



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE MOLÉCULAS ORGÁNICAS
FLUORESCENTES Y NANOPARTÍCULAS FORMADAS POR
PROTEÍNAS VIROMIMÉTICAS Y DNA**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO**

PRESENTA

EMILIO ZENDEJAS LÓPEZ



MÉXICO, CDMX - 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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 titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: **Dr. Rodríguez Sotres Rogelio**
Vocal: **Dr. Del Río Portilla José Federico**
Secretario: **Dr. Hernández García Armando**
Primer suplente: **Mtra. Rodríguez Alegría María Elena**
Segundo suplente: **Dra. Gama González Silvia Citlalli**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 8 EDIFICIO B DEL DEPARTAMENTO DE BIOMACROMOLÉCULAS,
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Armando Hernández García



Sustentante:

Emilio Zendejas López



Somos una sociedad científica
... Nuestro destino es el conocimiento

Jacob Bronowski

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica que me brindó y por ser como una segunda casa para mí.

Gracias a la Facultad de Química por consolidar mi formación y al Instituto de Química por permitirme ser parte de una gran institución. De igual forma agradezco el apoyo económico otorgado por el Instituto de Química.

Al personal técnico de los laboratorios de Servicios Analíticos, Quím. María de la Paz Orta Pérez, M. en C. Lucero Mayra Ríos Ruiz y Q.F.B. María del Rocío Patiño Maya.

Gracias al Dr. Armando Hernández García por brindarme su apoyo, sus consejos y la oportunidad de realizar este fantástico proyecto. También le agradezco al Dr. Sergio Sánchez Esquivel del IIB y a los miembros del jurado por apoyarme durante este proceso.

Agradezco al M.C. Oscar de Jesús Vargas Dorante por haber realizado las pruebas de citotoxicidad y al M.C. Ernesto Cazares Vargas por su guía, así como al resto de los miembros del laboratorio por sus consejos y apoyo.

Este trabajo jamás habría sido posible sin el apoyo incondicional de mi madre y mi abuelita a quienes les dedico este trabajo con todo mi cariño.

A mis amigos de la preparatoria y la universidad, por creer en mí y enseñarme que el viaje de la vida vale la pena con personas como ustedes.

A mi Alicia, por inspirar e iluminar mi futuro.

CONTENIDO

1	SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	I
2	INTRODUCCIÓN	III
3	ANTECEDENTES	5
3.1.	BIONANOTECNOLOGÍA	5
3.2.	ACARREADORES DE FÁRMACOS	5
3.3.	PROTEÍNAS TIPO VIRUS ARTIFICIAL	7
3.4.	AUTOENSAMBLAJE	8
3.5.	FLUORESCENCIA.....	10
4	OBJETIVO GENERAL.....	14
5	OBJETIVOS PARTICULARES	14
6	HIPÓTESIS	14
7	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	15
7.1.	PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA C ₄ -S _N -B ^{K12}	15
7.2.	SDS-PAGE	15
7.3.	ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	16
7.4.	PRODUCCIÓN DE DNA PLASMÍDICO.....	16
7.5.	DESALADO DE DNA DE ESPERMA DE SALMÓN	16
7.6.	ENSAYO DE CAMBIO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA	16
7.7.	ENSAYOS DEL MONITOREO DEL AUTOENSAMBLAJE	17
7.8.	ENSAYOS DE INTERCALACIÓN DE MOLÉCULAS FLUORESCENTES EN EL DNA	18
7.9.	ENSAYOS DE TOXICIDAD EN LÍNEAS CELULARES	19
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
8.1.	PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA	20
8.2.	ENSAYOS DE CAMBIO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA	20
8.3.	INTERACCIÓN ENTRE TIOFLAVINA T Y PROTEÍNA.....	21
8.4.	INTERCALACIÓN DE MOLÉCULAS FLUORESCENTES	25
8.5.	ENSAYOS DE TOXICIDAD	28
9	CONCLUSIONES	29
10	PERSPECTIVAS	30
11	REFERENCIAS.....	31
12	ANEXOS	33
12.1.	PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA	33
12.2.	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LAS PROTEÍNAS.....	34
12.3.	PLÁSMIDO P-REDOX	35
12.4.	MEDIOS DE CULTIVO	36

1 SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

a	Proporción de pares de bases de DNA por mol de fluoróforo
C_4-B^{K12}	Proteína con los bloques <i>C</i> y <i>B</i>
$C_4-S_4-B^{K12}$	Proteína con los bloques <i>C</i> , S_4 y <i>B</i>
$C_4-S_{10}-B^{K12}$	Proteína con los bloques <i>C</i> , S_{10} y <i>B</i>
$C_4-S_{14}-B^{K12}$	Proteína con los bloques <i>C</i> , S_{14} y <i>B</i>
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
DTT	Ditiotreitol
e.s.	Esperma de salmón
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMSA	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética
g	Gramos
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
LB	Medio Luria-Bertani
M	Concentración molar
MALDI-TOF	Ionización mediante laser asistida por matriz con detección de masa por tiempo de vuelo
MeOH	Metanol
MGY	Medio mínimo de glicerol
MM	Medio mínimo de metanol
MPM	Marcador de peso molecular
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetros
NP	Proporción entre las cargas positivas de los residuos de aminoácidos de lisina y las cargas negativas de los fosfatos del DNA
O.D.	Densidad óptica
pb	Pares de bases
pDNA	Ácido desoxirribonucleico plasmídico
RCF	Fuerza centrífuga relativa o fuerza g
S_0	Estado basal
S_1	Estado excitado
S_2	Estado excitado
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
STF	Estefimicina B
TAE	Disolución buffer de base Tris, acetato y EDTA

ThT	Tioflavina T
U.A.	Unidades arbitrarias
YNB	Base de nitrógeno de levadura
$Z_{NH_3^+}$	Cargas positivas de los residuos de aminoácidos de lisina
$Z_{PO_4^-}$	Cargas negativas de los fosfatos del DNA

Aminoácidos

A	Alanina
R	Arginina
N	Asparagina
D	Ácido aspártico
C	Cisteína
F	Fenilalanina
G	Glicina
Q	Glutamina
E	Ácido glutámico
H	Histidina
I	Isoleucina
L	Leucina
K	Lisina
M	Metionina
P	Prolina
S	Serina
Y	Tirosina
T	Treonina
W	Triptófano
V	Valina

Nucleótidos

c	Desoxicitosina trifosfato
a	Desoxiadenosina trifosfato
t	Dexositimidina trifosfato
g	Desoxiguanina trifosfato

2 INTRODUCCIÓN

El tratamiento de las enfermedades es materia de estudio de muchos científicos desde diferentes áreas de la investigación. Cada vez se requieren nuevos y mejorados tratamientos, con mayor especificidad y eficacia que permitan evitar efectos no deseados en el paciente. Para enfrentar este problema se ha recurrido a los sistemas de entrega de fármacos. El uso de partículas virales para el acarreamiento de moléculas como fármacos o DNA terapéutico ha representado una prometedora alternativa a los métodos convencionales trayendo múltiples ventajas.

En el presente escrito, se exponen los resultados que se obtuvieron sobre el estudio de un sistema de proteínas tipo virus artificial. Estas proteínas además de tener la disposición de autoensamblarse para formar nanopartículas tipo rodillo, tienen la capacidad de unirse a ácidos nucleicos. Estas proteínas tipo virus tienen un dominio funcional cargado positivamente que puede interactuar electrostáticamente con una cadena de DNA. El estudio que se presenta consiste en el seguimiento de este proceso de autoensamblaje por medio del monitoreo de la fluorescencia, a través de un fluoróforo extrínseco llamado tioflavina T, que tiene afinidad hacia estructuras β presentes en las proteínas.

Así mismo, estas nanopartículas conformadas por DNA-proteína son capaces de acarrear fármacos toda vez que estos puedan ser intercalados en el DNA, quedando encapsulados por las nanopartículas. Debido a la fluorescencia que presentan varios de estos fármacos, como la doxorrubicina o la estefimicina B, es posible seguir su interacción con las nanopartículas. En la **Figura 1** se muestra un resumen gráfico con el planteamiento del sistema de estudio.

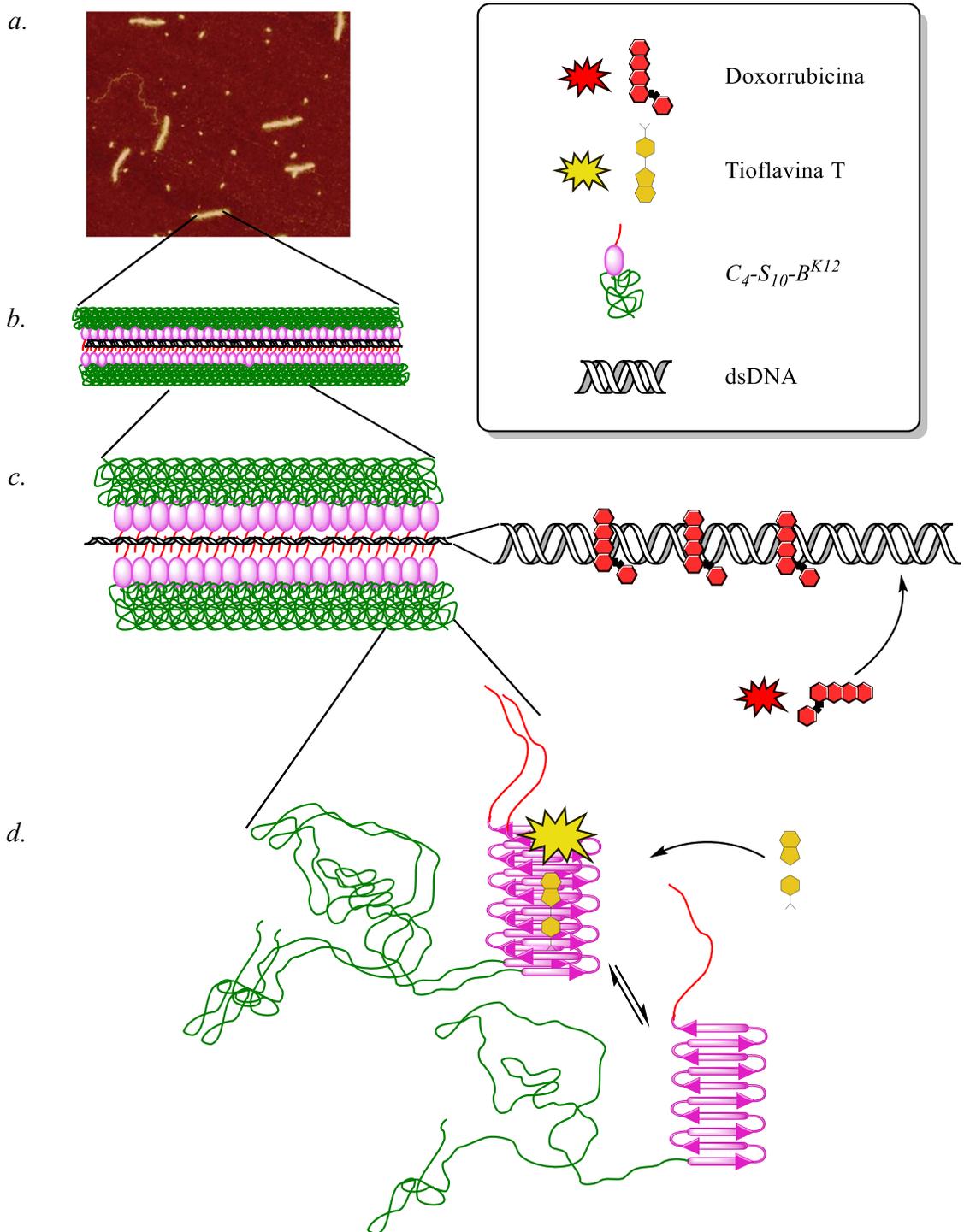


Figura 1. Planteamiento del esquema del sistema de estudio. En (a) se presenta una imagen tomada en microscopio de fuerza atómica de las nanopartículas formadas (modificada de la referencia 1); en (b) se representa un esquema hipotético de la distribución del DNA y las proteínas $C_4-S_{10}-B^{K12}$ en la formación de nanopartículas; en (c) se parte de un segundo aumento presentando la distribución de las moléculas de doxorubicina intercaladas en el DNA encapsulado por las proteínas; finalmente en (d) se representa el autoensamblaje de las proteínas y la intercalación de las moléculas de tioflavina T en el dominio funcional S_{10} de las proteínas.

3 ANTECEDENTES

3.1. Bionanotecnología

La nanotecnología es un concepto que tiene sus orígenes en 1959 durante una conferencia del físico Richard P. Feynman en el CALTECH. Durante su intervención habló sobre la manipulación de la materia a escala nanométrica dando arranque a toda una serie de desarrollos tecnológicos en física, química y biología ². Aunque el significado de nanotecnología varía, en general hace referencia a un campo multidisciplinario que se encarga del estudio, el diseño, la síntesis y la aplicación de materiales y sistemas funcionales a través del control de la materia a escala nanométrica ³.

Por otra parte, la biotecnología moderna es una disciplina que tuvo su nacimiento en la segunda mitad del siglo XX a partir del desarrollo de las técnicas del DNA recombinante y cuyo campo de estudio se enfoca en el uso de sistemas biológicos o partes de ellos para la producción de productos de interés industrial ⁴.

A partir de los conceptos anteriores se construye el de la bionanotecnología. Etimológicamente, la palabra bionanotecnología está constituida por tres términos clave, *bios* que significa vida y hace alusión al campo en el cual se enfoca esta disciplina, *nano* que hace referencia a lo muy pequeño y *tecno* que viene de técnica. De esta manera la podemos definir como el estudio de sistemas de escala nanométrica en el campo de la biología ⁴.

El campo de aplicación de la bionanotecnología es amplio, desde la medicina y la industria alimentaria, hasta la agricultura y la biorremediación. La nanomedicina es un campo intrínsecamente beneficiado gracias al desarrollo de sistemas moleculares cuyo objetivo se basa en tres áreas principales: la liberación de fármacos, cuyo enfoque es la construcción de sistemas que transporten y entreguen fármacos de manera controlada; diagnóstico, que tiene la finalidad de identificar una enfermedad por medio de nanosistemas o nanobiosensores; y terapia, que pretende diseñar y aplicar nanomateriales que identifiquen una patología y liberen moléculas terapéuticas ^{3,5}.

3.2. Acarreadores de fármacos

Los acarreadores de fármacos son sistemas moleculares que tienen la finalidad de aumentar la biodisponibilidad, estabilidad y solubilidad de un fármaco o cualquier sustancia con un fin

terapéutico, ya que estos tienen la capacidad de protegerlos encapsulándolos ⁶. Existen diversos tipos de acarreadores (**Figura 2**), algunos son diseñados a partir de moléculas orgánicas de alta complejidad como son los dendrímeros o los nanotubos, otros parten del empleo de biomoléculas, como el caso de los liposomas y las partículas virales ⁷.

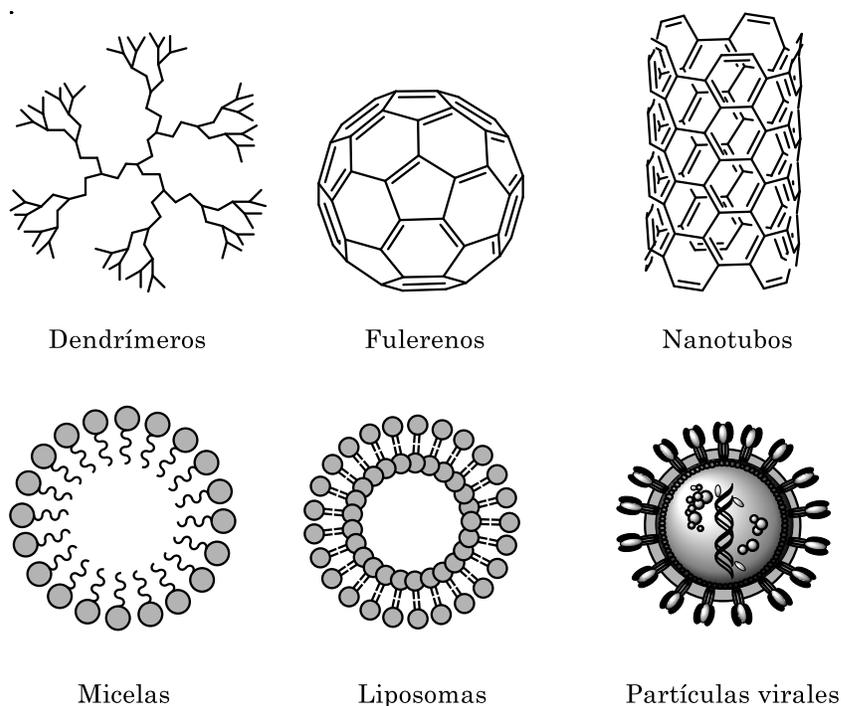


Figura 2. Nanoacarreadores comunes para la entrega de fármacos.

Los dendrímeros, por ejemplo, son macromoléculas ramificadas formadas por un núcleo. Ofrecen ventajas como múltiples sitios de unión y buen efecto de retención que les permite llegar a las células objetivo y buena permeabilidad ⁶. Los liposomas, por otra parte, son acarreadores orgánicos que han tenido gran éxito en la industria farmacéutica durante las últimas décadas ⁸. Los liposomas son estructuras vesiculares de entre 50 y 100 nm compuestas de fosfolípidos. Estos acarreadores de fármacos presentan baja toxicidad y sus propiedades fisicoquímicas y biológicas varían según el tipo de lípido. Algunas de las desventajas son debidas a que los liposomas son reconocidos por el sistema retículo endotelial y son eliminados del cuerpo ⁶.

Las partículas tipo virus son estructuras multiproteicas que mimetizan la organización y conformación de los virus. Generalmente muestran estructuras de forma definida y de tamaño menor a los 100 nm en algunas de sus dimensiones. Este tipo de sistemas provienen de fuentes vegetales, como el virus del mosaico del pepino (CPMV) o el virus del mosaico del tabaco (TMV), bacteriófagos como el MS2 y M13, o de origen animal, como adenovirus. Las

partículas tipo virus son morfológicamente uniformes, biocompatibles y relativamente fáciles de funcionalizar, lo cual los vuelve sistemas muy atractivos para distintos fines biotecnológicos ⁸⁻¹⁰.

3.3. Proteínas tipo virus artificial

Con base en los componentes de un virus es posible construir modelos sintéticos a partir de los cuales se pueden mimetizar algunas funciones de los virus naturales. Por ejemplo, las proteínas de la cápside del Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) interactúan alóstericamente entre ellas. De forma simplificada existen zonas en la secuencia que brinda cierta funcionalidad, como su interacción con ácidos nucleicos o su capacidad de autoensamblarse, lo cual puede llevar al diseño de una proteína con estas funcionalidades ¹¹. Los virus artificiales son sistemas potencialmente útiles, tienen aplicaciones biomédicas y biotecnológicas como acarreadores de ácidos nucleicos en el contexto de terapia génica, vacunas y acarreadores de fármacos ^{8,11}.

3.3.1. Proteína dibloque

En 2012, Hernandez-Garcia y colaboradores lograron el recubrimiento del DNA por medio de una proteína bimodular llamada C_4-B^{K12} (**Figura 3**), la cual está formada por un módulo C que le da estabilidad coloidal, proporcionando un carácter hidrofílico y que está constituido de aproximadamente 400 aminoácidos ^{12,13}; el módulo B consta de un bloque de 12 residuos de aminoácidos de lisina, los que le confieren a la molécula un carácter electrostático permitiendo la asociación con el DNA ¹³. La proteína dibloque C_4-B^{K12} es una proteína producida de manera recombinante en *Komagataella phaffi* (antes conocida como *Pichia pastoris*).

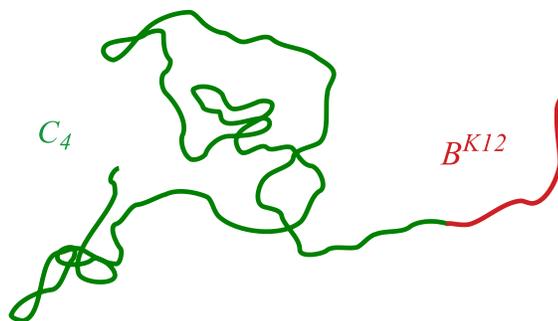


Figura 3. Modelo de la estructura del dibloque C_4-B^{K12} .

3.3.2. Proteína tribloque

Posteriormente en 2014, se añadió un tercer módulo denominado S_n (**Figura 4**), este le confiere la capacidad de encapsular y condensar moléculas de DNA ya que este dominio es de interacción proteína-proteína. Se ha comprobado que la proteína $C_4-S_{10}-B^{K12}$ y $C_4-S_{14}-B^{K12}$ forman nanopartículas alargadas tipo rodillo similares a las del TMV ¹. Sin embargo, no se conoce de manera detallada el mecanismo por el cual la proteína se autoensambla. Conocer el mecanismo de autoensamblaje podría llevar al desarrollo y mejoramiento de las propiedades de la proteína.

El dominio de interacción proteína-proteína S_n , está compuesto por n repeticiones del octapéptido: GAGAGAGQ. El número de repeticiones determina el nivel de cooperatividad de la proteína por lo que se tienen distintas variantes de este módulo. Existen proteínas tribloque $C_4-S_n-B^{K12}$ para $n = 4, 10$ y 14 . En la sección 11.2 del Anexo se muestra la secuencia de aminoácidos de las variantes de la proteína.

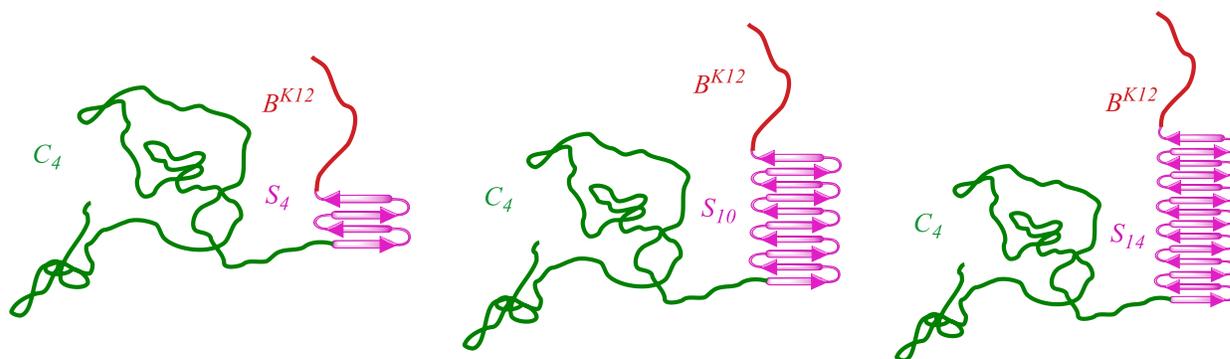


Figura 4. Esquema general de los tres dominios de las proteínas diseñadas $C_4-S_4-B^{K12}$ (izquierda), $C_4-S_{10}-B^{K12}$ (centro) y $C_4-S_{14}-B^{K12}$ (derecha).

Se han realizado simulaciones con dinámica molecular del bloque S_{10} con el fin de conocer la estructura secundaria y las interacciones que ocurren entre dos bloques. Zhao y colaboradores han determinado que diez repeticiones del octapéptido (GAGAGAGQ) forman estructuras tipo rollos β estabilizados por puentes de hidrógeno. Además, los resultados arrojaron que una estructura, previamente considerada como plataforma juega un papel importante en el plegamiento del siguiente rollo β proporcionando así un efecto cooperativo ¹⁴.

3.4. Autoensamblaje

El autoensamblaje es considerado como un tipo de polimerización supramolecular, en la cual las interacciones entre unidades monoméricas son generadas por fuerzas no covalentes y altamente

direccionales que dan como resultado una molécula de alto peso molecular. Una reacción de polimerización depende de factores como la concentración, la presión y la temperatura¹⁵.

Existen varios mecanismos para describir el proceso de polimerización supramolecular, sin embargo, los más utilizados son el isodésmico y el cooperativo (**Figura 5**). En el isodésmico la polimerización ocurre por la formación de enlaces no covalentes de manera reversible e idéntica en todos los pasos de la polimerización. El mecanismo isodésmico es un modelo lineal que se caracteriza por no tener intermediarios y el grado de polimerización depende de las constantes de asociación entre monómeros.

Por otro lado, el mecanismo cooperativo implica un crecimiento no lineal, ya que requiere la formación de núcleos como intermediarios para el proceso de polimerización. Para que se forme el núcleo se debe vencer una barrera energética y a partir de este punto se produce la polimerización; este proceso presenta una concentración o temperatura crítica a la cual el monómero está en equilibrio con el polímero.

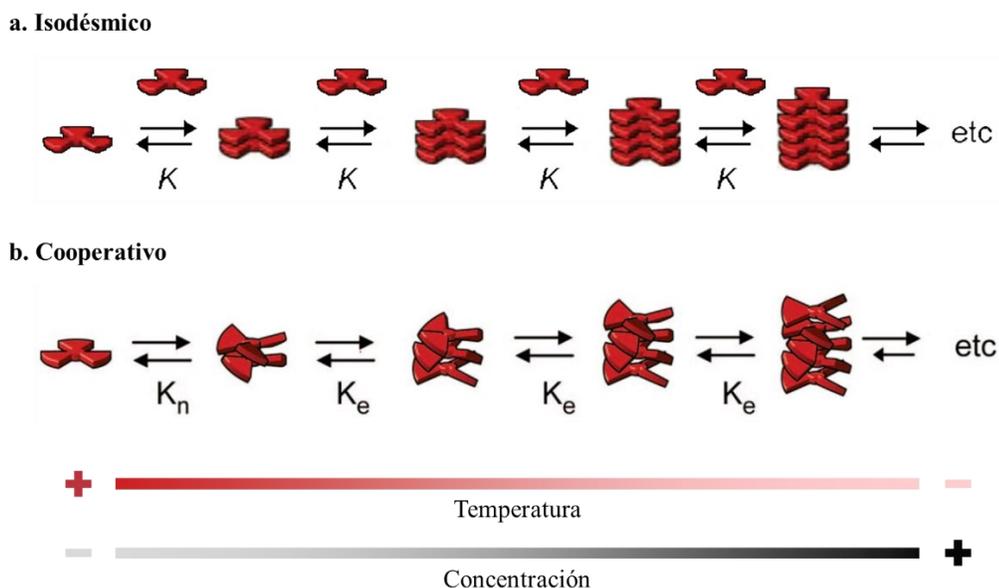


Figura 5. Representación gráfica de la polimerización por (a) mecanismo isodésmico; y (b) mecanismo cooperativo, así como el desplazamiento del equilibrio con base en el aumento o disminución de la concentración y la temperatura (modificado de la referencia¹⁵)

3.5. Fluorescencia

La fluorescencia es un fenómeno físico, en el cual la radiación electromagnética que incide sobre una sustancia excita a los electrones llevándolos a un estado excitado, que dura entre 10^{-9} y 10^{-8} segundos. Posteriormente los electrones regresan a su estado basal emitiendo radiación a una longitud de onda mayor que la inicial ¹⁶.

El diagrama de Jablonski (**Figura 6**) muestra los niveles de energía para una molécula fotoluminiscente. Las líneas curvadas representan los niveles energéticos en diferentes estados electrónicos, las líneas horizontales, están asociadas a los numerosos niveles de energía vibracionales. Cuando las moléculas son excitadas hacia el primer estado excitado pierden el exceso de energía ya sea en forma de calor o por relajación vibracional y es gracias a esto que la fluorescencia de una solución siempre involucra una transición desde el nivel vibracional más bajo de un estado electrónico excitado ¹⁷.

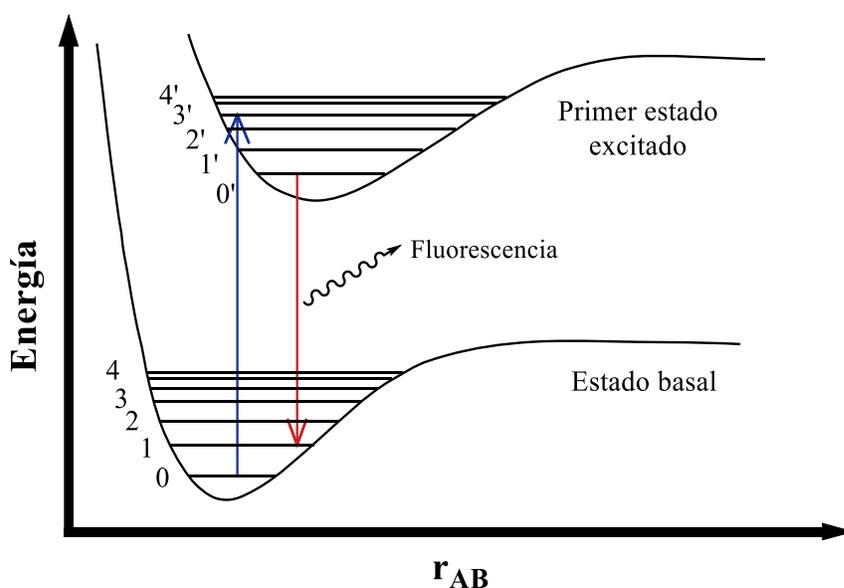


Figura 6. Diagrama de Jablonski donde las líneas curvadas denotan el estado basal y el primer estado excitado. La línea azul representa el proceso de excitación de la molécula, mientras que la roja el regreso al estado basal por el cual se emite fluorescencia.

El rendimiento de la fluorescencia ϕ_{flu} es una relación entre la cantidad de moléculas que manifiestan fluorescencia y el número total de moléculas excitadas. En la ecuación (0.1) se muestra esta relación en la cual, k_{flu} representa la constante asociada al proceso de radiación de fluorescencia; k_{ci} es la constante de conversión interna en la cual no hay emisión; k_{isc} es la constante de entrecruzamiento; finalmente, la k_{reac} está asociada a una reacción fotoquímica.

$$\phi_{fluo} = \frac{k_{fluo}}{k_{fluo} + k_{ci} + k_{isc} + k_{reac}} \quad (0.1)$$

Los fluoróforos son moléculas fluorescentes que tienen un espectro de absorción y emisión bien definidos. Los compuestos que generalmente presentan fluorescencia muy intensa son aquellos que tienen grupos aromáticos con transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de baja energía. Desde el punto de vista empírico, se sabe que la fluorescencia está favorecida en moléculas con estructura rígida ¹⁷.

Los fluoróforos se pueden dividir en dos grandes grupos, intrínsecos y extrínsecos. Los intrínsecos son aquellos que se encuentran de forma implícita en la molécula. Mientras que los extrínsecos son añadidos a la muestra para generar fluorescencia en un sistema que no la tenía inicialmente¹⁸.

3.5.1. Tioflavina T

La tioflavina T (**Figura 7**) es una sal de benzotioazol muy usada en estudios asociados a la enfermedad del Alzheimer debido a su alta afinidad a la proteína amiloide y a las estructuras ricas en hojas β que forman fibras ¹⁹. Sabate y colaboradores han sugerido que la tioflavina T es un rotor molecular donde el enlace C – C entre el benzotioazol y la benzamina le confieren movilidad. Se piensa que el rendimiento de fluorescencia aumenta con la inhibición de su rotación ²⁰.

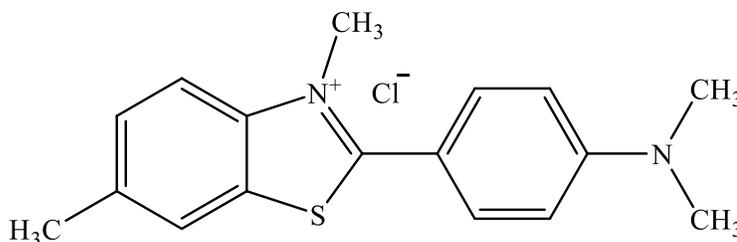


Figura 7. Estructura de la Tioflavina T.

Los primeros en revelar la elevada afinidad de la tioflavina T a las fibras amiloides fueron Vassar y Culling en 1959, demostrando su utilidad como un fluoróforo que aumenta su emisión en presencia de fibras amiloides (**Figura 8**).

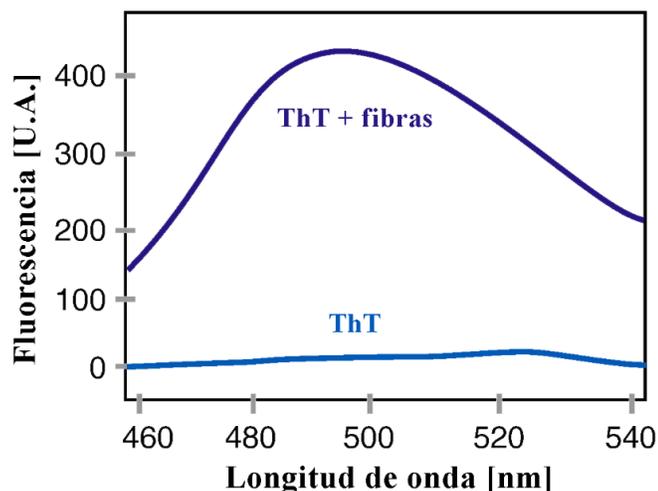


Figura 8. Espectro de fluorescencia de tioflavina T con y sin fibras amiloides (modificado de la referencia ²¹).

En el entendido de que la tioflavina T es una molécula con elevada afinidad a las estructuras basadas en hojas β , su uso se puede extrapolar a otro tipo de proteínas que, de igual manera, formen fibras a través de la interacción entre estructuras β como es el caso del bloque S en las proteínas $C_4-S_{10}-B^{K12}$ y $C_4-S_{14}-B^{K12}$.

3.5.2. Doxorrubicina

La doxorrubicina (**Figura 9**) es una molécula de la familia de las antraciclinas usada para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer tales como, leucemia, cáncer de próstata, hígado, páncreas, estómago, entre otros ¹⁰. El mecanismo de acción de este fármaco se basa en su capacidad de intercalarse en las cadenas de DNA de las células impidiendo el flujo de la información genética e induciendo la muerte celular de forma muy eficiente. Sin embargo, este fármaco presenta una serie de efectos secundarios graves, como cardiotoxicidad, anemia, leucopenia, entre otros, debido a su baja especificidad ^{22,23}. Para resolver este problema se ha procedido al uso de acarreadores de fármacos como liposomas, micelas, y partículas virales ^{10,24}.

La doxorrubicina emite fluorescencia al ser excitada alrededor de 480 nm, con un máximo de emisión a ~ 540 nm ^{22,25}. Esta propiedad de la molécula se puede aprovechar para estudiar por medio de fluorimetría su presencia dentro de un sistema acarreador, ya que cabe mencionar que la fluorescencia emitida por esta molécula disminuye a medida que se incrementa la cantidad de interacciones con el DNA ²⁴.

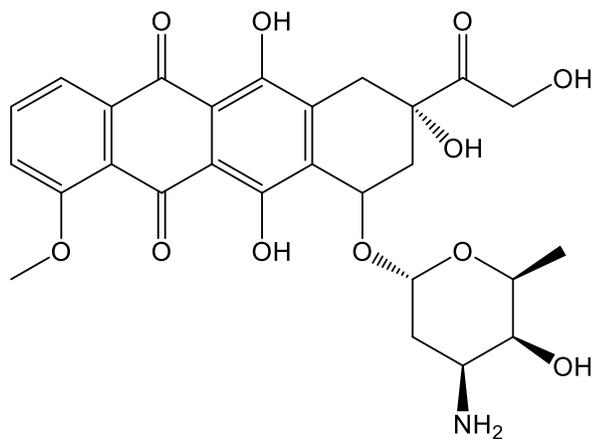


Figura 9. Estructura de la Doxorubicina.

3.5.3. Estefimicina B

La estefimicina B (**Figura 10**) es otra molécula de la familia de las antraciclinas, a diferencia de la doxorubicina, la estefimicina B tiene aplicaciones antimicrobianas ya que afecta principalmente a bacterias Gram positivas; recientemente se ha visto que presenta actividad citotóxica contra *Mycobacterium tuberculosis*²⁶. Emite fluorescencia, al excitar la molécula alrededor de 450 nm²⁷.

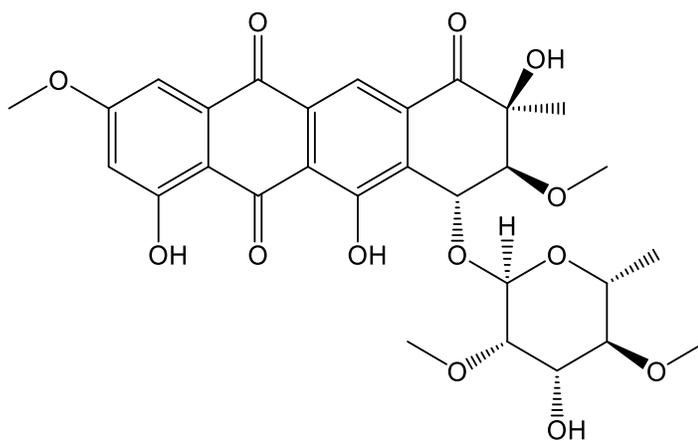


Figura 10. Estructura de la Estefimicina B.

4 HIPÓTESIS

El autoensamblaje de las nanopartículas de proteína-DNA permitirá la interacción con las moléculas fluorescentes estudiadas, tioflavina T, doxorrubicina y estefimicina B.

5 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el autoensamblaje de las proteínas tipo virus artificial $C_4-S_n-B^{K12}$, empleando moléculas fluorescentes y su formación de nanopartículas con fármacos intercalados en el DNA.

6 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar el autoensamblaje de las proteínas $C_4-S_n-B^{K12}$ usando tioflavina T en función de la concentración y la temperatura.
- Evaluar la capacidad de las nanopartículas para interaccionar y acarrear doxorrubicina o estefimicina B.
- Realizar un estudio preliminar del uso biológico de la estefimicina B mediante determinación de su citotoxicidad en una línea de células cancerígenas.

7 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

7.1. Producción de proteína *C₄-S_n-B^{K12}*

7.1.1. Expresión de proteína recombinante

Se inocularon 5 mL de banco con la cepa recombinante de *Komagataella phaffi* (antes conocida como *Pichia pastoris*) en 200 mL de MGY durante 2 días a 30 °C. Al llegar a una O.D. de 6 se centrifugó el inóculo a 20°C, 10 minutos, 8 000 RCF y se transfirió a un medio MM de 600 mL. Se indujo la expresión de la proteína durante 4 días agregando 6 mL de MeOH cada 12 horas y 100 µL de antiespumante (Antifoam FG 10 de Corning®). Finalmente, se centrifugó el medio a 4 °C, 30 minutos, 10 000 RCF, se recolectó el sobrenadante y se almacenó a 4 °C, para su posterior purificación.

7.1.2. Purificación de proteína

El pH del sobrenadante recolectado fue ajustado a 8 con NaOH, se centrifugó a 4 °C, 20 minutos, 10 000 RCF y se colectó la fase soluble la cual fue filtrada, primero a través de un filtro de 450 nm y posteriormente por uno de 220 nm. Se agregó sulfato de amonio hasta el 50% de saturación y se almacenó a 4 °C por una noche, se centrifugó a 4 °C, 30 minutos, 13 000 RCF y se recuperó la fase insoluble. La pastilla se resuspendió en aproximadamente 30 mL de agua MilliQ previamente calentada. Se agregó acetona al 40% v/v y se centrifugó 20 minutos a 10 000 RCF, se le añadió acetona al sobrenadante hasta el 80% v/v y se centrifugó 20 minutos a 10 000 RCF, el sobrenadante se descartó y la acetona se evaporó. El precipitado se resuspendió en 1 mL de agua MilliQ, el cual se dializó con una membrana de tamaño de corte de 14 kDa para finalmente ser liofilizado.

La pureza de la proteína producida se corroboró por medio de SDS-PAGE y espectrometría de masa MALDI-TOF.

7.2. SDS-PAGE

Se preparó un gel de acrilamida al 4% y 10% acrilamida/bisacrilamida para el gel concentrador y separador respectivamente: se emplearon 1.27 mL de agua MilliQ, 500 µL de Tris 1.5 M pH 6.8, 20 µL de SDS al 10%, 203 µL de acrilamida al 40%, 2 µL de TEMED y 20 µL de persulfato de amonio al 10% para el gel concentrador; se usaron 2.45 mL de agua MilliQ, 1.25 mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 50 µL de SDS al 10%, 1.25 mL de acrilamida al 40%, 3 µL de TEMED y

15 μL de persulfato de amonio al 10% para el gel separador. Se cargaron 20 μg de proteína con buffer de carga (4x Laemmli Sample Buffer de BioRad®). El marcador de peso molecular empleado fue el Precision Plus Protein Kaleidoscope de Bio-Rad®. La electroforesis se corrió a 100 V por 60 minutos con buffer de tanque (0.25 M base Tris, 1.92 M glicina, 35 mM SDS y agua MilliQ c.b.p. 1.0 L, pH 8.3). El gel se tiñó con solución Simply Blue de Invitrogen® siguiendo el protocolo de calentamiento en microondas indicado por el fabricante.

7.3. Espectrometría de masas

Se preparó una muestra de 5 μL de cada proteína, $C_4\text{-}B^{K12}$, $C_4\text{-}S_4\text{-}B^{K12}$, $C_4\text{-}S_{10}\text{-}B^{K12}$ y $C_4\text{-}S_{14}\text{-}B^{K12}$, a una concentración de 1 g/L en buffer de fosfatos 10 mM pH 7.4. El análisis fue realizado en una matriz de ácido sinapínico en un equipo de MALDI-TOF MS marca Bruker® Microflex del laboratorio de servicios analíticos del Instituto de Química.

7.4. Producción de DNA plasmídico

Se inóculo cepa recombinante de *Escherichia coli* con el plásmido redox (secuencia en el Anexo) en 5 mL de medio LB con kanamicina 1X. Se incubó a 37 °C en agitación por 14 horas. Se recuperó el DNA plasmídico empleando el kit MiniPrep de ZYMO® con base en el protocolo indicado por el fabricante. Finalmente, se cuantificó el rendimiento y pureza con la relación A^{260}/A^{280} y A^{260}/A^{230} por medio del NanoDrop 2000 One de Thermo Fisher Scientific®.

7.5. Desalado de DNA de esperma de salmón

Para evitar producir constantemente pDNA, se optó por usar DNA de esperma de salmón. El DNA de esperma de salmón se empleó debido a que se requerían grandes cantidades para los experimentos de intercalación de moléculas fluorescentes.

Se pesó DNA de esperma de salmón (Sigma Aldrich®) y se disolvió en agua MilliQ para preparar una disolución, se agregaron dos volúmenes de etanol al 95% y se centrifugó a 4 °C, 2 minutos, 10 000 RCF. El sobrenadante se descartó y se añadió un volumen de etanol al 70%, se repitió la centrifugación. Nuevamente, el sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en agua MilliQ.

7.6. Ensayo de cambio de movilidad electroforética

Para conocer un poco sobre la interacción entre la proteína $C_4\text{-}S_n\text{-}B^{K12}$ y el pDNA, se realizaron ensayos de cambio de movilidad electroforética. La relación NP (ecuación (0.2)) representa

una proporción entre las cargas positivas de los residuos de aminoácidos de lisina y las cargas negativas de los fosfatos del pDNA.

$$NP = \frac{|Z_{NH_3^+}|}{|Z_{PO_4^-}|} \quad (0.2)$$

En este ensayo se realizó una mezcla de proteína $C_4-S_n-B^{K12}$ y de DNA de 2675 pb a diferentes proporciones NP, se mantuvo fija la concentración de DNA a 100 ng en 10 μ L en buffer HEPES 10 mM y DTT 1 mM por 12 horas de incubación. Las proporciones empleadas fueron 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 2, 3, 5, 8 y 10, estas se mezclaron con Loading Dye 6X de Invitrogen® y se corrió un gel de agarosa al 1% a 100 V por 1 hora.

El gel se tiñó por 20 minutos en Syber Safe de Invitrogen® y se tomó la fotografía correspondiente en un fotodocumentador marca Azure®.

7.7. Ensayos del monitoreo del autoensamblaje

Se preparó una disolución stock de tioflavina T (Sigma Aldrich®) 16 mM en agua MilliQ, la cual se diluyó 100 veces y se almacenó a -20 °C con aluminio. La disolución stock de proteína se preparó del sólido liofilizado a una concentración de 5 g/L en buffer de fosfatos 10 mM pH 7.4. De igual forma se preparó un stock de DTT 6 g/L el cual se renovó después de 30 días de su preparación.

Los ensayos de fluorescencia se realizaron en tubos Eppendorf® de 1.5 mL a partir de la dilución de ThT y del stock de la proteína correspondiente. La concentración final de las mezclas fue de ThT 20 μ M, DTT 1 mM y proteína $C_4-S_n-B^{K12}$ concentración variable con un volumen final de 50 μ L. Las mezclas se mantuvieron por un tiempo de incubación de 24 horas a temperatura ambiente en la oscuridad.

La fluorescencia se midió una vez pasado el tiempo de incubación en un equipo lector de placas Cytation 5 de BioTek®. La longitud de onda de excitación empleada fue 440/10 nm, la emisión se midió de 470/10 a 700 nm con incrementos de 1 nm.

Agregando a lo anterior, se realizaron cambios en la temperatura, esto se llevó a cabo dentro del equipo lector de placas aumentando la temperatura 10 °C e incubando 10 minutos

antes de hacer lectura de la fluorescencia de las muestras. Por último, se realizó la misma operación, esta vez disminuyendo la temperatura 10 °C.

Los análisis estadísticos se realizaron en Prism 8 versión 8.4.3 (© 1992-2020 GraphPad Software)

7.8. Ensayos de intercalación de moléculas fluorescentes en el DNA

Se preparó una disolución stock de doxorubicina 1 mM la cual se diluyó a 500 µM. Se almacenó a -20 °C con aluminio. De igual manera se preparó una disolución stock de STF 1 mM y DMSO al 20% la cual se diluyó a 100 µM con agua MilliQ y se almacenó a -20 °C con aluminio.

Los ensayos de fluorescencia se realizaron en tubos Eppendorf® de 1.5 mL a partir de la dilución de fluoróforo, DOX o STF, DNA de esperma de salmón y la proteína correspondiente. La fluorescencia se midió en el equipo lector de placas a una longitud de onda de excitación de 480/10 nm para la DOX y 450/10 nm para la STF.

En primera instancia, se realizó la mezcla de fluoróforo, DOX 10 µM o STF a 20 µM, y DNA de esperma de salmón a concentración variable y se incubó durante 12 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido este tiempo se midió la fluorescencia y se determinó la proporción a la que la mayor parte del fluoróforo se encuentra intercalado en el DNA, esto es, a un mínimo de fluorescencia, con base en la ecuación (0.3) y en unidades de pares de bases de DNA por mol de fluoróforo.

$$a = \frac{g \text{ pDNA} \times 2675 \text{ pb}}{PM \text{ pDNA} \times \text{Conc. fluoróforo} \times \text{Vol. disol.}} \quad (0.3)$$

Posteriormente se realizaron dos grupos de experimentos, el primero consistió en la mezcla de fluoróforo DOX o STF 10 µM y 20 µM respectivamente, DNA de esperma de salmón, 500 ng y 8 000 ng respectivamente y la proteína correspondiente a concentración variable. En el segundo grupo de experimentos se mezcló fluoróforo y proteína sin DNA, conservando las concentraciones del grupo anterior. La fluorescencia relativa (F.R.) se calculó con base en la ecuación (0.4) para el primer grupo de experimentos y la ecuación (0.5) para el segundo grupo. F_{obs} es la fluorescencia observada mientras que F_{obs1} es la fluorescencia observada sin proteína, es decir la fluorescencia observada en el primer valor de cada grupo

de experimentos a una concentración de proteína igual a cero; $F_{\text{mínima con DNA}}$ es la mínima fluorescencia observada en el primer grupo de experimentos; finalmente $F_{\text{máxima con DNA}}$ es la máxima fluorescencia observada en el primer grupo de experimentos.

$$F.R. = F_{\text{obs}} + (F_{\text{mínima con DNA}} - F_{\text{obs1}}) \quad (0.4)$$

$$F.R. = F_{\text{obs}} + (F_{\text{máxima con DNA}} - F_{\text{obs1}}) \quad (0.5)$$

Los análisis estadísticos se realizaron en Prism 8 versión 8.4.3 (© 1992-2020 GraphPad Software)

7.9. Ensayos de toxicidad en líneas celulares

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo en MTT con células HeLa. Se usó una concentración de 20 μM de STF y DNA de esperma de salmón con base en la proporción de 1 molécula de estefimicina B por cada 18 pb obtenida con base en la ecuación (0.3).

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Producción de la proteína

En el SDS-PAGE de las proteínas (**Figura 20** de la sección 12.1 de los Anexos), se observa un efecto que ya se había observado en las referencias 11 y 12, donde el corrimiento electroforético de las proteínas es menor al esperado. Este comportamiento es debido al bloque de estabilidad coloidal, ya que al tener pocos aminoácidos hidrofóbicos no existe una buena unión con el SDS disminuyendo la movilidad en la electroforesis.

Por otra parte, los espectros de MALDI-TOF de las proteínas $C_4-S_n-B^{K12}$ (**Figura 21** de la sección 12.1 de los Anexos) se encuentran en el rango de las masas teóricas, dando como peso molecular los siguientes valores: C_4-B^{K12} 38 422.635 Da (Teo. 38 407.8 Da), $C_4-S_4-B^{K12}$ 41 227.319 Da (Teo. 40 192.6 Da), $C_4-S_{10}-B^{K12}$ 44 786.760 Da (Teo. 44 749.2 Da), $C_4-S_{14}-B^{K12}$ 47 008.832 Da (Teo. 47 027.5 Da).

8.2. Ensayos de cambio de movilidad electroforética

Los gels de los ensayos de movilidad electroforética (**Figura 11**) muestran que a medida que la proporción de proteína añadida aumenta respecto al DNA plasmídico, el corrimiento electroforético disminuye. Este efecto es consecuencia de la neutralización de las cargas negativas del DNA por la interacción con la proteína. Si tomamos en cuenta el NP más cercano al 50% de unión, en (a) y (b) se alcanza a un valor de 0.5 en proporción, mientras que en (c) se alcanza a un valor entre 1 y 2. Esto es, a medida que el tamaño del bloque S_n crece, se requiere más proteína para neutralizar las cargas del DNA lo cual sugiere un mecanismo en competencia donde a mayor interacción proteína-proteína menor la interacción proteína-DNA.

Por otro lado, se aprecian bandas de menor intensidad, y con menos corrimiento electroforético. Estas bandas corresponden a otras topologías del DNA y que están presentes en menor proporción.

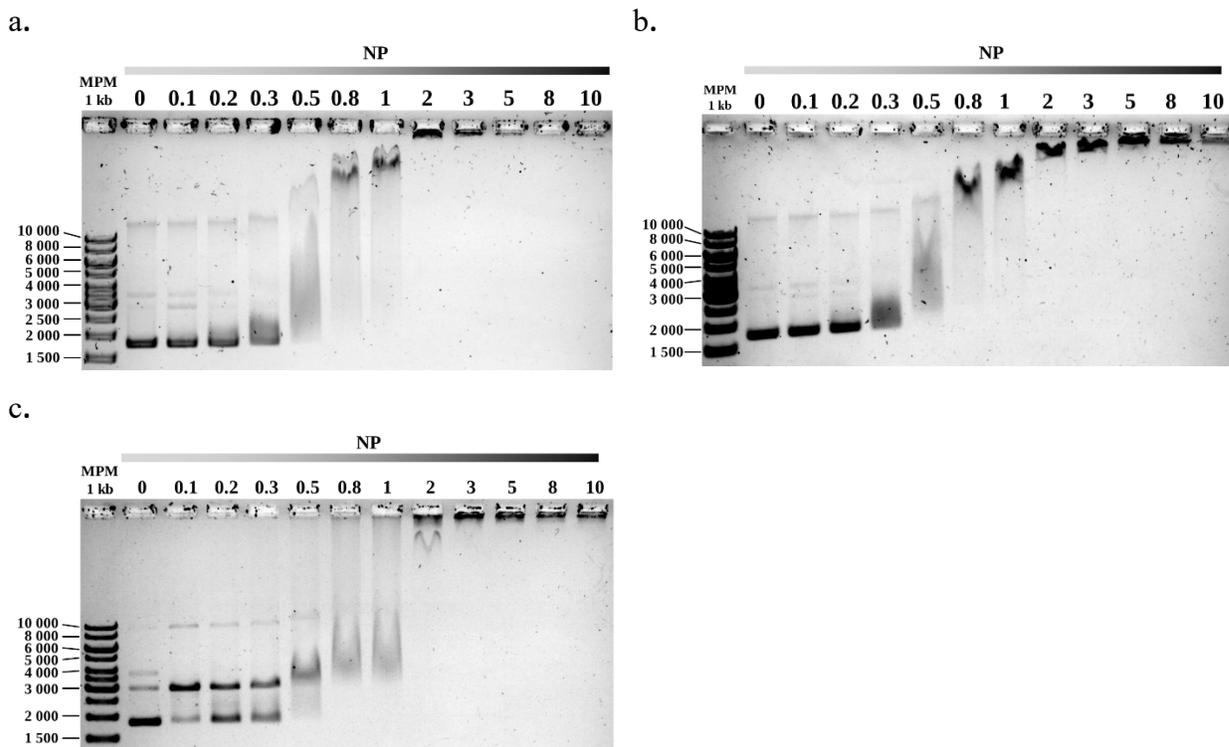


Figura 11. Ensayos de movilidad electroforética del pDNA de 2675 pb en una relación variable del cociente NP con las proteínas, (a) $C_4-S_4-B^{K12}$, (b) $C_4-S_{10}-B^{K12}$ y (c) $C_4-S_{14}-B^{K12}$.

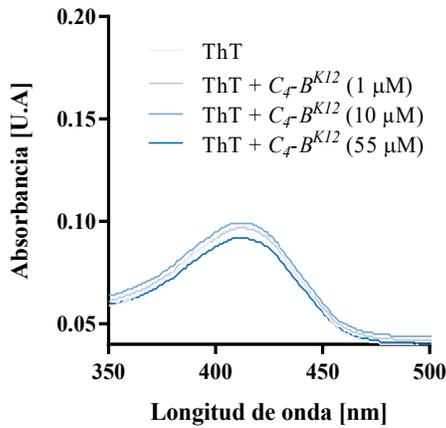
8.3. Interacción entre tioflavina T y proteína

Al comparar los espectros de absorbancia de la tioflavina T con proteína C_4-B^{K12} (**Figura 12. a**) y $C_4-S_{10}-B^{K12}$ (**Figura 12. b**) se observa que existe un aumento en la absorbancia con la proteína $C_4-S_{10}-B^{K12}$, mientras que con la proteína C_4-B^{K12} se mantiene prácticamente constante. Esto implica que existe una interacción entre la tioflavina T y el módulo S_{10} lo cual lleva a un aumento en la señal de absorbancia.

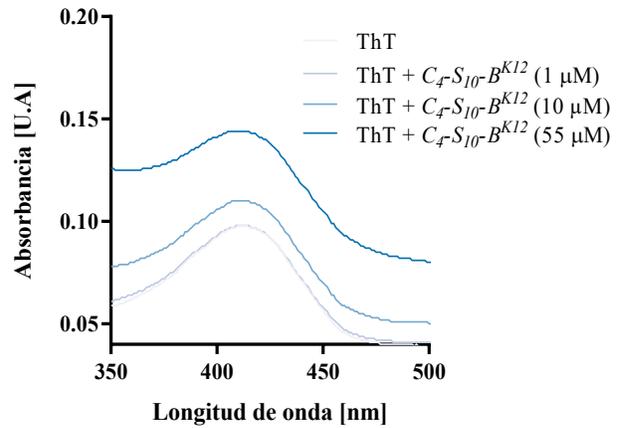
Por otro lado, en los ensayos de fluorescencia es evidente que se presenta un aumento moderado en la intensidad de emisión con la proteína C_4-B^{K12} (**Figura 12. c**). Ahora bien, el aumento en la fluorescencia fue mucho mayor con la proteína $C_4-S_{10}-B^{K12}$ (**Figura 12. d**) lo cual indica que la Tioflavina T tiene mayor afinidad hacia el módulo S_{10} . Cabe mencionar que la fluorescencia asociada a la tioflavina T presentó la menor señal de fluorescencia, como era de esperarse. En la **Figura 12. e** se muestran los máximos de fluorescencia a 485 nm de ambos espectros de fluorescencia. Para mostrar una mejor representación del efecto que produce la presencia del módulo S_{10} en la fluorescencia, se restó a los máximos de fluorescencia de $C_4-S_{10}-B^{K12}$ los de C_4-B^{K12} como se muestra en la **Figura 12. f**, el aumento fue de poco más de cuatro mil

unidades de fluorescencia, lo cual indica que la emisión de fluorescencia es sensible a la presencia del dominio funcional S_{10} .

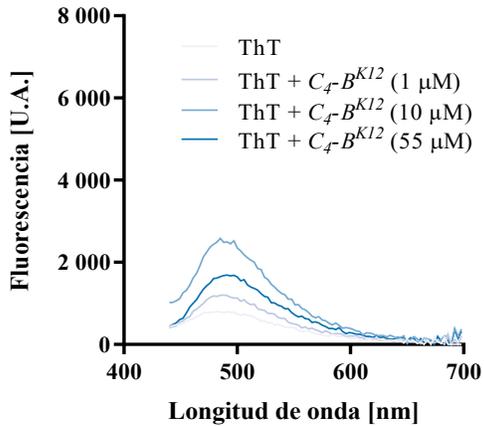
a.



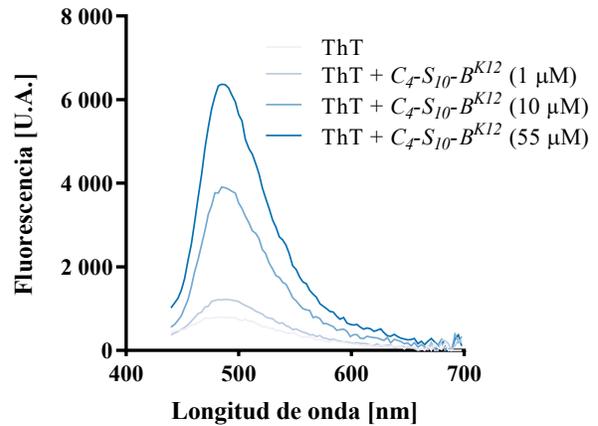
b.



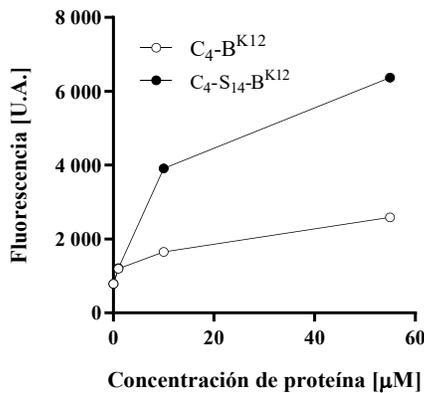
c.



d.



e.



f.

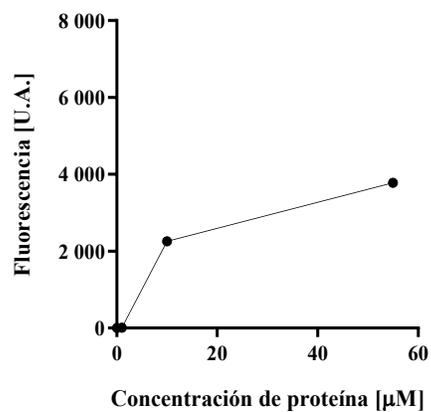


Figura 12. Efecto en la absorbancia de la tioflavina T en función de la concentración de proteína C_4-B^{K12} (a) y $C_4-S_{10}-B^{K12}$ (b). Efecto en la fluorescencia en función de la concentración de proteína C_4-B^{K12} (c) y $C_4-S_{10}-B^{K12}$ (d), la

concentración de tioflavina T es de $20 \mu\text{M}$ en todos los casos. En (e) se muestran los máximos de fluorescencia en función de la concentración de proteína. Finalmente, en (f) se muestra la diferencia entre los máximos de fluorescencia de $C_4\text{-S}_{10}\text{-B}^{K12}$ y los máximos de fluorescencia de $C_4\text{-B}^{K12}$.

En la **Figura 13** se aprecia el efecto de la concentración de proteína en la intensidad de fluorescencia, conforme la concentración de $C_4\text{-S}_4\text{-B}^{K12}$ es mayor y a cuatro temperaturas diferentes, desde 25 a 55°C . La fluorescencia aumenta como consecuencia de la interacción entre tioflavina T y proteína. Los resultados muestran que la fluorescencia disminuye cuando la temperatura de trabajo es mayor. Se puede observar un retardo a concentraciones bajas de proteína $C_4\text{-S}_4\text{-B}^{K12}$, después se da un aumento en la emisión, hasta llegar a $20 \mu\text{M}$ donde la pendiente empieza a disminuir.

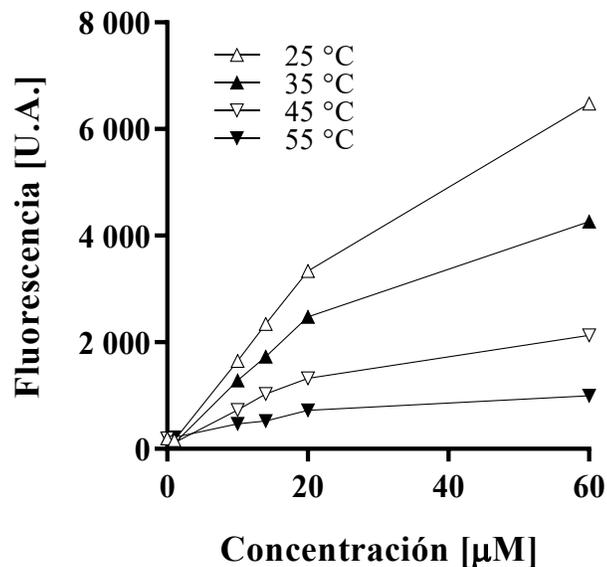


Figura 13. Efecto de la concentración de $C_4\text{-S}_4\text{-B}^{K12}$ en la emisión de fluorescencia en función de la temperatura entre 25 y 55°C .

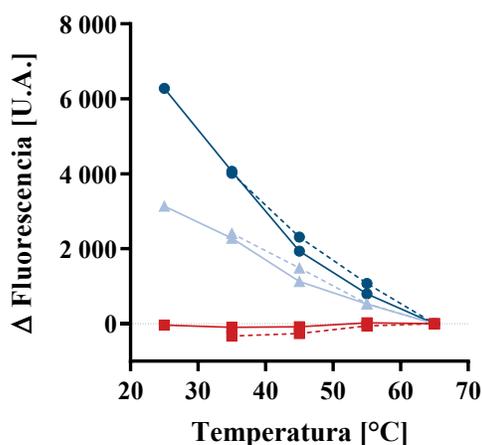
Para representar el efecto de la temperatura, se graficó la emisión de fluorescencia en función de la temperatura con $C_4\text{-S}_4\text{-B}^{K12}$ (**Figura 14.a**) y $C_4\text{-S}_{14}\text{-B}^{K12}$ (**Figura 14.b**). Para facilitar el análisis de los datos, la intensidad fluorescencia emitida a 65°C se restó a todos los valores de fluorescencia correspondientes a cada concentración de proteína con el fin de que todas las líneas partieran del origen en el eje de las ordenadas en 65°C . Las líneas sólidas muestran el calentamiento de las muestras, mientras que las líneas punteadas el enfriamiento. Se puede ver que el aumento en la temperatura generó una disminución en la fluorescencia para ambas proteínas. Este efecto es consecuencia de la pérdida de interacciones entre proteína-proteína lo que produce

la liberación de la tioflavina T. Como ya se sabe, la tioflavina T presenta un rendimiento de fluorescencia bajo cuando se encuentra libre en disolución. Otro aspecto importante a considerar es que la emisión de fluorescencia de la tioflavina T unida a $C_4-S_4-B^{K12}$ es aproximadamente del mismo orden que para $C_4-S_{14}-B^{K12}$ pero a una concentración del doble de proteína, lo cual muestra que la tioflavina T presenta mejor rendimiento de fluorescencia cuando el módulo de autoensamblaje es mayor.

En el caso particular de la proteína $C_4-S_4-B^{K12}$ no se observa histéresis en el comportamiento de las curvas, lo que nos lleva a pensar que no existe un mecanismo en competencia asociado a la interacción entre las proteínas. Por otro lado, con $C_4-S_{14}-B^{K12}$ las curvas de enfriamiento y calentamiento no cambian de fase a la misma temperatura, presentando histéresis, es decir, que los procesos de ensamblaje y desensamblaje presentan pendientes diferentes.

El análisis estadístico de comparación de pendientes mostró que no existen diferencias significativas en la pendiente entre la curva de calentamiento y de enfriamiento en el caso de la proteína $C_4-S_4-B^{K12}$ respectivamente para las tres concentraciones presentadas con un nivel de confianza del 95%, a diferencia de la proteína $C_4-S_{14}-B^{K12}$ donde las diferencias si fueron significativas.

a.



b.

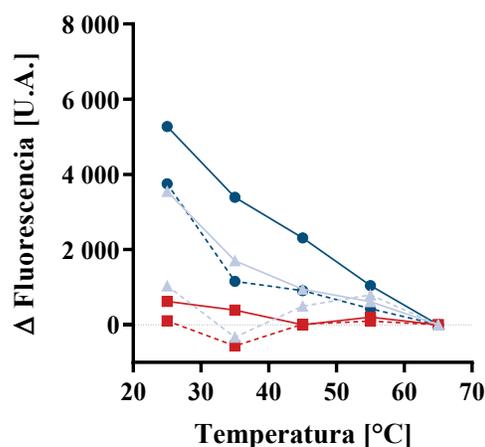


Figura 14. Efecto de la temperatura en la emisión de fluorescencia de tioflavina T ($20 \mu\text{M}$) al calentar (línea sólida) y enfriar (línea punteada) para la proteína $C_4-S_4-B^{K12}$ (a) y $C_4-S_{14}-B^{K12}$ (b) a concentración de $1 \mu\text{M}$ (\blacksquare), $20 \mu\text{M}$ (\blacktriangle) y $60 \mu\text{M}$ (\bullet).

8.4. Intercalación de moléculas fluorescentes

Como se mencionó en los antecedentes, ocurre una disminución de la fluorescencia de la doxorubicina como consecuencia de su interacción con el DNA, por lo que a medida que la cantidad de DNA aumenta la emisión disminuye. En la **Figura 15** se aprecia este efecto, en el cual a una concentración nula de DNA se presenta un máximo de fluorescencia, mientras que a una concentración de 1.8 nM (500 ng) se alcanza un mínimo de fluorescencia consecuencia de la interacción entre las moléculas de doxorubicina con el pDNA.

Con base en el tamaño y en la concentración de pDNA donde se presenta el mínimo de fluorescencia se determinó la cantidad de pares de bases por molécula de doxorubicina con lo cual se estimó la cantidad de veces que se intercala la doxorubicina en el DNA. Se estimó que en promedio una molécula de doxorubicina se intercala en el pDNA cada 1.6 pb.

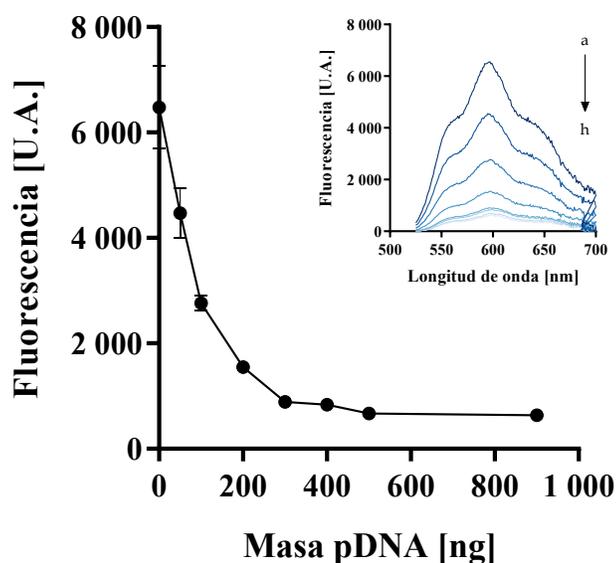


Figura 15. Efecto de la concentración de pDNA en la emisión de fluorescencia de la doxorubicina. En la gráfica yuxtapuesta se muestra el perfil de fluorescencia.

En el caso de la estefimicina B (**Figura 16**) se presentó la misma situación, a medida que la cantidad de DNA fue aumentando la fluorescencia disminuyó hasta alcanzar un mínimo, esto a 8 μ g de DNA de esperma de salmón.

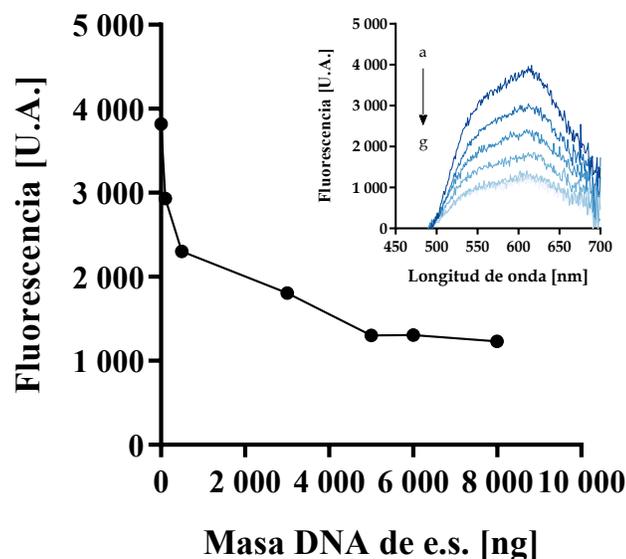


Figura 16. Efecto de la cantidad de DNA de e.s. en la emisión de fluorescencia de la STF. En la gráfica yuxtapuesta se muestra el perfil de fluorescencia.

Una vez determinada la cantidad de DNA requerida para alcanzar un mínimo de fluorescencia, se realizaron los experimentos esta vez adicionando proteína después de formar los complejos entre fluoróforo y el DNA. En la **Figura 17** se muestra el efecto en la fluorescencia al mezclar DNA, doxorrubicina y proteína $C_4-S_4-B^{K12}$ o $C_4-S_{14}-B^{K12}$. Se aprecia, que no hay cambios significativos en la intensidad de emisión de fluorescencia lo que da a entender que las moléculas de doxorrubicina permanecieron asociadas al DNA molde después de que las proteínas lo recubrieran. Para observar de manera independiente el efecto en la fluorescencia que puede generar la interacción entre la doxorrubicina y la proteína, se distingue en este control que hay un aumento en la emisión de fluorescencia, lo cual lleva a pensar que en caso de que la doxorrubicina se disocie del DNA molde e interactúe con la proteína, se presentaría un aumento en la señal de fluorescencia, esto de forma más significativa para el caso de la proteína $C_4-S_4-B^{K12}$.

En la **Figura 18** de igual manera, se muestra el efecto en la fluorescencia esta vez con la estefimicina B como fluoróforo, DNA y proteína $C_4-S_{14}-B^{K12}$. En este caso se obtuvieron resultados similares, donde la estefimicina B en presencia de DNA y proteína parece no disociarse del DNA molde ya que no hay un aumento en la fluorescencia. De igual forma que con doxorrubicina, cuando se mezcla estefimicina B y proteína se presenta un aumento en la intensidad de fluorescencia lo cual indica una interacción entre ambas.

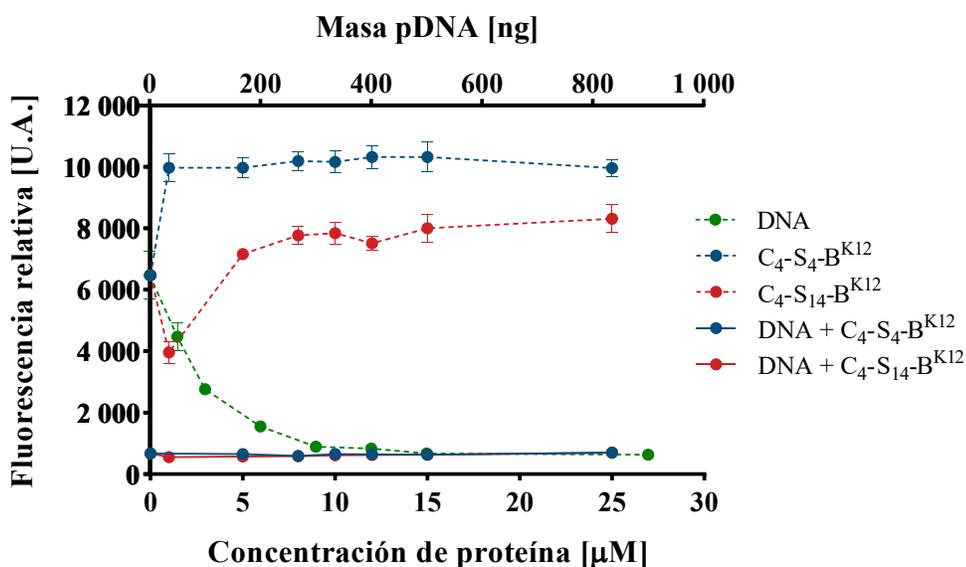


Figura 17. Fluorescencia relativa emitida por la doxorubicina en presencia de proteína (línea punteada), y en presencia de proteína y DNA (línea continua). Los valores fueron transformados respecto a la fluorescencia de la doxorubicina en presencia de DNA (línea punteada verde). El eje de las abscisas secundario representa a la curva verde.

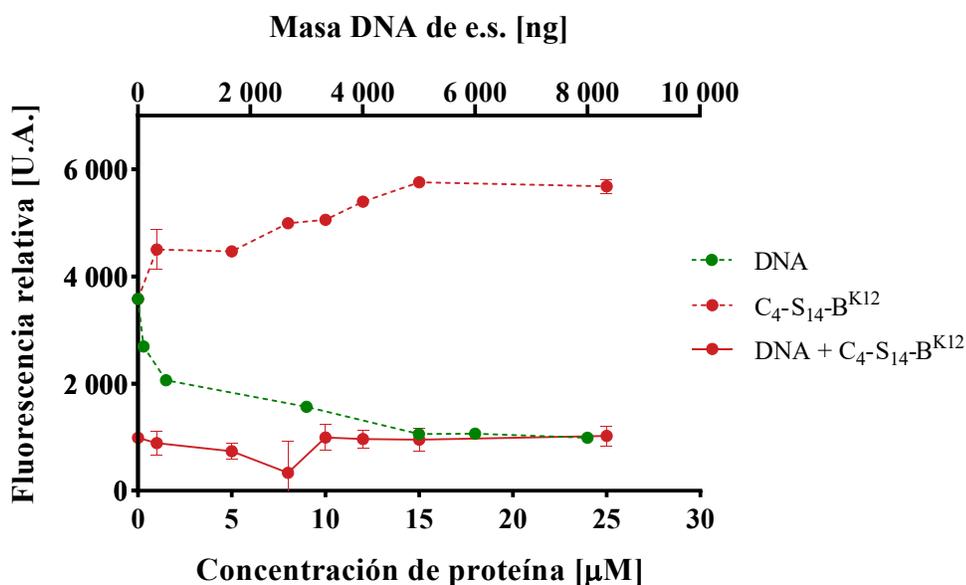


Figura 18. Fluorescencia relativa emitida por la estefimicina B en presencia de proteína $C_4-S_{14}-B^{K12}$ (línea punteada) y en presencia de proteína $C_4-S_{14}-B^{K12}$ y DNA (línea continua). Los valores fueron transformados respecto a la fluorescencia de la estefimicina B en presencia de DNA (línea punteada verde). El eje de las abscisas secundario representa a la curva verde.

8.5. Ensayos de toxicidad

Los resultados de citotoxicidad (**Figura 19**) mostraron un IC_{50} de aproximadamente $7 \mu\text{g/mL}$ para la estefimicina B y de $27 \mu\text{g/mL}$ para el complejo DNA-estefimicina B. La estefimicina B presentó mayor citotoxicidad libre en disolución que formando el complejo con DNA. Este resultado se debe a la afinidad de la estefimicina B por el DNA, lo que produce que las moléculas de estefimicina B no se disocian y por lo tanto que el efecto sea menor. Algunas de las implicaciones que tienen estos resultados son, en primera instancia, que la estefimicina B puede inhibir la proliferación de células HeLa, lo cual abre todo un campo de investigación para la realización de pruebas en células mamíferas. Por otro lado, es evidente la necesidad de la búsqueda de algún mecanismo que produzca la liberación de las moléculas de estefimicina B del complejo formado con DNA, con el objetivo de que su efecto citotóxico sea más significativo. Por otro lado, se puede observar que cantidades elevadas de DNA de esperma de salmón también generan un efecto citotóxico en las células, aunque de forma menos significativa.

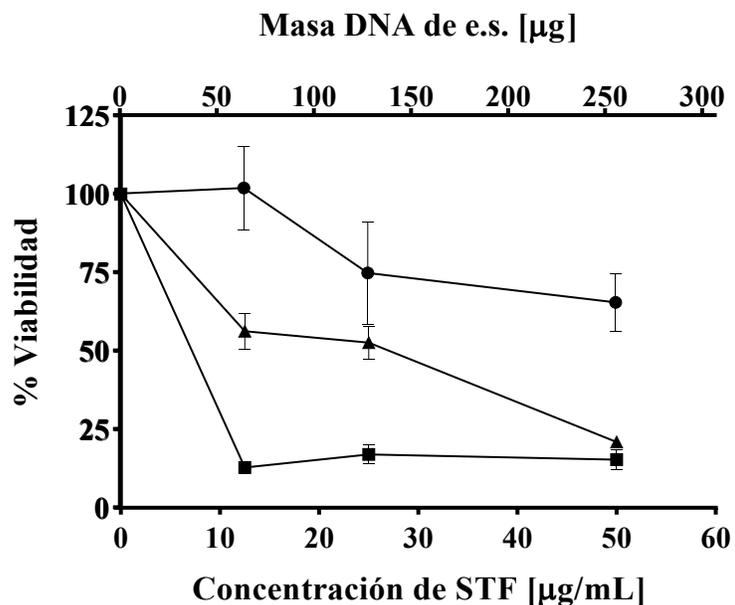


Figura 19. Viabilidad de células HeLa en cultivo en presencia de estefimicina B (-■-), en presencia de estefimicina B formando complejo con DNA de esperma de salmón (-▲-), y en presencia de DNA de esperma de salmón sin adición de estefimicina B (-●-). Ya que en todo punto el DNA y la estefimicina B se encuentran en la misma proporción, el eje secundario de las abscisas se puede usar para el análisis de la gráfica para los casos donde hay DNA presente en el experimento. La viabilidad se ensayó con MTT como se describe en la metodología.

9 CONCLUSIONES

En este proyecto se estudiaron nuevas estrategias para el estudio de la interacción de las proteínas tipo virus $C_4-S_n-B^{K12}$ por medio de moléculas fluorescentes.

La tioflavina T presentó una afinidad preferente hacia el módulo de interacción proteína-proteína S_{10} y S_{14} , donde se hizo notar el aumento en la emisión de fluorescencia. De igual forma, el monitoreo de la fluorescencia permitió evaluar el efecto de la concentración y la temperatura en el autoensamblaje de las proteínas $C_4-S_4-B^{K12}$ y $C_4-S_{14}-B^{K12}$. Además, esto marca una pauta para el empleo de tioflavina T para el estudio de proteínas ricas en estructuras tipo β .

Se demostró que las nanopartículas formadas con DNA y proteína son capaces de retener a la doxorrubicina o la estefimicina B intercalada en la cadena molde de DNA, y cuyo monitoreo fue posible gracias a la fluorescencia que presentan estas moléculas.

Los estudios preliminares del uso biológico de la estefimicina B mediante los ensayos de citotoxicidad mostraron que esta molécula tiene un mayor efecto citotóxico en células cancerígenas cuando se encuentra libre que formando el complejo DNA-estefimicina B.

10 PERSPECTIVAS

En el estudio del autoensamblaje de las proteínas tipo virus, con el empleo de la tioflavina T se pueden realizar nuevos estudios con otro tipo de técnicas como espectroscopía de correlación de fluorescencia, lo cual permitiría obtener más información sobre el mecanismo que acontece durante la formación de las nanopartículas, ya que al ser una técnica de molécula única es posible distinguir la agregación de las moléculas.

En cuanto a las nanopartículas con moléculas intercaladas en el DNA, se abre una serie de posibilidad de estudios para evaluar a las nanopartículas para el transporte no solo de doxorubicina o estefimicina B, si no muchas otras moléculas capaces de intercalarse en el DNA. Uno de los puntos en que se debe ahondar es en la búsqueda de algún mecanismo que permita que éstas moléculas intercaladas se disocien cuando llegue el momento. Serán necesarias modificaciones en la proteína, agregando o modificando los dominios funcionales para conseguir este fin. Además, este sistema puede ser extrapolado al uso de estructuras ramificadas para aumentar la disponibilidad de las moléculas intercaladas.

Los estudios preliminares de uso biológico de la estefimicina B, deberán ser complementados con pruebas en células formando las nanopartículas con proteína $C_4-S_n-B^{K12}$ con el fin de mostrar el efecto en la proliferación de las células. De igual manera, se podrán realizar pruebas de citotoxicidad en otras líneas celulares, especies bacterianas de interés y pruebas *in vivo* que lleven a un mejor entendimiento de la capacidad del sistema para acarrear y entregar fármacos.

11 REFERENCIAS

1. Hernandez-Garcia, A., Kraft, D. J., Janssen, A. F. J., Bomans, P. H. H., Somemerdiijk, N. A. J. M., Thies-Wee, D. M. E., Favretto, M. E., de Wolf, F. A., Werten, M. W. T., van der Schoot, P., Martien Cohen, S. y de Vries, R. Design and self-assembly of simple coat proteins for artificial viruses. *Nature Nanotechnology*. 9, 698–702 (2014).
2. Sanchez, F. y Sobolev, K. Nanotechnology in concrete – A review. *Constr. Build. Mater.* 24, 2060–2071 (2010).
3. Rojas Aguirre, Y, Aguado Castrejón, K. y González Méndez, I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educación Química* 27, 286–291 (2016).
4. Kumar Anal, A. *Bionanotechnology Principles and Applications*. (CRC Press, 2018).
5. Goodsell, D. S. *Bionanotechnology. Lessons from Nature*. (John Wiley & Sons, 2004).
6. Alcalá Alcalá, S. y Quintanar Guerrero, D. La terapia a nanoescala: ensamblaje de estructuras liberadoras de fármacos. 7, 17 (2014).
7. Smith, D. M., Simon, J. K. y Baker Jr, J. R. Applications of nanotechnology for immunology. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 592–605 (2013).
8. Din, F., Aman, W., Ullah, I., Qureshi, O. S., Mustapha, O., Shafique, S. y Zeb, A. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. *Int. J. Nanomedicine* Volume 12, 7291–7309 (2017).
9. Noad, R. y Roy, P. Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* 11, 438–444 (2003).
10. Zeng, Q., Wen, H., Wen, Q., Chen, X., Wang, Y., Xuan, W., Liang, J., y Wan, S. Cucumber mosaic virus as drug delivery vehicle for doxorubicin. *Biomaterials* 34, 4632–4642 (2013).
11. Hernandez-Garcia, A. Protein-based Polymers that Bind to DNA. Design of Virus-like Particles and Supramolecular Nanostructures. (Wageningen University, 2014).
12. Werten, M. W. T., Wisselink, W. H., Jansen-van den Bosch, T. J., de Bruin, E. C. y de Wolf, F. A. Secreted production of a custom-designed, highly hydrophilic gelatin in *Pichia pastoris*. *Protein Eng. Des. Sel.* 14, 447–454 (2001).
13. Hernandez-Garcia, A., Werten, M. W. T., Stuart, M. C., de Wolf, F. A. y de Vries, R. Coating of Single DNA Molecules by Genetically Engineered Protein Diblock Copolymers. *Small* 8, 3491–3501 (2012).

14. Zhao, B., Cohen Stuart, M. A. y Hall, C. K. Navigating in foldonia: Using accelerated molecular dynamics to explore stability, unfolding and self-healing of the β -solenoid structure formed by a silk-like polypeptide. *PLOS Comput. Biol.* 13, e1005446 (2017).
15. De Greef, T. F. A., Smulders, M. M. J., Wolffs, M., Schenning, A. P. H. J., Sijbesman, R. P. y Meijer, E. W. Supramolecular Polymerization. *Chem. Rev.* 109, 5687–5754 (2009).
16. Behlke, M. A., Huang, L., Bogh, L., Rose, S. y Devor, E. J. Fluorescence and fluorescence applications. *Integr. DNA Technol.* 1–13 (2005).
17. Skoog, D. A., Holler, F. J. y Crouch, S. R. *Principios de análisis instrumental.* (Cengage Learning, 2008).
18. Silberman Stock, R. P., Martínez Estrada, M. T. y Moctezuma González, C. Métodos físico-químicos en biotecnología. *Espectrofluorimetría.* IBt UNAM (2006).
19. Groenning, M. Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils—current status. *J. Chem. Biol.* 3, 1–18 (2010).
20. Sabate, R., Rodríguez-Santiago, L., Sodupe, M., Saupe, S. J. y Ventura, S. Thioflavin-T excimer formation upon interaction with amyloid fibers. *Chem. Commun.* 49, 5745 (2013).
21. Biancalana, M. y Koide, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1804, 1405–1412 (2010).
22. Agudelo, D., Bourassa, P., Bérubé, G. y Tajmir-Riahi, H.-A. Intercalation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by DNA duplex: Structural features and biological implications. *Int. J. Biol. Macromol.* 66, 144–150 (2014).
23. Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J. y Henikoff, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1845, 84–89 (2014).
24. Kang, H. C., Cho, H. y Bae, Y. H. DNA Polyplexes as Combinatory Drug Carriers of Doxorubicin and Cisplatin: An in Vitro Study. *Mol. Pharm.* 12, 2845–2857 (2015).
25. Karukstis, K. K., Thompson, E. H. Z., Whiles, J. A. y Rosenfeld, R. J. Deciphering the fluorescence signature of daunomycin and doxorubicin. *Biophys. Chem.* 73, 249–263 (1998).
26. Trenado-Uribe, M., Sylva-Miranda, M., Rivero-Cruz, J. F., Rodríguez-Peña, K., Espitia-Pinzón, C- L., Rodríguez-Sanoja, R. y Sánchez, S. Antimycobacterial activity of an anthracycline produced by an endophyte isolated from *Amphipterygium adstringens*. *Mol. Biol. Rep.* 45, 2563–2570 (2018).
27. Dall'Acqua, F., Vedaldi, D. y Gennaro, A. Studies on the interaction between Steffimycins and DNA. *Chem. Biol. Interactions*, 25, 59-60 (1979).

12 ANEXOS

12.1. Producción de proteínas

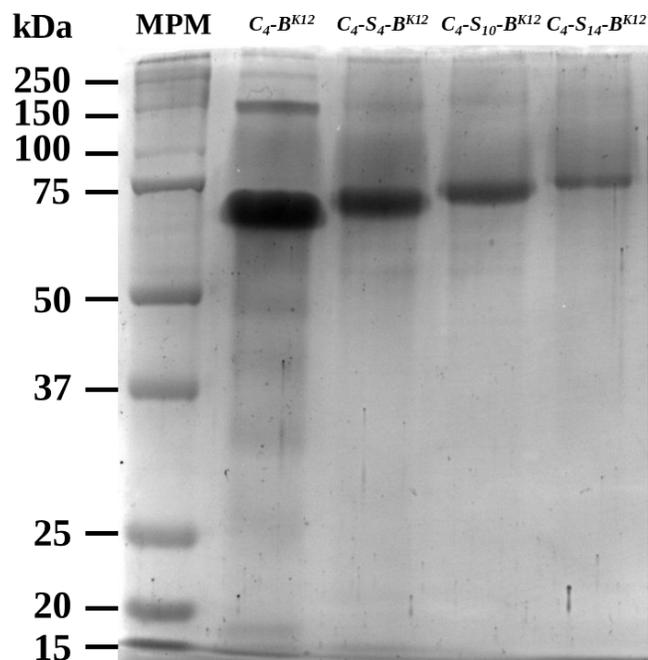
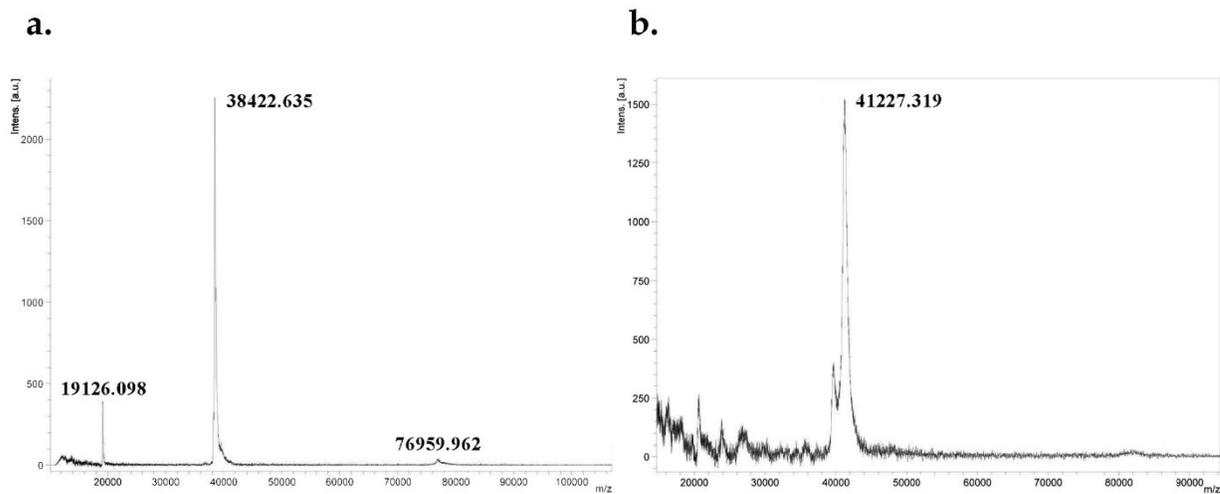


Figura 20. SDS PAGE de las proteínas C_4-B^{K12} , $C_4-S_4-B^{K12}$, $C_4-S_{10}-B^{K12}$ y $C_4-S_{14}-B^{K12}$ producidas en *Komagataella phaffi*.



C₄-S₁₄-B^{K12}

MetRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLFPFSNSTNNGLLFINTTIIASIAAKEEGVSLE
 KRAEAGCGLGAGAP (GEPGNPGSPGNQGPNGKSPGNPGQPNGEQPGQPGQNGQPGEPGNSNGPQGSQGNPGKNGQPGSPGSQ
 GSPGNQGSFGQPGNPGQPGEQGKPGNQGPA) ₄ GAGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAG
 AGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQGAGAGAGQAKKKKKKKKKKKKGA

12.3. Plásmido p-redox

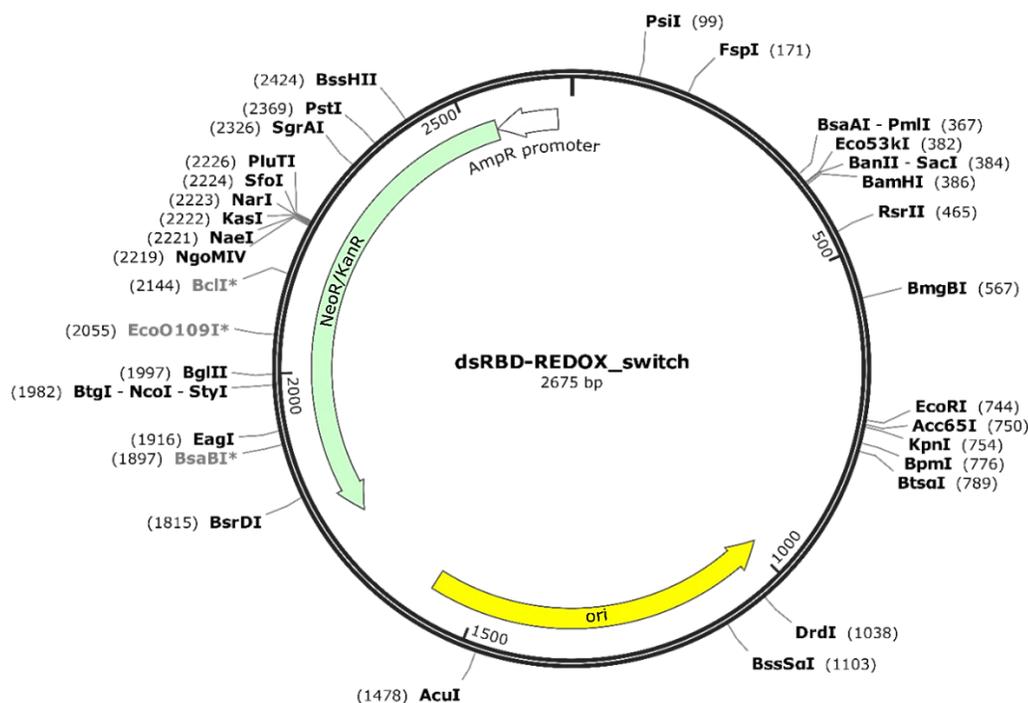


Figura 22. Mapa del plásmido p-redox de 2675 pb.

Secuencia de nucleótidos del plásmido p-redox:

```
5' ctaaattgtaagcggttaatatTTTTgttaaaattcgcggttaaattTTTTgttaaatcagctcatt
tTTtaaccaataggccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagataggggt
tgagtggccgctacagggcgctcccattcgccattcaggctgcgcaactggtgggaagggcgttt
cggtgcgggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagt
tgggtaacgccagggTTTTccagtcacgacgTTgtaaaacgacggccagtgagcgcgacgtaat
acgactcactatagggcgaattgaaggaaggccgtcaaggccacgtgtcttTgtccagagctcggga
tccggttggtagcctgcaagaactggcagttcagaaaggtTggcgtctgccggaatataaccgTTg
cacaagaaagcggTccgcctcataaacgtgaatttaccattacctgtcgtgTtgaaggtggtagc
ggtggTggtTgtggTggtgaaattcgtgcactgaaatatgaaattgcacgtctgaaacaggcagc
acaggcaaaaatccgtgcccctggaacagaaaattgcagcactggaaggtggctgtggcggtggtt
```

cagggtggcacctttggtgaaaccggtagcggcaccagcaaacagggtgcaaacgtggtgcagca
gaaaaactgctgaccaaattcaaacctaagaattcgggtacctggagcacaagactggcctcatg
ggccttcctttcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaacatggtc
atagctgtttccttgcgatttgggcgctctccgcttccctcgtcactgactcgtcgcgctcggtc
gttcgggtaaaagcctgggggtgcctaataagcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaag
gccgcgctgctggcggtttttccataggtccgccccctgacgagcatcacaanaaatcgacgctc
aagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcggtttccccctggaagctccc
tcgtgcgctctcctgttccgacctgcccgttacccggataacctgtccgcctttctcccttcggga
agcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaa
gctgggctgtgtgcacgaacccccgcttcagcccagccgctgcgcccttatccggtaactatcgtc
ttgagccaaccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagc
agagcgaggtatgtaggcgggtgctacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactag
aagaacagtatattgggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagct
cttgatccggcaaacaaaccacgctggtagcgggtggtttttttggttgcaagcagcagattacg
cgcaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtgga
cgaaaactcacgtaagggtattttgggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttt
taaatataaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttat
tagaaaaattcatccagcagacgataaaacgcaatacgtcggctatccgggtgccgcaatgccata
cagcaccagaaaacgatccgcccattcgcgcgccagttcttccgcaatatcacgggtggccagcg
caatatacctgataacgatccgccacgcccagacggccgcaataaagccgctaaaaacggcca
ttttccaccataatggttcggcaggcacgcatcaccatgggtcaccaccagatcttcgccatccgg
catgctcgttttcagacgcgcaaacagctctgcccgggtgccaggccctgatgttcttcatccagat
catcctgatccaccaggcccgcttccatacgggtacgcgcacggttcaatacagatgtttcgcctga
tgatcaaacggacagggtcggcgggtccaggggtatgcagacgacgcatggcatccgccataatgct
cactttttctgcccggcgccagatgggttagacagcagatcctgacccggcacttcgccacgacgca
gccaatcacggcccgccttcgggtcaccacatccagcaccgcccgcacacggaacacgggtgggtggc
agccagctcagacgcgcgcttcatcctgcagctcgttcagcgcaccgctcagatcgggttttcac
aaacagcaccggacgacctgcgcgctcagacgaaacacccgcccagatcagagcagccaatggctc
gctgcgccaatcatagccaaacagacggttccaccacgctgcccgggtaccgcatgcaggcca
tcctgttcaatcatactcttctttttcaatattattgaagcatttatcaggggttattgtctcat
gagcggatacatatttgatgtatttagaaaaataaacaataggggttccgcgcacatttcccc
gaaaagtgccac 3'

12.4. Medios de cultivo para producción de proteína C_4-B^{K12} , $C_4-S_4-B^{K12}$, $C_4-S_{10}-B^{K12}$ y $C_4-S_{14}-B^{K12}$ en *Komagataella phaffi* (antes conocida como *Pichia pastoris*)

Medio mínimo de glicerol (200 mL)

Glicerol (10%)	20 mL
YNB (13.4%)	20 mL
Biotina (0.02%)	400 µL
Agua	c.b.p. 200 mL

Medio mínimo de metanol (600 mL)

Glicerol (10%)	6 mL
YNB (13.4%)	60 mL
Biotina (0.02%)	1.2 mL
Buffer fosfatos 100 mM, pH 7.4	60 mL
Metanol	6 mL c/12 horas
Agua	c.b.p. 600 mL