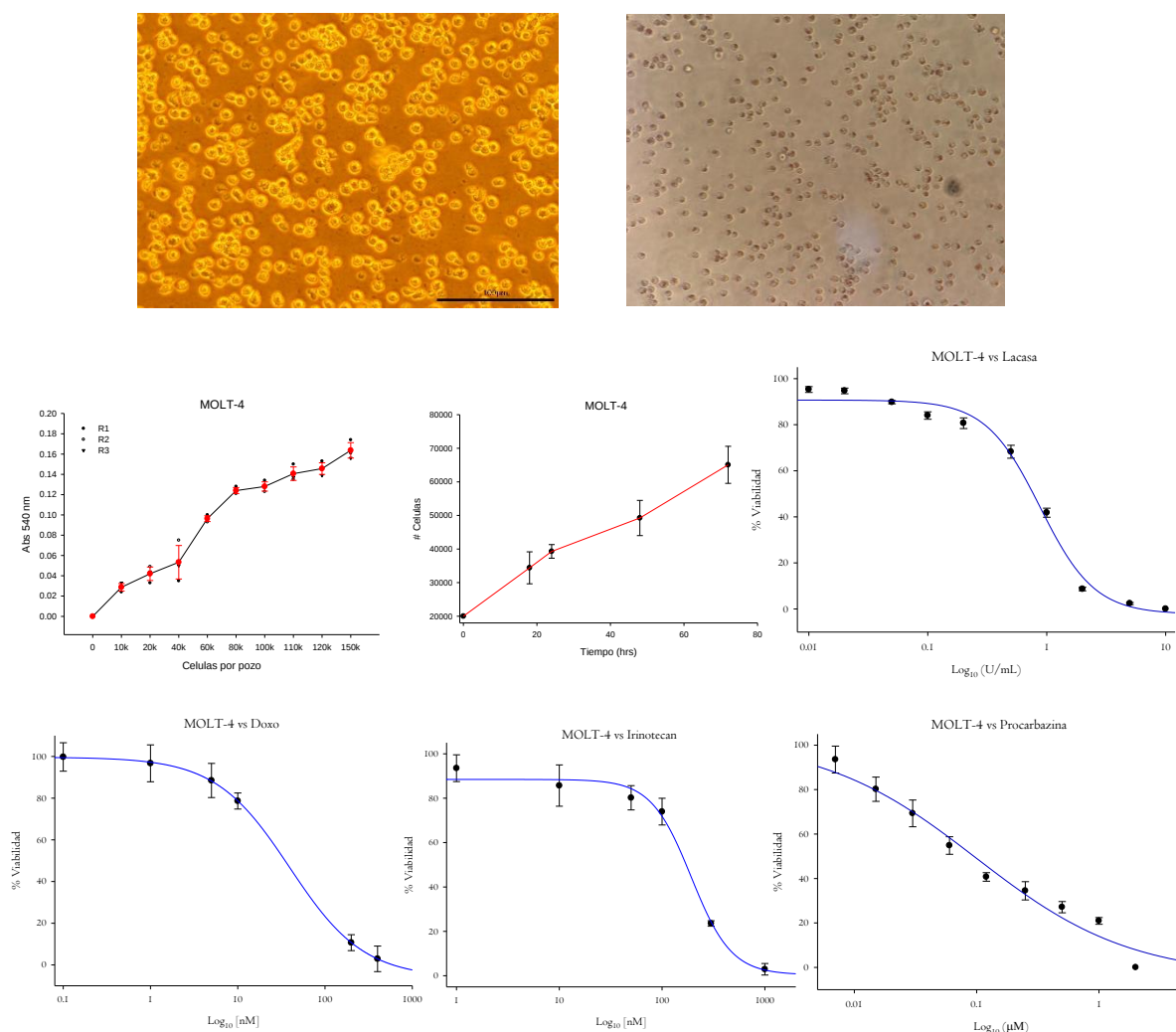


Figura 15. Resultado de la caracterización *in vitro* de MOLT-4. Fotografía en contraste de fases de células en cultivo MOLT-4, A) Células en suspensión en frasco T-25, B) Células teñidas con rojo neutro. C) Relación de número de células vs acumulación de rojo neutro. D) Cinética de crecimiento de MOLT-4; curvas de dosis repuesta de MOLT-4 vs E) Doxorubicina, F) Irinotecán, G) Lacasa y H) Procarbazine.

Finalmente con los resultados obtenidos de la primer etapa de citometría, se continuo evaluando las mismas condiciones en la etapa dos, donde se priorizó la caracterización del mecanismo de muerte celular, estas son células vivas, las cuales están representadas en cuadrante 1 (Q1) donde se caracterizan por una doble tinción negativa (Caspase - / 7-ADD -); células en apoptosis temprana representadas en el cuadrante 2 (Q2) las cuales se caracterizan por una tinción positiva sencilla (Caspase + / 7-ADD); células en necroptosis o apoptosis tardía representadas en el cuadrante 3 (Q3) las cuales se caracterizan por una doble tinción positiva (Caspase + / 7-ADD+) y finalmente las célula en necrosis que están representadas en el cuadrante 4 (Q4) estas se caracterizan por una tinción sencilla positiva (Caspase - / 7-ADD +).

Los resultados de este análisis se presentan en la figura 18, donde se esquematizan las poblaciones obtenidas en cada de una de las condiciones para los tres fármacos evaluados, los citogramas se presentan en el anexo (Figura 22).

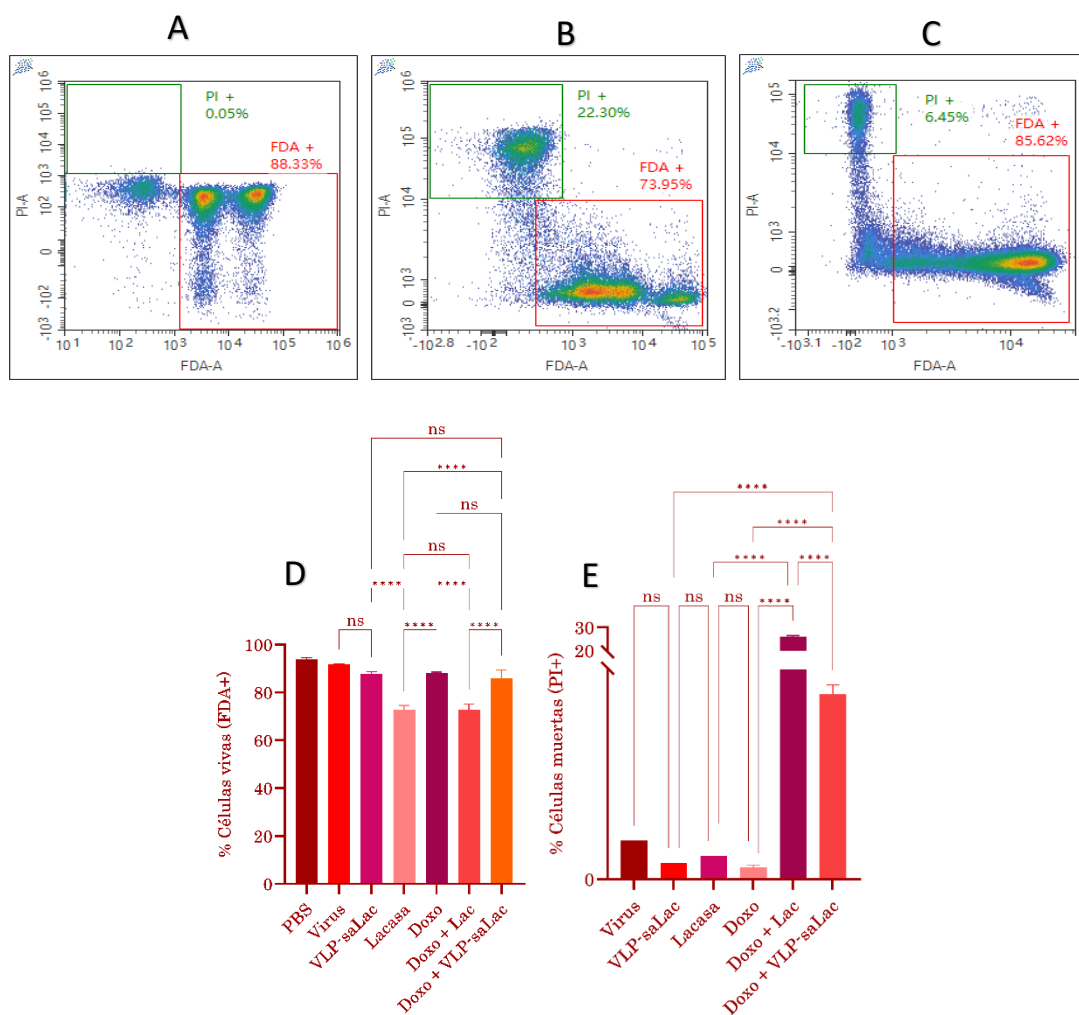


Figura 16. Resultados de la citometría FDA/PI de la combinación con doxorubicina. Panel superior de citogramas obtenido de los tratamiento A) Doxorubicina, B) Doxorubicina + Lacasa, C) Doxorubicina + VLP-saLac. Panel inferior, comparación de porcentaje entre los tratamientos y los controles. El análisis estadístico fue ANOVA de una vía con un post-test de Sidak. Valores de significancia * $<10^{-1}$, ** $<10^{-2}$, *** $<10^{-3}$, **** $<10^{-4}$.

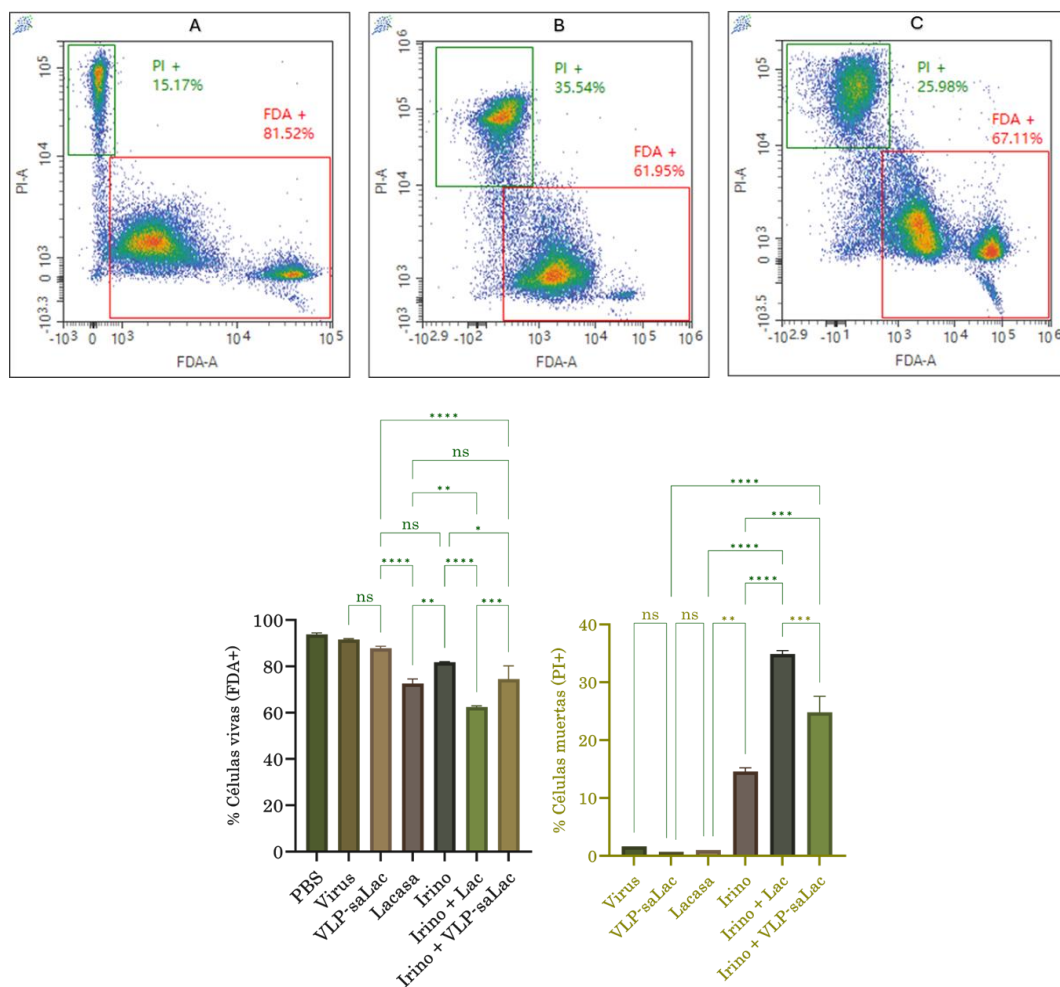


Figura 17. Resultados de la citometría FDA/PI de la combinación con irinotecán. Panel superior de citogramas obtenido de los tratamiento A) Irinotecán, B) Irinotecán + lacasa, C) Irinotecán + VLP-saLac. Panel inferior, comparación de porcentaje entre los tratamientos y los controles. El análisis estadístico fue ANOVA de una vía con un post-estudio de Sidak. Valores de significancia * < 10⁻¹, ** < 10⁻², *** < 10⁻³, **** < 10⁻⁴.

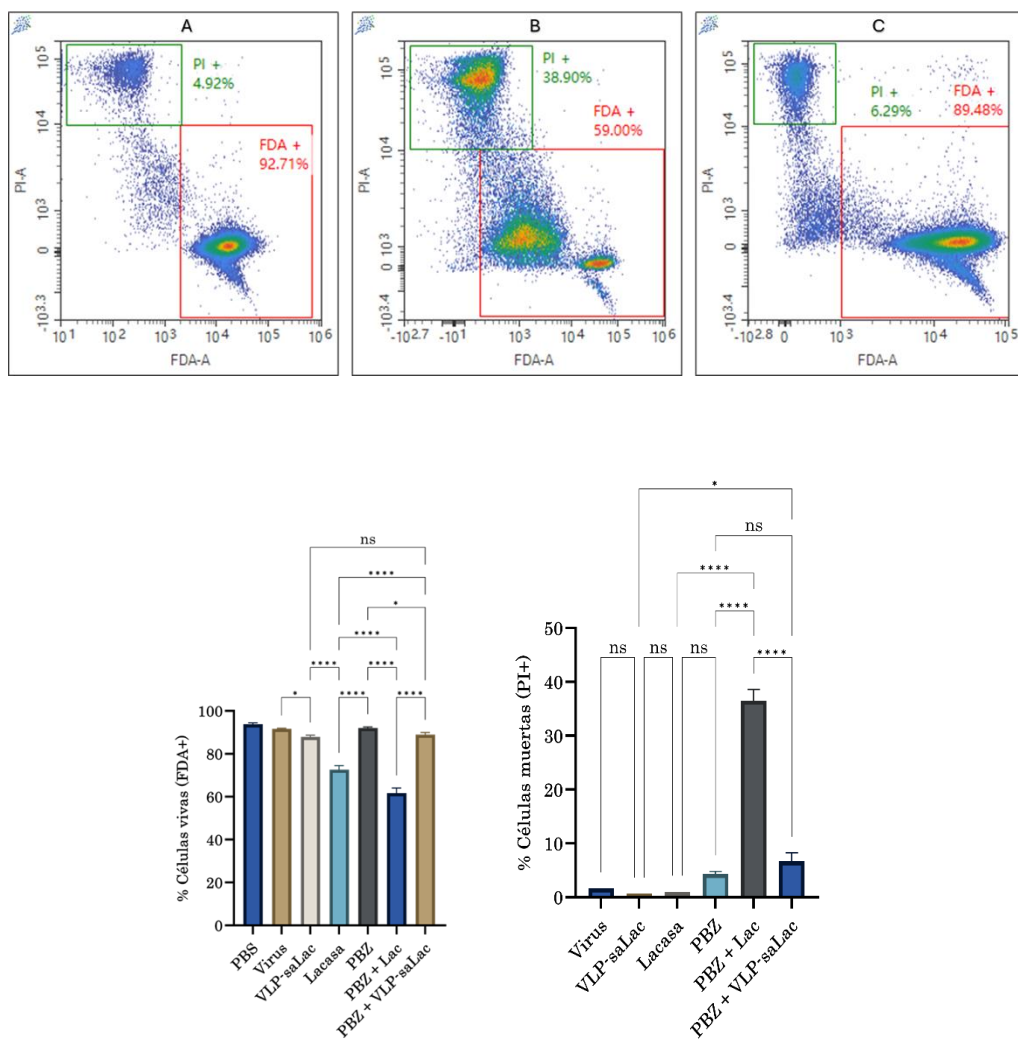


Figura 18. Resultados de la citometría FDA/PI de la combinación con procarbazona. Panel superior de citogramas obtenido de los tratamiento A) Doxorubicina, B) Doxorubicina + Lacasa, C) Doxorubicina + VLP-saLac. Panel inferior, comparación de porcentaje entre los tratamientos y los controles. El análisis estadístico fue ANOVA de una vía con un post-test de

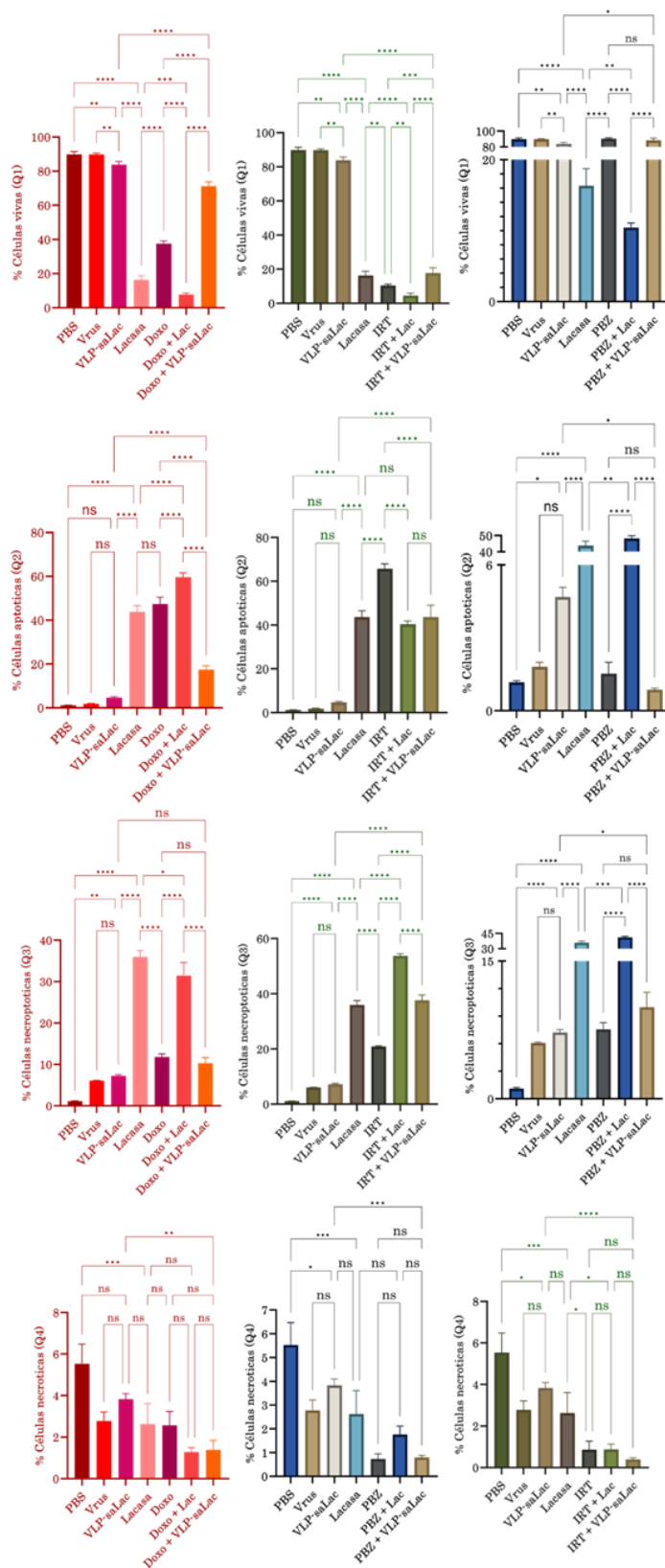


Figura 19. Representación de las poblaciones en distinto estadio celular de muerte. Evaluación de las 4 poblaciones presentes en la ruta de muerte celular de los fármacos evaluados en presencia de lacasa y VLP-saLac

Capítulo 4. Discusión

4.1 Análisis *in silico*

El uso de herramientas de simulación *in silico* para estudiar el acoplamiento de los sustratos con un receptor es una estrategia bastante común para el estudio de nuevas posibilidades efectivas para la posible interacción de una lista de profármacos. Este estudio aplicado a la lacasa de *Corioloopsis gallica*, nos permitió conocer más sobre la interacción de estas moléculas farmacológicas y la enzima en cuestión.

Los resultados de este estudio (Figura 4) nos demuestra que en todos los casos de los fármacos evaluados podría existir una interacción que fomente la oxidación de estas moléculas, esto debido a que todas las moléculas presentan al menos una conformación que cubren con los parámetros previamente establecidos, que es una posición cercana al sitio catalítico, una energía de afinidad aparente suficientemente negativa en función a los sustratos modelos y una distancia intramolecular entre el Cu T1 y el átomo donador de electrones, está establecido en la literatura que la distancia máxima para que esta oxidación se lleve a cabo debe de haber una distancia máxima de 14 Å.

Por supuesto al ser resultados de un estudio *in silico* se requiere una profundización mayor para tener una conclusión contundente, o en su defecto, evidencia experimental que compruebe la biotransformación de estas moléculas, siendo esta estrategia la que se realizó en este trabajo.

4.2 Caracterización de lacasa

Como se observó en la sección de resultados, la modificación química de la superficie de la lacasa generó cambios en sus perfiles catalíticos, estos cambios se ven reflejados principalmente en la disminución de la velocidad de reacción (k_{cat}) y aunque los valores de la K_m también son modificados, el cambio sustancial se da en la k_{cat} especialmente con el sustrato siringaldazina. Al no haber cambios tan grandes en la K_m , el cual es un indicador de la afinidad, se puede sugerir que la modificación no afecta el sitio catalítico, pero si se genera un cambio conformacional en la estructura proteínica derivado al reacomodo de los aminoácidos estructurales por la funcionalización.

Con el objetivo de analizar a profundidad este fenómeno, se realizó de manera *in silico* las modificaciones químicas propuestas, la cual consiste en adicionar de manera covalente un anión succinato al ánimo terminal de la cadena lateral de siete lisinas. Al realizar esta modificación se hizo una comparación de las estructuras cristalográficas (Figura 20 A), donde se observa que de manera global no hay un cambio conformacional evidente.

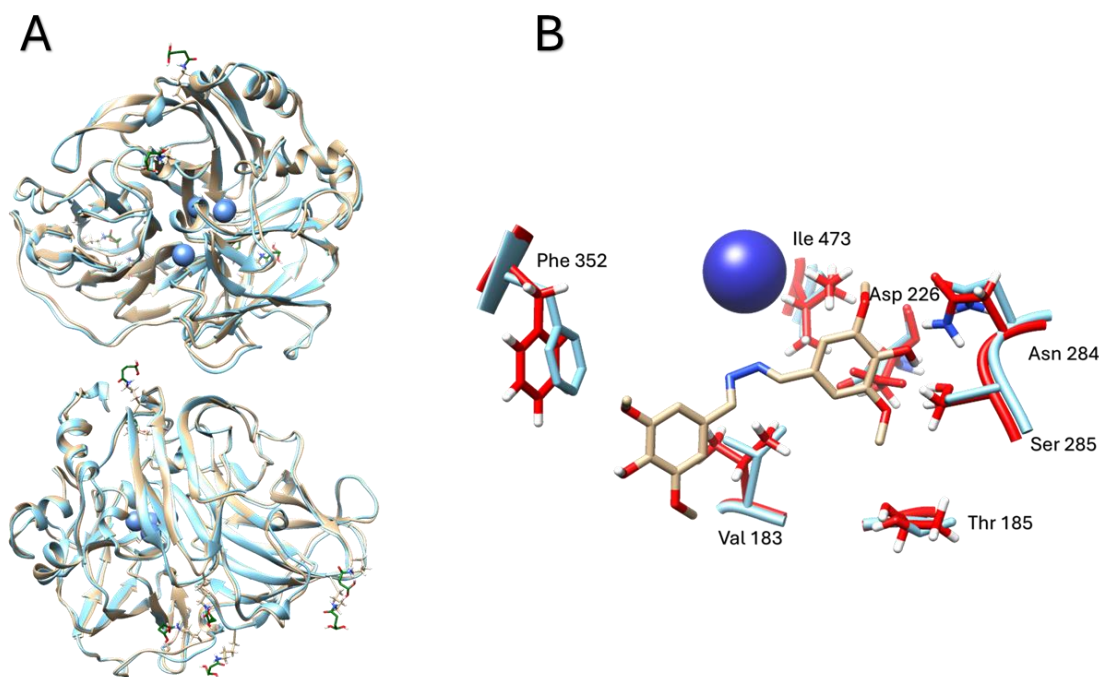


Figura 20. Comparación de la estructura saLac. Representación *in silico* de la estructura cristalográfica modificada correspondiente a la versión saLac. A) Comparación global de las estructuras cristalográficas de la lacasa, la estructura azul corresponde a la versión nativa (nLac) y la de color arena corresponde a la versión modificada (saLac), y de verde sobresalen los succinatos correspondiente a la modificación superficial. Figura superior con vista frontal al clúster de cobres, Figura inferior con vista opuesta al clúster metálico. B) Comparación de los residuos involucrados en la reacción con la siringaldazina (molécula de color claro), los residuos representados con color azul son de nLac y los residuos representados en color rojo son de saLac.

Teniendo en cuenta lo anterior, se hizo el mismo análisis comparativo con los residuos involucrados directamente en la reacción, los que se identificaron previamente para la realización del *docking* flexible, los resultados de esta comparación se muestran en la figura 20 B; en donde está claro que no existe una variación significativa en el posicionamiento de estos residuos.

Por lo que con esta herramienta no fue posible identificar la razón de la disminución de los valores de k_{cat} , sin embargo, existen alternativas como la dinámica molecular e incluso, estrategias experimentales como la cristalografía, que podrían emplearse en el futuro para la resolución de este fenómeno.

Como se observó en la sección de resultados, la modificación química de la superficie de la lacasa generó cambios en sus perfiles catalíticos, estos cambios se ven reflejados principalmente en la velocidad de reacción (k_{cat}) y no tanto en los valores de K_M , por lo que sugiere que estos cambios superficiales representan más que nada un reacomodo de los aminoácidos estructurales de la proteína.

Por lo que, para estudiar esta hipótesis, de manera *in silico* se generaron las modificaciones respectivas en la superficie de la lacasa, que consiste en agregar un anión succinato en la amina de la cadena lateral de las siete lisinas expuestas en la superficie de la lacasa. Esta representación se visualiza en la figura 20 A, en donde se sobreponen las dos versiones de la estructura cristalográfica, la versión modificada en color arena (saLac) y la versión nativa en azul (nLac).

Con dicha comparación de la estructura de manera global no se observan modificaciones significativas que nos ayuden a generar una hipótesis para el cambio de la k_{cat} , por lo que aprovechando los resultados de los *docking*, se hizo una comparación de los residuos involucrados en la reacción, previamente identificados, de las dos versiones de la lacasa (Figura 20 B).

Con estos resultados, tanto la comparación global como los residuos puntuales no muestran diferencias, por lo que con esta herramienta no se pudo generar una resolución que explique a profundidad el cambio en la velocidad de reacción, sin embargo, existen varias opciones más que podrían ayudar tanto de manera *in silico*, como la dinámica molecular, como de manera experimental como lo es la cristalografía.

Sin embargo, esta modificación en la carga superficial es un parámetro fundamental para la estabilidad y formación de nanorreactores, por lo que se procede a utilizar ambas formas de la enzima para su encapsidación y caracterización de los nanorreactores.

4.3 Formación y caracterización de nanorreactores.

Como se expresó anteriormente, se procedió a realizar los nanorreactores con ambas formas de la lacasa (nLac y saLac), las cuales ambas presentan actividad catalítica; el protocolo utilizado en este trabajo es un

protocolo nuevo que se basó en una búsqueda bibliográfica de protocolos previamente reportados.

Es importante aclarar que dichos protocolos previos fueron llevados a cabo sin lograr un éxito contundente sobre todo en la parte de purificación, ya que la parte de ensamble se obtenía sin ningún problema, pero al evaluar la pureza de estos nanorreactores por dispersión dinámica de luz, siempre se obtiene una señal equivalente a la forma libre de la lacasa y en conjunto, el perfil catalítico de dicha preparación no variaba significativamente a la versión libre, esta comparación fue fundamental ya que como se establece en el resumen publicado en el 2021 por Chauchan y colaboradores, las propiedades catalíticas de un nanorreactor deben de ser fundamentalmente distintas en la velocidad debido a los problemas de difusión generados por la barrera física y la porosidad del agente encapsulador (Chauhan et al., 2021).

Dicho lo anterior, se propusieron varios métodos de purificación, los cuales no tuvieron éxito hasta que se diseñó un sistema que acopla la parte del ensamble y purificación en un solo protocolo, los detalles ya han sido descritos previamente en el capítulo 2.

De esta manera logrando un protocolo que finaliza con los nanorreactores puros; al ser un protocolo nuevo, se evaluó la reproducibilidad de dicho proceso haciendo réplicas experimentales idénticas y utilizando los parámetros poblacionales para evaluar; el tamaño promedio de partícula y el índice de polidispersidad (PDI), este último es de suma importancia en preparación de nanopartículas ya que describe el comportamiento de la distribución poblacional de los tamaños de dichas partículas. Dicho parámetro es ampliamente utilizado para describir poblaciones de partículas formadas en base a polímeros y se obtiene con la relación entre el peso molecular promedio en masa y el peso molecular promedio en número (Danaei et al., 2018).

Sin embargo en nuestro caso, al utilizar una partícula de proteína que es modificada fisicoquímicamente para su desensamble (purificación de CP) y reensamble (formación de nanorreactores), el cálculo previamente descrito se complica, por lo que se utiliza una forma más asociada a la estadística poblacional para calcular dicho parámetro, esta forma es el resultado de elevar al cuadrado la relación entre la desviación estándar de la población y su tamaño promedio (ecuación 3) y así, obtener un valor que describe fielmente el comportamiento de la dispersión de nuestra población de partículas.

En la figura 6 se ilustran los resultados de los tamaños promedios y los PDI de cada réplica experimental realizada; en la figura 6A vemos la comparación de tamaño promedio de los nanorreactores nativos (VLP-

nLac), los cuales se asemejan ligeramente al tamaño promedio del virus BMV, el cual usamos como punto de referencia, mientras que los nanorreactores de saLac se alejan de dicho control.

En ambos casos el tamaño diverge del valor obtenido del virus, lo cual nos está indicando la posible formación de partículas con una estructuración y un número de triangulación diferente al del virus nativo; dicho más explícitamente, se hipotetiza que las partículas obtenidas con mayores tamaños no se reensamblen en un número de triangulación de 3 ($T=3$) si no que lo hacen posiblemente en un número de triangulación mayor.

Es necesario aclarar que el número de triangulación es un parámetro geométrico que se utiliza para clasificar las distintas conformaciones y arreglos espaciales que puede tener una misma proteína, por lo que es posible que una misma proteína tenga distintos arreglos espacial al ensamblarse en una VLP, es decir, un número T distinto.

Este fenómeno de aumento en el número T no ha sido reportado específicamente con nuestro sistema, sin embargo, si hay reportes en donde el número T del reensamble de BMV puede ser disminuido a un valor de 1 de manera *in vitro* (Krol et al., 1999). Existe el reporte de otra familia de virus icosaédricos que sí se ha aumentado su número T experimentalmente pasando de un $T=3$ a un $T=4$ (Kaelber et al., 2022).

La hipótesis de que este fenómeno este ocurriendo en nuestro sistema también coincide con los tamaños teóricos asociados a los valores de T mayores a 3, haciendo que nuestros nanorreactores entren en el rango de $T=4$ para VLP-nLac y $T=7$ para VLP-saLac. Con la información previamente presentada se fundamenta teóricamente la formación de cápsides de BMV con un $T=4$ lo cual explicaría las diferencias entre los tamaños, sin embargo, la comprobación de este fenómeno queda fuera de los límites de este proyecto debido a que la técnica más adecuada para caracterizar y fundamentar un número de triangulación es la microscopia electrónica criogénica.

Por otro lado, considerando que el comportamiento poblacional también es una manera de caracterizar la estructuración de las cápsides, la comparación de los PDI es una forma correcta de hacer este análisis, para el caso de la figura 6 B, donde se contrastan los PDI de las VLP-nLac y VLP-saLac contra BMV, como control, se observa que 9 de las 10 poblaciones evaluadas no presentan una diferencia significativa según el análisis ANOVA realizado (5 de VLP-nLac y 4 de VLP-saLac).

Basados en la formula previamente mencionada para el cálculo de PDI, se establecen los valores para la clasificación de las población siendo: 0.0 – 0.1 estrictamente monodispersa, 0.2-0.4 moderadamente monodispersa y por arriba de 0.4 polidispersa (Nobbman, 2017). Por lo que se puede concluir que, aunque el tamaño promedio aumenta, el comportamiento poblacional evaluado por el PDI se mantiene sin mostrar una diferencia significativa contra el BMV, lo que nos indica que el comportamiento de ensamble para la formación de los nanorreactores no difiere al virus nativo.

Evidenciando la reproducibilidad de nuestro protocolo novedoso se procedió a evaluar tres relaciones másicas con el objetivo de optimizar la formación de nanorreactores, los resultados de este experimento se muestran en la figura 7, adicionalmente de los parámetros poblaciones antes mencionados (tamaño promedio y PDI), se evaluó la actividad específica lo cual es un factor directo que describe la capacidad catalítica de nuestro sistema.

En esta ocasión los valores de tamaño mostraron diferencias entre sí, especialmente para las partículas VLP-nLac teniendo diferencias significativas, en contraste con los valores de VLP-saLac, los cuales mostraron un comportamiento muy similar entre las 3 relaciones evaluadas; en este estudio el factor con mayor impacto es la actividad específica, este valor se calculó en unidades catalíticas por miligramo de nanorreactor (U/mg nr) haciendo que para ambas preparaciones la mejor relación másica fuese 1:9.

Dicha actividad se calculó usando el sustrato modelo ABTS, es importante resaltar que las constantes catalíticas de los nanorreactores actualmente se dejan como perspectivas a futuro, debido que para el cálculo de dichos valores (K_M y k_{cat}), se requiere conocer el valor exacto de la concentración de enzima que se tiene en el sistema, desafortunadamente los esfuerzos que se realizaron para conocer este dato no han tenido exito, por lo que se tiene que proponer en un futuro como cuantificar de manera fiable la concentración o cantidad de enzima nanoconfinada en los nanorreactores.

Conociendo que la relación másica con mayor actividad específica es la 1:9, esta fue la que se utilizó para la caracterización por microscopia electrónica y obtener las imágenes mostradas en la figura 8, donde se muestran ambas preparaciones con una relación másica de 1:9 (VLP-nLac y VLP-saLac) junto con sus diagramas de distribución de tamaños de las partículas. Para este diagrama se utilizaron fotografías donde la población sea evidente su monodispersión y dejando fuera las áreas donde se visualizan partículas con tamaños mayores.

Adicionalmente, a las caracterizaciones ya mencionadas, se hizo el monitoreo en 3 tiempos para establecer y evidenciar la estabilidad asociada a la funcionalización de la enzima, estos resultados son los mostrados en la figura 9, donde se observa que los VLP-nLac, al mes de almacenamiento ya no cuentan con la estructura deseada evaluada por DLS, esto se ve al comparar que la principal población (% volumen) ya está presente un valor menor de 10 nm, lo cual se podría asociar a las proteínas individuales, este fenómeno no se observa para las VLP-saLac, donde al mismo tiempo se sigue observando partículas en el rango de 30 nm.

Este fenómeno está asociado directamente con la carga superficial del cargo y la fuerza de atracción entre la parte interna de la CP de BMV y el cargo, en el caso de las VLP-nLac donde la lacasa presenta una carga superficial cercana a la neutralidad (-7 mV), con el paso del tiempo esta fuerza de atracción se debilita por lo que la cápside se desensambla generando que los nanorreactores dejen de presentar su tamaño característico.

De esta manera se establece que el protocolo nuevo de ensamble y purificación propuesto en este trabajo es confiable y reproducible, estableciendo que la mejor relación másica sea 1:9, teniendo todo esto en cuenta se procedió con la etapa de evaluar la biotransformación y posible activación de los profármacos.

4.4 Biotransformación de profármacos por nLac

Posteriormente, se realizó una búsqueda bibliográfica de los profármacos que cumplieron con grupos funcionales que fuesen potencialmente susceptibles a la oxidación por medio de lacasa. Estos grupos principalmente son hidroxilos, aminas y anilinas y de esta manera se obtuvo un conjunto de fármacos que cumplieron con estas características; los cuales ya fueron previamente mencionados en la sección de resultados y evaluados de manera *in silico*, el resultado de la biotransformación de estos fármacos se mostró en la figura 11.

Para este análisis de biotransformación, se estableció un límite mínimo de aceptación del 20% de transformación en el monitoreo por HPLC, dicho valor considera incluir el error de la técnica y, por lo tanto, los resultados son mucho más confiables. Los fármacos positivos se establecieron con este criterio y es importante aclarar que la reacción entre la lacasa y la doxorubicina (el cual es uno de los fármacos positivos en nuestro análisis) ya está reportado con distintas cepas fúngicas con actividad lacasa (Clark et al., 2022; Jinga et al., 2022; Kelbert et al., 2021)

Sin embargo, los propósitos de estos trabajos son dirigidos a la biorremediación y no tienen fines terapéuticos, como es el caso de este trabajo, por lo que aun sabiendo que esta molécula funciona como sustrato es importante incluirla en los análisis de activación.

Una vez conocidos los fármacos que fueron positivos en las reacciones de biotransformación, la siguiente etapa que realizamos fue la caracterización de los productos. En este paso, inicialmente se evaluaron todos los productos de los fármacos positivos de la figura 11, sin embargo, al obtener los resultado de la espectrometría de masas, la interpretación de los espectros y su identificación no fue sencilla en todos los casos.

En contraste, se identificaron productos relacionados a la metabolización por CYP450 de los fármacos irinotecán, doxorubicina y procarbazona, por lo que se profundizo el análisis de los productos de reacción en de estos tres profármacos.

Para el irinotecán se logró identificar el compuesto conocido como APC (7-etil-10- [4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino] carboniloxicamptotecina. Este producto es el resultado de la oxidación de anillo terminal piperidina; este producto ya se ha reportado como metabolito de este fármaco al ser catalizado por el CYP3A4, sin embargo, la actividad tóxica de este compuesto es muy inferior a la versión activa de esta moléculas, la cual se le denomina SN-38 (Smith et al., 2004).

Para los productos de la doxorubicina, principalmente se identificó la versión hidroxilada de esta molécula, la cual ha sido reportada y detectada en el metabolismo *in vivo* de la doxorubicina por células tumorales MCF-7 (Wang et al., 2019), es de suma relevancia descartar que en este análisis de los productos de la doxorubicina no se encontró el compuesto conocido como doxorubicinol el cual es el principal agente cardiotóxico (Zeng et al., 2019).

Considerando lo anterior, se hipotetiza que la metabolización del profármaco doxorubicina por medio de una lacasa disminuiría uno de los principales efectos secundarios del uso de este fármaco el cual es la cardiotoxicidad (Harahap et al., 2020; Zeng et al., 2019).

Finalmente, el estudio de los productos de reacción de la procarbazona, son incluso más prometedores que los anteriores, ya que en este caso se lograron identificar 3 productos pertenecientes a la metabolización de dicho fármaco por el CYP450. Los productos encontrados fueron 4-formil-n-isopropil-benzamida (4FIB),

metilazoxiprocabazina y 4-carboxi-n-isopropyl-benzamida, estas moléculas presentaron abundancia respectiva en el orden mencionados.

El 4FIB siendo el más abundante en la reacción presentó una masa molecular de 191.23 g/mol, este producto ha sido reportado y detectado en suero sanguíneo en paciente humanos (Shiba & Weinkam, 1982) y en plasma de ratas (Kuttab et al., 1982) que han sido tratados con procabazina; por otro lado, la metilazoxiprocabazina, fue detectada en menor cantidad, sin embargo, esta molécula ha sido reportada con la mayor actividad citotóxica contra leucemia (Swaffar et al., 1992).

Es importante mencionar que existe otra enzima oxidasa con cobre, al igual que la lacasa, que ha sido reportada que como capaz de oxidar la procabazina a su forma azo, dicha enzima es la tirosinasa (Gasowska-Bajger & Wojtasek, 2008).

Confirmando que el producto principal de la transformación de la procabazina por la lacase es el 4FBI y siendo este el producto final de la metabolización de azoprocabazina, en donde se forma el radical metilo (CH_3^*), siendo este el responsable de interactuar directamente con el ADN y las proteínas, inhibiendo rutas de síntesis y generando la muerte celular (Sinha, 2020).

Estos resultados sugieren un mecanismo de oxidación de la lacasa similar al del ABTS, en el cual se centra en la extracción de un electrón de un nitrógeno central para la formación de un azo-catión estable (molécula que se monitorea en la reacción de actividad. Entonces, podemos proponer un mecanismo por el cual la lacasa oxida la procabazina hasta llegar a un producto final y la formación del radical metilo, el cual se ilustra en la figura 21.

4.5 Evaluación *in vitro* de VLP-nLac y VLP-saLac

Teniendo claro que la lacasa presenta la propiedad de oxidación/activación al menos 3 profármacos, se procedió hacer la evaluación *in vitro* de dichos sistemas. Como ya se ha mencionado con anterioridad los fármacos a evaluar fueron irinotecán, doxorubicina y procabazina, este último profármaco es usado en el tratamiento de leucemia, por lo que el modelo celular fue este tipo de cáncer, se usó la línea celular MOLT-4, la cual es una línea de leucemia aguda de linfocitos T.

Debido a que los protocolos tradicionales de viabilidad celular están basados en reacciones de oxidorreducción como el MTT y MTS y que la actividad lacasa interfiere en ellos, se propuso el uso de un protocolo diferente para la determinación de la viabilidad. Se ensayó como indicador de viabilidad la internalización del colorante rojo neutro.

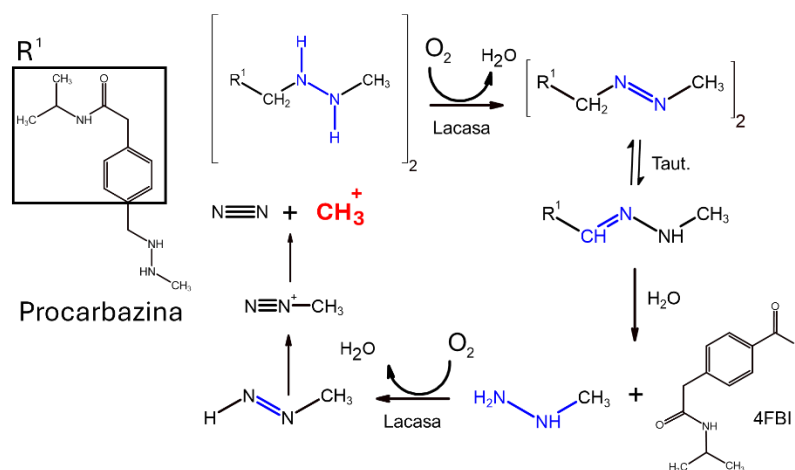


Figura 21. Mecanismo propuesto para la oxidación de la procabazina y la formación final del catión metilo

Este colorante en solución a pH neutro presenta una carga neutra por lo que puede entrar a la célula por canales o poros presentes, está documentado que entra principalmente por los canales iónicos los cuales son altamente activos para regular la homeostasis del pH intracelular; una vez dentro de la célula el colorante toma una carga ligeramente positivo hasta llegar a los lisosomas, donde al estar en un ambiente completamente ácido, el rojo neutro toma un carácter lipófilo, asociándose y acumulándose directamente en la membrana lisosomal (Repetto et al., 2008), por lo que la acumulación de este colorante es un indicador de viabilidad celular.

Al estandarizar el método teniendo en cuenta todas las consideraciones mencionadas por Repetto y colaboradores, se procedió a caracterizar la línea celular con este medio de viabilidad donde los resultados se condensan en la tabla 5 y en la figura 14, en donde se reportan los IC_{50} y IC_{20} , siendo este último la condición usada para determinar el efecto sinérgico entre la lacasa y los nanorreactores, en presencia de los fármacos.

Esta etapa es crucial para conocer si la hipótesis de este trabajo se cumple o no. Los resultados iniciales de la primer ronda de viabilidad por citometría con la tinción FDA/PI nos esbozaron varios fenómenos, los

resultados están graficados en las figuras 15, 16 y 17.

Para el caso de la evaluación con la doxorubicina (figura 15) en la comparación de células vivas (15 D) se observó que no existen una diferencia significativa entre el tratamiento de lacasa libre y lacasa con doxorubicina, el mismo fenómeno sucede para la comparación de VLP-saLac y VLP-saLac/Doxorubicina.

Sin embargo, cuando se analizaron estas mismas poblaciones con la tinción de PI, observamos un incremento bastante significativo en la combinación de elementos contra sus elementos individuales, la explicación para esto radica en la subpoblación que se forma y que se logra observar en los citogramas presentados en la figura 15, en donde en la zona FDA⁺ la cual corresponde a células vivas, está clara la formación de una segunda población con una intensidad del fluoróforo positiva pero menor a la principal.

Esto nos sugiere que existe una población que metabólicamente está aletargada en comparación de la principal, sin embargo, con esta tinción no es posible caracterizar con certeza más allá de células viables a las células muertas, por lo que se contrastan estos resultados con el perfil de los mecanismos de muerte celular que están presentados en la figura 18, las correspondientes a estos fármacos son las 4 gráficas de la izquierda que están en colores cálidos.

Con esta comparación corroboramos que el porcentaje de células viables (Q1) entre tratamientos disminuye en presencia del elemento catalítico (Lacasa o VLP-saLac) y del fármaco. Este fenómeno es reproducible para las dos poblaciones derivadas de la apoptosis como vía de muerte celular, apoptosis temprana (Q3) y necroptosis (Q4), siendo la población apoptótica la que presenta mayor incremento en presencia de ambos elementos.

Este análisis fue consistente para los 3 fármacos estudiados, en donde la población necrótica no presentó cambios significativos, para la doxorubicina hubo incremento en la población apoptótica y necroptótica. Para el irinotecán la disminución de la población de células vivas fue sustancial y el incremento de la población apoptóticas solo se presentó en el sistema con VLP-saLac, mientras para el sistema con Lacasa libre el incremento significativo se presentó en la población necroptótica.

Este fenómeno nos podría sugerir un efecto de aletargamiento catalítico, ya que en presencia del nanorreactor, la conversión de todos los productos es mucho más lenta que en la forma libre, es por esto por lo que para la lacasa libre la mayor parte de la población se encontró en apoptosis tardía. Y finalmente para la procarbazona, la disminución de células vivas fue en un nivel de significancia mínima, sin embargo,

la mayor relevancia fue en el aumento de la población necroptótica y la disminución de la población apoptótica.

Es importante, además de analizar los resultados de los fármacos también tener en cuenta los efectos de los elementos catalíticos individuales, ya que como se observa en la figura 18, al comparar los nanorreactores y la lacasa libre contra el control de viabilidad (PBS), podemos observar que hay una variación significativa en todas las poblaciones, haciendo que en la población Q1 los nanorreactores generan un efecto pero este impacto es mayor con la lacasa libre; mientras que éste patrón se repite para las poblaciones Q2 y Q3.

Estos resultados previamente mencionados además de demostrar el efecto sinérgico entre la parte catalítica y el fármaco, también evidencia un efecto pro-apoptótico propio de la lacasa. Además, considerando que el efecto de los nanorreactores es menor que la lacasa libre estos siguen el mismo patrón, y también se demuestra que la encapsidación de este tipo de enzimas, además de su protección, también reduce su efecto citotóxico de la enzima, pero sin perder sus propiedades de oxidación.

La evidencia mostrado genera argumentos para demostrar que la lacasa tiene un efecto antitumoral propio, así mismo, como activador de profármacos a nivel celular, haciendo que nuestra hipótesis inicial se cumpla.

Capítulo 5. Conclusiones

El cáncer es una enfermedad que día con día crece en números, de donde la búsqueda de nuevas estrategias para su tratamiento más eficientes es un desafío constante. Hoy en día el uso de quimioterapia para el tratamiento de esta enfermedad es muy común, por lo que la necesidad de encontrar maneras y alternativas para incrementar la eficiencia de este tipo de tratamientos y sobre todo reducir los drásticos efectos secundarios es un campo de investigación esencial.

Una de las desventajas principales de la quimioterapia es su administración sistémica, haciendo que la citotoxicidad del compuesto administrado se presente en todo el cuerpo, afectando a su paso diferentes tejidos y células sanas. Además, dentro de las estrategias metabólicas de las células tumorales esta la supresión de la expresión de enzimas tipo CYP450 que ayudan a la activación de profármacos para el tratamiento del cáncer.

Uniando estas problemáticas, la propuesta del uso de nuevas enzimas como la lacasa en sistemas nanométricos para su entrega celular, se presenta como una alternativa interesante. En este trabajo se realizó inicialmente un análisis *in silico* para demostrar la capacidad de la lacasa de *Corriolopsis gallica* para oxidar profármacos y generar sus versiones activas, concluyendo que es posible basándonos en tres parámetros, posicionamiento en sitio activo, energía de afinidad y la distancia entre el átomo donador de la molécula sustrato y el cobre T1.

Se caracterizó la lacasa, tanto su forma nativa como su forma modificada conteniendo un mayor número de cargas negativas en su superficie, demostrando que no existían variaciones en la afinidad de los sustratos usados, pero si en la velocidad de reacción, lo que sugiere que al funcionalizar la lacasa se generan impedimentos físicos que generan que la reacción se más lenta. Se ensamblaron nanorreactores con un protocolo nuevo y diseñado por el autor de este trabajo.

El protocolo generó nanorreactores ensamblados y puros, permitiéndonos caracterizar diferente relaciones másicas de estos nanorreactores. Se demostró que la lacasa es capaz de biotransformar fármacos por medio de HPLC y por medio de espectrometría de masas se identificaron los productos de reacción permitiéndonos establecer posibles mecanismo de reacción de oxidación, y por lo tanto de activación de profármacos, especialmente para el caso de la procarbazona, en donde se encontraron y caracterizaron los productos de reacción asociado a su metabolización por un CYP.

Con los resultados y discusión de los experimentos de cultivo celular se demostró el efecto sinérgico en la formación de poblaciones apoptóticas y necroptótica en la presencia del elemento catalítico y el fármaco, adicionalmente, se evidenció que también la lacasa por si sola tiene un efecto pro apoptótico al igual que los nanorreactores conteniendo actividad lacasa.

Finalmente, podemos concluir que la actividad lacasa presenta una actividad citotóxica en contra de células tumorales y que en presencia de los profármacos usados en la quimioterapia presenta un efecto sinérgico. Los nanorreactores basados en virus son una alternativa para proteger la actividad catalítica de la enzima y la posibilidad de dirigir esta terapia específicamente a los tejidos y células tumorales, evitando la administración sistémica y sobre todo reduciendo los efectos secundarios tan agresivos de la quimioterapia.

Capítulo 6. Perspectivas

Varios puntos se han demostrado en esta tesis sin embargo, se generan nueva incógnitas asociadas a la investigación generada, principalmente y las evidente es la cuantificación y rendimiento del confinamiento de la lacasa dentro de las VLPs de BMV.

Existen varias propuestas para elucidar dicha incógnita, por ejemplo, se propone el uso de etiquetas fluorescentes a la superficie de la lacasa, una vez hecho esto, generar una relación de fluorescencia y concentración de proteína, la cual se usaría como curva patrón una vez encapsidada, por otro lado, se pueden usar técnicas de mayor inversión como lo podría ser espectrometría de masas para determinar la relación entre las dos proteínas involucradas (CP y Lacasa) o incluso técnicas como la espectroscopia de plasma con acoplamiento inductivo que nos determinar la cantidad de átomos de cobre en una muestra, lo cual se podría relacionar directamente con la concentración de lacasa.

Por otro lado, también como perspectiva del proyecto es proponer y ampliar el panel de modelos celulares de cáncer para determinar las diferencias en función a dicho parámetro.

Literatura citada

- Arca-Ramos, A., Ammann, E. M., Gasser, C. A., Nastold, P., Eibes, G., Feijoo, G., Lema, J. M., Moreira, M. T., & Corvini, P. F. X. (2016). Assessing the use of nanoimmobilized laccases to remove micropollutants from wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(4), 3217–3228. <https://doi.org/10.1007/S11356-015-5564-6>
- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., Herrera De Los Santos, M., Levin, L., Rojo-Domínguez, A., Romero-Martínez, D., Saparrat, M. C. N., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2019). *Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation*. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2013.03.001>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21834>
- Cadena-Nava, R. D., Comas-Garcia, M., Garmann, R. F., Rao, A. L. N., Knobler, C. M., & Gelbart, W. M. (2012). Self-Assembly of Viral Capsid Protein and RNA Molecules of Different Sizes: Requirement for a Specific High Protein/RNA Mass Ratio. *Journal of Virology*, 86(6), 3318–3326. <https://doi.org/10.1128/jvi.06566-11>
- 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. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0345-2>
- Chauhan, K., Zárate-Romero, A., Sengar, P., Medrano, C., & Vazquez-Duhalt, R. (2021). Catalytic Kinetics Considerations and Molecular Tools for the Design of Multienzymatic Cascade Nanoreactors. *ChemCatChem*, 13(17), 3732–3748. <https://doi.org/10.1002/CCTC.202100604>
- Chauhan, P. S., Kumarasamy, M., Sosnik, A., & Danino, D. (2019). Enhanced Thermostability and Anticancer Activity in Breast Cancer Cells of Laccase Immobilized on Pluronic-Stabilized Nanoparticles. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 11(43), 39436–39448. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b11877>
- Chefetz, B., Chen, Y., & Hadar, Y. (1998). Purification and Characterization of Laccase from *Chaetomium thermophilum* and Its Role in Humification. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 64, Issue 9). <https://doi.org/10.1128/AEM.64.9.3175-3179.1998>
- Clark, M., Tepper, K., Petroll, K., Kumar, S., Sunna, A., & Maselko, M. (2022). Bioremediation of Industrial Pollutants by Insects Expressing a Fungal Laccase. *ACS Synthetic Biology*, 11(1), 308–316. <https://doi.org/10.1021/ACSSYNBIO.1C00427>
- Daniel, M. C., Tsvetkova, I. B., Quinkert, Z. T., Murali, A., De, M., Rotello, V. M., Kao, C. C., & Dragnea, B. (2010). Role of surface charge density in nanoparticle-templated assembly of bromovirus protein cages. *ACS Nano*, 4(7), 3853–3860. <https://doi.org/10.1021/NN1005073>

- De Montellano, P. R. O. (2013). Cytochrome P450-activated prodrugs. *Future Medicinal Chemistry*, 5(2), 213–228. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.197>
- DePillis, G. D., Sishta, B. P., Mauk, A. G., & Ortiz De Montellano, P. R. (1991). Small substrates and cytochrome c are oxidized at different sites of cytochrome c peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 266(29), 19334–19341. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)55002-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)55002-X)
- Galliker, P., Hommes, G., Schlosser, D., F-X Corvini, P., & Shahgaldian, P. (2010). Laccase-modified silica nanoparticles efficiently catalyze the transformation of phenolic compounds. *Journal of Colloid and Interface Science*, 349(1), 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.05.031>
- Gillitzer, E., Willits, D., Young, M., & Douglas, T. (2002). Chemical modification of a viral cage for multivalent presentation. *Chemical Communications*, 2(20), 2390–2391. <https://doi.org/10.1039/B207853H>
- Guengerich, F. P. (2001). Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 14(6), 611–650. <https://doi.org/10.1021/TX0002583>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Harahap, Y., Ardiningsih, P., Winarti, A. C., & Purwanto, D. J. (2020). Analysis of the doxorubicin and doxorubicinol in the plasma of breast cancer patients for monitoring the toxicity of doxorubicin. *Drug Design, Development and Therapy*, 14, 3469–3475. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S251144>
- Huttunen, K. M., Mähönen, N., Raunio, H., & Rautio, J. (2008). Cytochrome P450-Activated Prodrugs: Targeted Drug Delivery. *Current Medicinal Chemistry*, 15(1), 2346–2365. <https://doi.org/10.2174/092986708785909120>
- Jinga, L. I., Tudose, M., & Ionita, P. (2022). Laccase–TEMPO as an Efficient System for Doxorubicin Removal from Wastewaters. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(11), 6645. <https://doi.org/10.3390/ijerph19116645>
- Jones, S. M., & Solomon, E. I. (2015). Electron transfer and reaction mechanism of laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(5), 869–883. <https://doi.org/10.1007/S00018-014-1826-6>
- Kelbert, M., Pereira, C. S., Daronch, N. A., Cesca, K., Michels, C., de Oliveira, D., & Soares, H. M. (2021). Laccase as an efficacious approach to remove anticancer drugs: A study of doxorubicin degradation, kinetic parameters, and toxicity assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 409, 124520. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.124520>
- Klapper, M. H., & Klotz, I. M. (1972). [46] Acylation with dicarboxylic acid anhydrides. *Methods in Enzymology*, 25(C), 531–536. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(72\)25050-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(72)25050-9)
- Majerská, M., Jakubec, M., Klimša, V., Rimpelová, S., Král, V., & Štěpánek, F. (2019). Microgel Bioreactors for Cancer Cell Targeting by pH-Dependent Generation of Radicals. *Molecular Pharmaceutics*, 16(1), 3275–3283. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00531>
- Mansuy, D. (1998). The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 121(1–3), 5–14. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)10026-9](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10026-9)

- Meel, R., Sulheim, E., Shi, Y., Kiessling, F., M Mulder, W. J., & Lammers, T. (2019). Smart cancer nanomedicine. *Nature Nanotechnology*, 14(11), 1007–1017. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0567-y>
- Min, K., Jee, S. C., Sung, J. S., & Kadam, A. A. (2018). Anti-proliferative applications of laccase immobilized on super-magnetic chitosan-functionalized halloysite nanotubes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118(1), 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.074>
- Núñez-Rivera, A., Fournier, P. G. J., Arellano, D. L., Rodriguez-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. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.28>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/JCC.20084>,
- Qwebani-Ogunleye, T., Kolesnikova, N. I., Steenkamp, P., De Koning, C. B., Brady, D., & Wellington, K. W. (2017). A one-pot laccase-catalysed synthesis of coumestan derivatives and their anticancer activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 25(1), 1172–1182. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.12.025>
- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols* 2008 3:7, 3(7), 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- Rohovie, M. J., Nagasawa, M., & Swartz, J. R. (2017). Virus-like particles: Next-generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery. *Bioengineering & Translational Medicine*, 2(1), 43–57. <https://doi.org/10.1002/BTM2.10049>
- Román, R., Torres-Duarte, C., Ayala, M., & Vázquez-Duhalt, R. (2010). *Producción a escala piloto de lacasa de Coriolopsis gallica* (Vol. 32). <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2VDS>
- Sánchez-Sánchez, L., Cadena-Nava, R. D., Palomares, L. A., Ruiz-Garcia, 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. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0127-z>
- Silva-Torres, O., Bojorquez-Vazquez, L., Simakov, A., & Vazquez-Duhalt, R. (2019). Enhanced laccase activity of biocatalytic hybrid copper hydroxide nanocages. *Enzyme and Microbial Technology*, 128, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.05.008>
- Smith, N. F., Figg, W. D., & Sparreboom, A. (2004). Recent advances in pharmacogenetic approaches to anticancer drug development. *Drug Development Research*, 62(3), 233–253. <https://doi.org/10.1002/DDR.10361>
- Sun, J., DuFort, C., Daniel, M. C., Murali, A., Chen, C., Gopinath, K., Stein, B., De, M., Rotello, V. M., Holzenburg, A., Kao, C. C., & Dragnea, B. (2007). Core-controlled polymorphism in virus-like

- particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(4), 1354–1359. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0610542104>
- 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. <https://doi.org/10.1002/biot.201600706>
- Tinoco, Pickard, & Vazquez-Duhalt. (2001). Kinetic differences of purified laccases from six pleurotus ostreatus strains. *Letters in Applied Microbiology*, 32(5), 331–335. <https://doi.org/10.1046/J.1472-765X.2001.00913.X>,
- Tscheuschner, G., Ponader, M., Raab, C., Weider, P. S., Hartfiel, R., Kaufmann, J. O., Völzke, J. L., Bosc-Bierne, G., Prinz, C., Schwaar, T., Andrie, P., Bäßler, H., Nguyen, K., Zhu, Y., Mey, A. S. J. S., Mostafa, A., Bald, I., & Weller, M. G. (2023). Efficient Purification of Cowpea Chlorotic Mottle Virus by a Novel Peptide Aptamer. *Viruses*, 15(3), 697. <https://doi.org/10.3390/V15030697/S1>
- Vandertol-Vanier, H. A., Vazquez-Duhalt, R., Tinoco, R., & Pickard, M. A. (2002). Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of Coriolopsis gallica laccase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 214–220. <https://doi.org/10.1038/SJ.JIM.7000308>
- Wang, Q., Jiang, J., & Gao, L. (2021). Nanozyme-based medicine for enzymatic therapy: progress and challenges. *Biomedical Materials*, 16(4), 042002. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ABE7B4>
- Wang, X., Hui, R., Chen, Y., Wang, W., Chen, Y., Gong, X., & Jin, J. (2019). Discovery of novel doxorubicin metabolites in MCF7 doxorubicin-resistant cells. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01434>
- Wellington, K. W., & Kolesnikova, N. I. (2012). A laccase-catalysed one-pot synthesis of aminonaphthoquinones and their anticancer activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(14), 4472–4481. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.05.028>
- Wolfenden, B. S., & Willson, R. L. (1982). Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 7, 805–812. <https://doi.org/10.1039/P29820000805>
- Xu, G., & Mcleod, H. L. (2001). Strategies for Enzyme/Prodrug Cancer Therapy 1. *Clinical Cancer Research*, 7(11), 3314–3324. <http://aacrjournals.org/clincancerres/article-pdf/7/11/3314/2077702/df1101003314.pdf>
- Zeng, X., Cai, H., Yang, J., Qiu, H., Cheng, Y., & Liu, M. (2019). Pharmacokinetics and cardiotoxicity of doxorubicin and its secondary alcohol metabolite in rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 116. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108964>
- Zhao, Y.-N., Zhang, W., Chen, Y.-C., Fang, F., & Liu, X.-Q. (2012). Relative imbalances in the expression of catechol-O-methyltransferase and cytochrome P450 in breast cancer tissue and their association with breast carcinoma. *Maturitas*, 72(2), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2012.03.003>

Anexos

1. Controles de citometría

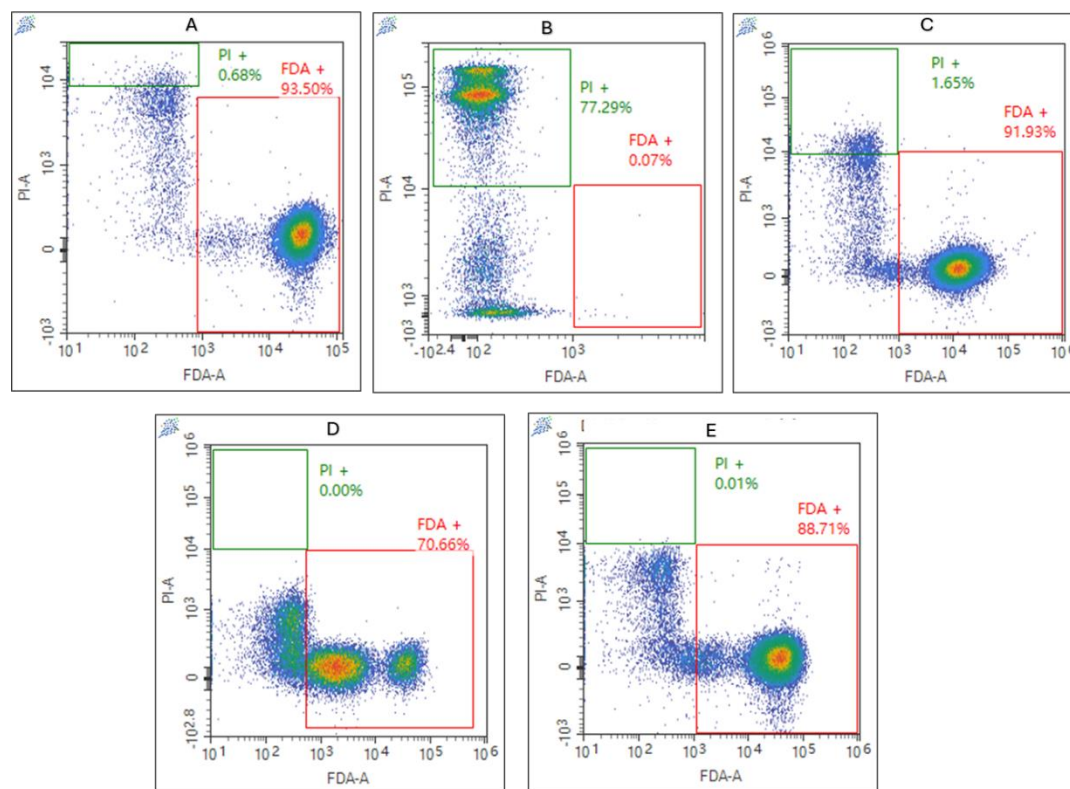


Figura 22. Citogramas de controles para la tinción FDA/PI. A) PBS, B) DMSO 10%, C) Virus. D) Lacasa y E) VLP-saLac

2. Citogramas de poblaciones de muerte celular

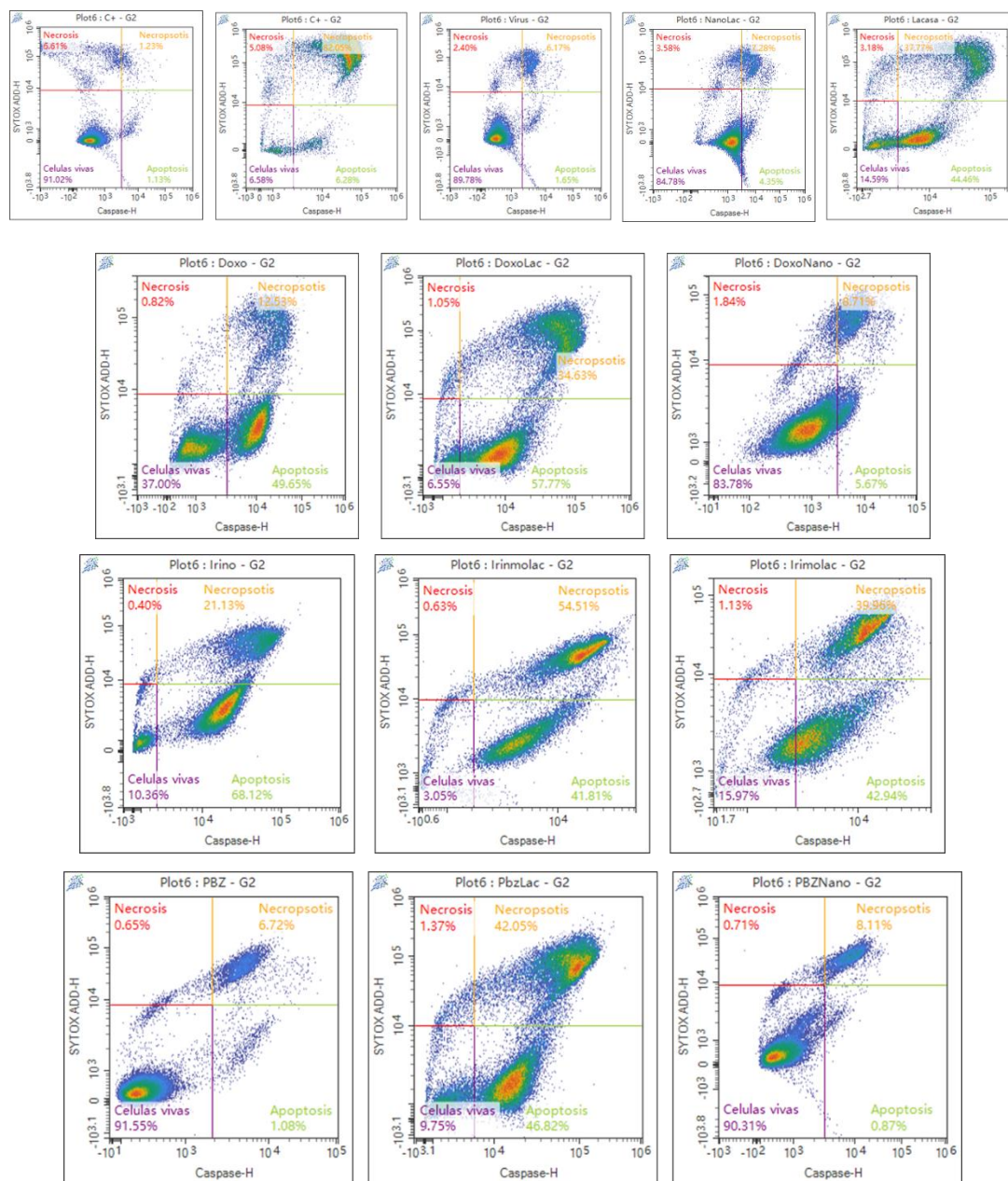


Figura 23. Citogramas de la doble tinción para determinar las poblaciones estadios celulares de muerte.