

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



---

**Maestría en Ciencias  
en Nanociencias**

---

**Nanobiorreactores con actividad  $\beta$ -glucocerebrosidasa para el  
tratamiento de la enfermedad de Gaucher**

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

Presenta:

**Cindy Nayely Olivares Medina**

Ensenada, Baja California, México  
2020

Tesis defendida por

**Cindy Nayely Olivares Medina**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Kanchan Chauhan**  
Codirectora de tesis

---

**Dr. Rafael Vázquez Duhalt**  
Codirector de tesis

Miembros del comité

**Dra. Ana Bertha Castro Ceseña**

**Dr. Rubén Darío Cadena Nava**



---

**Dr. Sergio Fuentes Moyado**  
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Cindy Nayely Olivares Medina © 2020*

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

Resumen de la tesis que presenta **Cindy Nayely Olivares Medina** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en nanociencias.

### **Nanobiorreactores con actividad $\beta$ -glucocerebrosidasa para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher**

Resumen aprobado por:

---

**Dra. Kanchan Chauhan**  
Codirectora de tesis

---

**Dr. Rafael Vázquez Duhalt**  
Codirector de tesis

La enfermedad de Gaucher es un trastorno metabólico y el más común entre las enfermedades de almacenamiento lisosomal, es causado por la deficiencia en la actividad de la enzima glucocerebrosidasa (Gcase). La ausencia de la actividad enzimática de la glucocerebrosidasa origina la acumulación del sustrato glucocerebrósido en los macrófagos. Esta acumulación ocasiona hepatomegalia, esplenomegalia, anemia, trombocitopenia entre otras complicaciones. Los pacientes con esta enfermedad se someten a tratamientos que consisten en la administración vía intravenosa de la glucocerebrosidasa exógena diseñada para ser reconocida por los receptores de manosa en los macrófagos. Sin embargo, a pesar del éxito de la terapia de reemplazo enzimático (ERT), la enzima Gcase carece de estabilidad en sangre y a esto se le suma el alto costo de las infusiones necesarias de la enzima al organismo por lo que se ve limitado el tratamiento. Para superar estas limitaciones, en este proyecto se encapsuló la enzima glucocerebrosidasa en nanopartículas tipo virus (virus-like particles, VLPs) y se funcionalizó su superficie con grupos de manosa para ser dirigidos a los macrófagos. Bajo un análisis de la actividad enzimática, las constantes de Michaelis-Menten para la enzima Gcase libre ( $K_M = 2.20$  mM) y la enzima encapsulada en las VLPs ( $K_M = 2.23$  mM) fueron similares. La enzima en las VLPs mostró el 78.9% de la actividad catalítica en comparación con la enzima Gcase libre. Es importante destacar que la estabilidad de la enzima Gcase en condiciones fisiológicas (pH 7.4, 37°C) se mejoró en  $\approx 15$  veces después de la encapsulación, lo que es beneficioso para obtener una vida media de circulación sanguínea más alta de la enzima Gcase, lo que puede reducir el costo de la terapia al disminuir el número de inyecciones intravenosas. Finalmente, los nanorreactores con actividad enzimática  $\beta$ -glucocerebrosidasa se sintetizaron y caracterizaron con éxito. El análisis preliminar sugiere el potencial de estos nanorreactores en la ERT de la enfermedad de Gaucher.

**Palabras clave:** Enfermedad de Gaucher, partículas tipo virus, nanopartículas, glucocerebrosidasa, nanorreactores.

Abstract of the thesis presented by **Cindy Nayely Olivares Medina** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

### **Nanobioreactors with activity B-glucocerebrosidase for treatment Gaucher disease**

Abstract approved by:

---

**Dra. Kanchan Chauhan**  
Codirectora de tesis

---

**Dr. Rafael Vázquez Duhalt**  
Codirector de tesis

Gaucher disease is a genetic disorder and the most common lysosomal disease caused by the deficiency of enzyme glucocerebrosidase. This results in the accumulation of glucosylceramide in lysosomes of macrophages cell. It leads to hepatomegaly, splenomegaly, anemia, thrombocytopenia, among other complications. Although enzyme replacement therapy (ERT) is successfully applied using mannose conjugated glucocerebrosidase, the lower stability of the enzyme in blood demands periodically intravenous administration that adds to the high cost of the treatment. Moreover, immunogenicity is also a concern. In this work, the enzyme glucocerebrosidase was encapsulated inside virus-like nanoparticles (VLPs), and their surface was functionalized with mannose groups to be targeted to macrophages. The VLPs of brome mosaic virus (BMV) were used for encapsulation of enzymes. Under an analysis of the enzymatic activity, the Michaelis-Menten constants for the free Gcase enzyme ( $K_M = 2.20$  mM) and the enzyme encapsulated in the VLPs ( $K_M = 2.23$  mM) were similar. The enzyme in the VLPs showed 78.9% of the catalytic activity compared to the free Gcase enzyme. Importantly, the stability of enzymes under physiological conditions (pH 7.4, 37 °C) was enhanced by  $\approx 15$ -fold after encapsulation that is beneficial for obtaining higher blood circulation half-life, which may reduce the cost of therapy by reducing the requirement of multiple intravenous injections. Finally, the nanoreactors with enzymatic activity  $\beta$ -glucocerebrosidase were successfully synthesized and characterized. The preliminary analysis suggests the potential of these nanoreactors in ERT of Gaucher's disease.

**Keywords:** Gaucher disease, virus-like particles, nanoparticles, glucocerebrosidase, nanoreactors.

## Dedicatoria

*A mis padres y hermana por el apoyo incondicional que siempre me han brindado, gran parte de mis logros es por ustedes y por la formación que me han dado para ser la persona que ahora soy, los amo.*

*“En cuestiones de cultura y de saber, solo se pierde lo que se guarda; solo se gana lo que se da”*

*Antonio Manchado.*

## Agradecimientos

- Al **CICESE**, por darme la oportunidad de realizar el posgrado.
- Al **CONACYT**, por la beca otorgada para la realización de mi maestría.
- A todos mis **profesores** de **CICESE** y **CNyN** por el conocimiento transmitido.
- A la **Dra. Kanchan Chauhan Sengar**, mi tutora, por la confianza, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por siempre tener la disposición de enseñanza, explicarme las cosas hasta que me quedaran claras, por la paciencia para entenderme cuando no me expresaba bien al hablar inglés y haberme guiado en la realización de este proyecto.
- Al **Dr. Rafael Vázquez Duhalt**, por su tiempo, aporte, asesorías para el desarrollo profesional de este trabajo y el enriquecimiento a mi conocimiento.
- A la **Dra. Ana Bertha Castro Ceseña**, por el tiempo brindado, su aporte a esta investigación y los consejos dados para mejorar el formato de este documento.
- Al **Dr. Rubén Darío Cadena Nava**, por la ayuda y el tiempo brindados en la realización de este proyecto y todo el aporte que enriqueció esta investigación.
- A la **M. A Itandehui Betanzo Gutiérrez** y a la **Dra. Katrin Quester**, por el apoyo técnico en el laboratorio.
- A **M.C. Juan Manuel Martínez Andrade**, por el apoyo en la obtención de las micrografías electrónicas de transmisión.
- A **M.C. Kendra Ramírez**, estoy sumamente agradecida por la ayuda brindada en el laboratorio y asesorarme para obtener buenos análisis de mis resultados.
- A **M. C. Carlos Medrano, David Chong** y **M. C. Marcos Luna** por la ayuda en el entendimiento de diferentes temas y con el procesamiento de imágenes.
- A **Vanessa Castillejos, German Velasco, Índigo, Cristóbal Aguilar, Daniel Muñoz, Leo Lara, Carlos Medrano, Jonathan Hirata, Carlos Soto y Laura Escalante** por la compañía, apoyo emocional, risas, desvelos y demás, me llevo momentos inolvidables con ustedes, sin duda alguna la maestría no hubiera sido lo mismo sin ustedes, los quiero.

## Tabla de contenido

Resumen en español:.....	ii
Resumen en inglés:.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos .....	iii
Lista de figuras .....	vii
Lista de tablas .....	ix
Capítulo 1. Introducción.....	1
Capítulo 2. Antecedentes.....	3
2.1 Enfermedades de depósito lisosomal .....	3
2.2 Enzima glucocerebrosidasa .....	3
2.3 Enfermedad de Gaucher .....	4
2.3.1 Incidencia y herencia de la enfermedad de Gaucher.....	4
2.3.2 Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Gaucher.....	4
2.3.3 Tratamiento de la enfermedad de Gaucher.....	5
2.3.4 Costo del tratamiento .....	6
2.4 Nanomedicina .....	7
2.4.1 Nanomateriales como vehículos de entrega .....	7
2.4.2 Nanorreactores enzimáticos.....	8
2.4.3 Partículas tipo virus (VLPs) .....	9
2.4.4 Virus del mosaico del bromo (BMV).....	10
2.4.5 Dispersión dinámica de la luz (DLS).....	11
2.4.6 Potencial zeta .....	13
2.4.7 Microscopía electrónica de barrido .....	15
Capítulo 3. Justificación, Hipótesis y Objetivos.....	16
3.1 Justificación .....	16
3.2 Hipótesis.....	16
3.3 Objetivos .....	16

3.3.1 Objetivo general .....	16
3.3.2 Objetivos específicos .....	17
<b>Capítulo 4. Metodología .....</b>	<b>18</b>
4.1 Producción del BMV .....	18
4.1.1 Infección de hojas con BMV y cosecha de hojas infectadas.....	18
4.2 Purificación del BMV y de las proteínas de su cápside .....	18
4.2.1 Extracción del virus a través de hojas infectadas.....	18
4.2.2 Purificación de las proteínas de la cápside del BMV .....	21
4.3 Condiciones de encapsidación para la enzima Gcase.....	22
4.3.1 Determinación del diámetro hidrodinámico y potencial zeta de la enzima Gcase .....	22
4.3.2 Determinación del punto isoeléctrico de la enzima Gcase .....	22
4.4 Encapsidación de la enzima Gcase en VLPs del BMV .....	23
4.4.1 Ensamblajes de prueba .....	23
4.4.2 Ensayos de cambio en la movilidad electroforética de los ensamblajes de prueba .....	24
4.4.3 Gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	24
4.5 Funcionalización de las BMV-Gcase.....	26
4.6 Caracterización de las BMV-Gcase.....	26
4.6.1 Potencial zeta .....	26
4.6.2 Dispersión dinámica de la luz .....	¡Error! Marcador no definido.
4.6.3 Microscopía electrónica de transmisión.....	27
4.6.4 Ensayo de actividad enzimática de las BMV-Gcase con sustrato artificial .....	27
4.6.5 Evaluación de la estabilidad de las VLPs.....	28
<b>Capítulo 5. Resultados .....</b>	<b>29</b>
5.1 Purificación del BMV y de las partículas de su cápside .....	29
5.2 Encapsidación de la enzima Gcase en VLPs del BMV .....	30
5.3 Estequiometría Gcase: Proteína de la cápside del BMV.....	35
5.4 Funcionalización de las BMV-Gcase.....	39
5.4.1 Caracterización por dispersión dinámica de luz .....	39
5.5 Actividad enzimática de las nanopartículas con sustrato artificial .....	43
5.6 Evaluación de la estabilidad de las nanopartículas.....	46

<b>Capítulo 6. Discusión .....</b>	<b>47</b>
<b>Capítulo 7. Conclusiones .....</b>	<b>52</b>
<b>Literatura citada .....</b>	<b>53</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de un nanorreactor enzimático.....	9
<b>Figura 2.</b> Estructura del virus del mosaico de bromo .....	10
<b>Figura 3.</b> Doble capa eléctrica.....	13
<b>Figura 4.</b> Punto isoeléctrico .....	14
<b>Figura 5.</b> Partes de un microscopio electrónico de transmisión.....	15
<b>Figura 6.</b> Fases obtenidas después de centrifugar con cloroformo .....	19
<b>Figura 7.</b> Colchón de sacarosa al 10%.....	20
<b>Figura 8.</b> Microdiálisis para los ensambles de prueba de las VLPs con enzima Gcase .....	23
<b>Figura 9.</b> Signos característicos de la infección por BMV en hojas de cebada. ....	29
<b>Figura 10.</b> Banda azul correspondiente al BMV después de realizar ultracentrifugación del gradiente de sacarosa.....	30
<b>Figura 11.</b> Distribución de tamaño por volumen de las BMV-Gcase ensambladas en diferentes relaciones .....	31
<b>Figura 12.</b> Micrografía electrónica y distribución de tamaño de las BMV-Gcase ensambladas a una relación 1:3.....	32
<b>Figura 13.</b> Micrografía electrónica y distribución de tamaño de las BMV-Gcase ensambladas a una relación 1:5.....	33
<b>Figura 14.</b> Micrografía electrónica y distribución de tamaño de las BMV-Gcase ensambladas a una relación 1:6.....	33
<b>Figura 15.</b> Micrografía electrónica y distribución de tamaño de las BMV-Gcase ensambladas a una relación 1:8.....	34
<b>Figura 16.</b> Ensayo de movilidad electroforética en gel de agarosa al 1%.....	35
<b>Figura 17.</b> Gel desnaturizante de poliacrilamida con distintas concentraciones de enzima Gcase y en el último carril las VLPs.....	36
<b>Figura 18.</b> Gel desnaturizante de poliacrilamida con distintas concentraciones de proteína de la cápside del BMV y en el último carril las VLPs .....	36
<b>Figura 19.</b> Relación lineal entre la intensidad de banda en función de la masa de la enzima Gcase. ....	37
<b>Figura 20.</b> Relación lineal entre la intensidad de banda en función de la masa de la proteína de cápside del BMV.....	37

<b>Figura 21.</b> Representación esquemática de la funcionalización sobre la superficie de las BMV-Gcase. .....	40
<b>Figura 22.</b> Comparación en distribución de tamaño por volumen de las BMV-Gcase y BMV-Gcase-PEG-Man .....	41
<b>Figura 23.</b> Gráficos de potencial zeta para BMV-Gcase y BMV-Gcase-PEG-Man. ....	42
<b>Figura 24.</b> Gel desnaturizante de poliacrilamida al 10% con las BMV-Gcase y BMV-Gcase-PEG Man .....	43
<b>Figura 25.</b> Curva de Michaelis Menten que corresponde a la actividad específica comparada con la concentración del sustrato artificial 4MU-G de la enzima Gcase libre .....	44
<b>Figura 26.</b> Curva de Michaelis Menten que corresponde a la actividad específica comparada con la concentración del sustrato artificial 4MU-G de la enzima Gcase en VLPs sin funcionalizar. ....	44
<b>Figura 27.</b> Curva de Michaelis Menten que corresponde a la actividad específica comparada con la concentración del sustrato artificial 4MU-G de los nanorreactores con actividad Gcase.....	45
<b>Figura 28.</b> Gráfico de la pérdida de la actividad enzimática de la enzima Gcase libre, la enzima Gcase en las VLPs y las VLPs funcionalizadas.....	46
<b>Figura 29.</b> Representación esquemática de un nanorreactor de VLPs con actividad Gcase .....	50

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Composición del gel SDS-PAGE. ....	24
<b>Tabla 2.</b> Cantidades utilizadas para la obtención de la curva estándar para la cuantificación de las proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. ....	25
<b>Tabla 3.</b> Proporciones de la enzima Gcase y proteína de cápside en los ensambles de prueba. ....	31
<b>Tabla 4.</b> Constantes de Michaelis-Menten, velocidad máxima, constante catalítica y cociente $k_{cat}/K_m$ de la enzima Gcase libre y enzima en VLPs y los nanorreactores con actividad Gcase. ....	45

## Capítulo 1. Introducción

---

Las enfermedades de depósito lisosomal son causadas por mutaciones en los genes que codifican la función de las enzimas lisosomales en el organismo, y que son necesarias para la degradación de moléculas complejas como carbohidratos y lípidos en células. Entre estas enfermedades metabólicas se encuentra la enfermedad de Gaucher (EG).

La enfermedad de Gaucher se origina por mutaciones en el gen GBA1. Estas mutaciones interfieren en la actividad de la enzima lisosomal glucocerebrosidasa (también llamada glucosilceramidasa o  $\beta$ -glucosidasa) la cual hidroliza a un tipo de esfingolípido, la glucosilceramida o glucocerebrósido, en sus componentes glucosa y ceramida. La inactividad de la enzima resulta en una acumulación excesiva de grasas (glucocerebrósidos) en los lisosomas de macrófagos y monocitos, especialmente en el sistema de membranas reticuloendoteliales de las células. Esta acumulación ocasiona la formación de las llamadas células de Gaucher que se distinguen por desviar el núcleo a un lado y el resto de la célula se satura con cantidades anormales del esfingolípido. Estas células son encontradas en diferentes órganos, principalmente en el hueso, medula ósea, hígado, bazo y parénquima del ganglio linfático (Bennett & Mohan, 2013).

La enfermedad de Gaucher puede ser tratada por la terapia de reemplazo enzimático (ERT por sus siglas en inglés) (Grabowski et al., 1998). El objetivo de esta terapia es suministrar la enzima exógena que en el organismo que carece de la actividad. Sin embargo, a pesar de la eficiencia de la terapia de reemplazo enzimático en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher (Connock et al., 2006), la terapia se ve limitada debido a la corta vida media de la enzima en contacto con el torrente sanguíneo (Tekoah et al., 2013) haciendo necesario un mayor número de infusiones de la enzima al organismo para conseguir una buena eficiencia en la terapia. Además, a pesar de ser una enfermedad muy rara, la disponibilidad de la terapia de reemplazo enzimático para esta enfermedad está limitada por su alto costo que es de aproximadamente de \$ 382,200 dólares por año (Beutler, 1992; Dc, 2009). El tratamiento es de por vida, por lo tanto, aunque el tratamiento con ERT produce beneficios para la salud en los pacientes con la enfermedad, se consigue a un costo extremadamente alto.

En la búsqueda de alternativas para incrementar la vida media de la enzima glucocerebrosidasa cuando entra en contacto con la circulación sanguínea, surge la propuesta de solventar la problemática mediante el uso de nanopartículas como vehículos y reactores que provean protección ante la degradación, dirijan a la enzima hacia su sitio de acción y mantengan la actividad de la enzima glucocerebrosidasa (Gcase).

En esta investigación se plantea utilizar nanopartículas derivadas de virus, también llamadas VLPs (virus like particles) para el diseño y fabricación de nanorreactores que contengan la enzima glucocerebrosidasa funcionalizados con derivados de manosa para dirigirlos a los receptores de manosa en los macrófagos con la finalidad de ser empleados para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher. Los resultados esperados incluyen que las propiedades que ofrecen las VLPs del BMV hagan de la nanopartícula un vehículo que pueda evitar ser degradado antes de su internalización, además de brindar protección y estabilidad a la enzima glucocerebrosidasa incrementando su vida media en la circulación sanguínea.

## Capítulo 2. Antecedentes

---

### 2.1 Enfermedades de depósito lisosomal

Las enfermedades de depósito lisosomal son un grupo de trastornos hereditarios que se caracterizan por un mal funcionamiento de los lisosomas de las células. En los lisosomas se encuentran las enzimas necesarias de realizar la hidrólisis de las macromoléculas provenientes del catabolismo de los alimentos (Stirnemann et al., 2017). Las enfermedades de depósito lisosomal tienen su origen en mutaciones en los genes que codifican las enzimas lisosomales. La deficiencia en la síntesis de las enzimas lisosomales específicas para hidrolizar macromoléculas como esfingolípidos, glucoproteínas, glucoesfingolípidos y otras resulta en una acumulación de estas macromoléculas en los lisosomas de las células que causa una enfermedad. Éstas se clasifican según la molécula que se acumula (García Díaz et al., 2016).

### 2.2 Enzima glucocerebrosidasa

El gen *GBA1* codifica la enzima lisosomal glucocerebrosidasa (Gcase). Por lo que, si en el gen *GBA1* existen mutaciones, la síntesis de la enzima Gcase se verá alterada y se obtendrá una enzima no funcional. Estas alteraciones en la enzima Gcase perjudicarán su función catalítica, que es hidrolizar a los glucocerebrósidos, un tipo de glucoesfingolípidos, para la obtención de sus componentes, moléculas de glucosa y el esfingolípido ceramida, los glucocerebrósidos son moléculas intermediarias en el catabolismo de los globósidos y gangliósidos. La consecuencia a esta disfunción enzimática es la acumulación de los glucocerebrósidos en los lisosomas de macrófagos que ocasionará la formación de células de Gaucher (Hruska et al., 2008).

## 2.3 Enfermedad de Gaucher

La enfermedad de Gaucher es un trastorno metabólico de depósito lisosomal que se origina por mutaciones en el gen *GBA1*, localizado en el cromosoma 1 (1q21). La enfermedad se caracteriza por la acumulación excesiva de moléculas lipídicas llamadas glucocerebrósidos cuya estructura está formada por la unión covalente de una molécula de ceramida con una molécula de glucosa (Hruska et al., 2008).

### 2.3.1 Incidencia y herencia de la enfermedad de Gaucher

Entre los trastornos metabólicos de depósito lisosomal, la enfermedad de Gaucher es la más prevalente. Este trastorno metabólico afecta a mujeres y hombres por igual, tiene una incidencia en la población en general de 1 a 60,000 personas por año, sin embargo, esta cifra incrementa a 1 de cada 800 personas por año en la población judía askenazi en Europa central y oriental, siendo los portadores entre el 8% y el 10% de la población (Dc, 2009; Stirnemann et al., 2017). Particularmente, en México no existe un conocimiento certero de la incidencia de esta enfermedad debido a que no hay leyes de legislación para enfermedades raras en el país. Sin embargo, en la asociación mexicana de Gaucher se registraron 63 casos entre los años de 1983-2006 (Zarco-Roman, 2011).

Esta enfermedad se hereda con un patrón autosómico recesivo, es decir, para que un individuo padezca la enfermedad debe heredar un gen *GBA1* anormal (que presenta mutaciones) de cada padre. El riesgo de que dos padres portadores de la enfermedad transmitan el gen anormal y, por lo tanto, tengan un hijo afectado con la enfermedad de Gaucher es del 25% en cada embarazo. (Bennett et al., 2013; Franco-Ornelas et al., 2010; Khan et al., 2017).

### 2.3.2 Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Gaucher

A pesar de que el trastorno metabólico de Gaucher se debe a mutaciones en un solo gen, la expresión fenotípica y los síntomas de la enfermedad son variables de paciente a paciente, y van

desde totalmente asintomáticos, en los que la enfermedad solo es detectable por análisis de ADN, hasta una forma neonatal letal con hidropesía fetal e ictiosis cutánea (Sidransky, 2004; Zimran, 2017).

Algunos de los síntomas más comunes que pueden manifestarse por la enfermedad son: fatiga, molestias, infecciones, sangrado y hematomas causados por la hepatomegalia, esplenomegalia, anemia y trombocitopenia. Además, induce problemas relacionados con los huesos, como dolor, crisis óseas y necrosis avascular (Grabowski et al., 1998; Stirnemann et al., 2017). La enfermedad de Gaucher ha sido clasificada en 3 formas clínicas con base en la ausencia (tipo 1, el más común de los tipos) o presencia (tipo 2 Y tipo 3) de complicaciones neurológicas. Recientemente, se han identificado otros 2 tipos de la enfermedad que incluyen a las formas letal-perinatal y la cardiovascular.

### **2.3.3 Tratamiento de la enfermedad de Gaucher**

El tratamiento de trastornos originados por deficiencias de actividad enzimática por medio de enzimas terapéuticas se describió por primera vez hace cincuenta años (Duve, 1966). La enfermedad de Gaucher puede ser tratada mediante la terapia de reemplazo enzimático (ERT por sus siglas en inglés) (Grabowski et al., 1998). El objetivo de esta terapia es suministrar la enzima exógena en el organismo que carece de esta actividad. La administración se realiza por vía intravenosa. Para esto, la enzima se ha modificado mediante ingeniería genética añadiendo oligosacáridos terminados en grupos manosilo, diseñados así para ser reconocidos por los receptores específicos del  $\alpha$ -manosilo que se encuentran en la superficie de los macrófagos y que así se facilite su entrega a los lisosomas (Oh, 2015).

Actualmente, existen 3 enzimas modificadas genéticamente que han sido aprobadas por la agencia gubernamental de los Estados Unidos de Norteamérica (*Food and Drug Administration*, FDA) para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher por terapia de reemplazo enzimático. Las enzimas se obtienen de los siguientes sistemas celulares: la velaglucerasa (Shire Pharmaceuticals Inc.) obtenida a partir de fibroblastos humanos, la imiglucerasa (Cerezyme®, Sanofi-Genzyme) que es producida usando células de ovario de hámster chino y la taliglucerasa (Elelyso®, Pfizer) producida usando

células de zanahoria (Oh, 2015; Stirnemann et al., 2017; Tekoah et al., 2013). Debido a lo anterior, es factible la entrega dirigida de la enzima Gcase para el tratamiento específico de la enfermedad de Gaucher.

Específicamente, la velaglucerasa alfa es modificada para exponer sus residuos manosa mediante el tratamiento de kifunensina que es un potente inhibidor de la enzima manosidasa I de esta manera se producen estructuras de glicoproteínas con alto contenido de manosa. Bioquímicamente, la enzima modificada velaglucerasa, tiene un peso molecular aproximado de 63 KDa y además posee 5 residuos glucídicos ricos en manosa con la finalidad de mejorar la internalización de la enzima por los macrófagos a través de sus receptores de manosa (Brumshtein et al., 2010).

#### **2.3.4 Costo del tratamiento**

A pesar de ser una enfermedad muy rara y con poca incidencia en la población en general, la disponibilidad de la terapia de reemplazo enzimático para esta enfermedad está limitada por su alto costo. Para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher se recomienda una dosis de 60 unidades de enzima por cada kilogramo del paciente, entonces, para un paciente de 70 kg una transfusión de la enzima tiene un costo de aproximadamente \$14,700 dólares y se recomienda una transfusión cada dos semanas por lo que el costo total del tratamiento en un año es de aproximadamente de \$382,200 dólares (Beutler, 1992; Beutler et al., 2009). Cabe mencionar que el tratamiento es de por vida, por lo tanto, aunque el tratamiento con ERT produce beneficios para la salud en los pacientes con la enfermedad, se consigue a un costo extremadamente alto.

## 2.4 Nanomedicina

La nanomedicina es la rama de la medicina que aplica las herramientas nanotecnológicas para la prevención y el tratamiento de enfermedades mediante el uso de nanomateriales, como nanopartículas y nanodispositivos biocompatibles, para el diagnóstico, la entrega, la detección o la actuación en un organismo vivo (Kumar, 2013). Los nanomateriales presentan propiedades únicas y diferentes a los compuestos en su forma macroscópica como son: gran área superficial, capacidad de internalización en células, mayor reactividad química y propiedades eléctricas diferentes. En el área de la nanomedicina se ha realizado un esfuerzo significativo para resolver diversas problemáticas existentes en el tratamiento de enfermedades. También busca aumentar la eficiencia de las terapias, disminuir los efectos secundarios y reducir los elevados costos que limitan su aplicación (González-Davis, Chauhan, 2019). Es por ello, que una propuesta para solventar la problemática en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher es mediante el uso de la nanotecnología.

### 2.4.1 Nanomateriales como vehículos de entrega

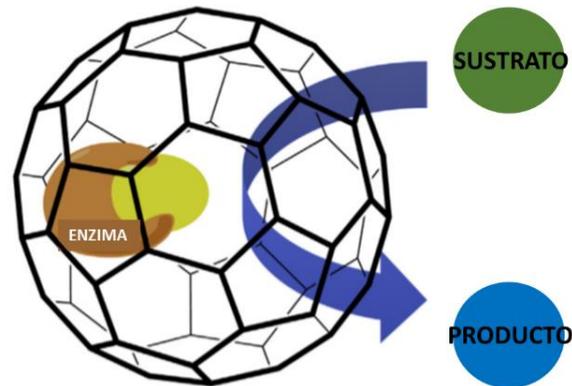
Diversas investigaciones están enfocadas en el uso de nanomateriales como potenciales vehículos de entrega de moléculas de interés biomédico para combatir diversas enfermedades (Sengar, García-Tapia, et al., 2019; Sengar, Garcia-Tapia, et al., 2019; Sengar et al., 2018). Los nanovehículos sirven como plataforma de entrega de diferentes moléculas y, en ocasiones, proveen mayor estabilidad o una mejora en las propiedades de la molécula transportada o “*cargo*”. Además, a estos nanovehículos se les pueden incorporar diferentes ligandos para dirigir el curso de su trayectoria y que así se ubiquen donde sean requeridos, evitando una dispersión sistémica y consiguiendo que la entrega de la molécula “*cargo*” sea de forma controlada y dirigida hacia células Diana (Zhang et al., 2018).

Una amplia gama de nanopartículas es utilizada como nanovehículos de entrega de moléculas de interés terapéutico. Entre ellos están las nanopartículas liposomales, las poliméricas y las de origen proteínico. Los estudios demuestran que las nanopartículas liposomales se encuentran limitadas

por la inestabilidad de la partícula, su rápida eliminación del cuerpo humano y fusión espontánea con la membrana de células que se encuentran a lo largo de su trayectoria (Dean et al., 2017; Xu et al., 2012). Por otro lado, las nanopartículas poliméricas muestran inestabilidad de la partícula, liberación lenta y no uniforme de la molécula *cargo* y son potencialmente inmunogénicas por lo que se ha restringido su uso biomédico (Rohovie et al., 2017). Las nanopartículas de origen proteínico han demostrado ser más estables que los liposomas y más uniformes que las nanopartículas poliméricas y en general biodegradables. Por lo que se puede inferir que los nanovehículos de entrega de base proteínico proveerá un mejor sistema de entrega de moléculas.

#### **2.4.2 Nanorreactores enzimáticos**

Los nanomateriales de origen biológico (bionanomateriales) también pueden ser utilizados para la fabricación de nanorreactores. Estos nanorreactores combinan la catálisis enzimática con las propiedades de los nanomateriales. Los nanobiorreactores cumplen la función principal de un biorreactor químico en cuyo interior ocurre una reacción química catalizada por enzimas (Figura 1). Uno de los intereses de este tipo de sistemas es para ser empleados en el tratamiento de enfermedades causadas por deficiencias funcionales de las enzimas en el organismo o para el tratamiento contra el cáncer. Debido a su diseño, los nanorreactores con la enzima unida, insertada o encapsidada podrían actuar de forma *in situ* en el organismo (Vriezema et al., 2005).



**Figura 1.** Representación esquemática de un nanorreactor enzimático. En la imagen, la enzima se encuentra en el interior del nanorreactor la cual catalizará la reacción de sustrato a producto. Modificada de Wilkerson, 2018.

Una de las premisas de utilizar bionanomateriales como nanorreactores que inmovilizan enzimas en su interior es por sus propiedades intrínsecas de biocompatibilidad y gran área superficial. Además, se reducen las limitaciones de difusión al tiempo que aumentan la estabilidad protegiendo a las enzimas de la proteólisis y, lo más importante, son compatibles con componentes celulares. La presencia de grupos reactivos en su superficie permite una fácil funcionalización para su direccionamiento a células diana (Koyani et al., 2017, González-Davis, Chauhan, 2019).

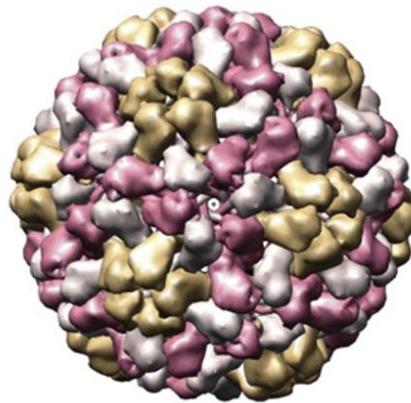
### 2.4.3 Partículas tipo virus (VLPs)

Las partículas tipo virus son obtenidas de las proteínas que constituyen la cápside de un virus sin su material genético y por lo tanto no son infecciosas. En ausencia del material genético las proteínas suelen autoensamblarse formando las VLPs, el tamaño de estas estructuras varía entre los 20 y 1000 nm. Existe una amplia variedad de partículas tipo virus que se originan de virus de microorganismos, plantas, insectos y mamíferos. Se ha centrado la atención en las VLPs para ser empleadas como nanovehículos de entrega de diferentes moléculas de interés (Yoo et al., 2011). Específicamente, las partículas derivadas de virus de plantas presentan diversas ventajas cuando se administran al organismo; una de ellas es la baja generación de respuesta inmune y que no presentan citotoxicidad en células de mamíferos, por lo que se puede decir que son biocompatibles, que es una característica indispensable para disminuir los efectos secundarios cuando son introducidas a un organismo vivo.

En un estudio reciente, Núñez-Rivera et al., (2020) analizaron partículas tipo virus obtenidas de plantas, CCMV y BMV demostraron que a pesar de que las proteínas de la cápside de estos virus tienen una homología del 80% en su secuencia de aminoácidos existen variaciones notables en los ensayos de inmunogenicidad *in vitro*, el CCMV mostró una alta activación de los macrófagos, mientras que el BMV mostró una respuesta inmunogénica casi nula (Nuñez et al., 2020).

#### 2.4.4 Virus del mosaico del bromo (BMV)

Particularmente, el virus del mosaico de bromo (BMV, por sus siglas en inglés) pertenece al género de los *Bromovirus*, infecta específicamente a la planta *Hordeum vulgare* (cebada), tiene un tamaño alrededor de los 28 nm, simetría icosaédrica (T=3) y está compuesto por 180 subunidades idénticas de una proteína de aproximadamente 20 kDa (Figura 2) (Narayanan et al., 2017).



**Figura 2.** Estructura del virus del mosaico de bromo (BMV) con simetría icosaédrica T=3. Tomado de Narayanan & Han, 2017.

Investigaciones de reensamble *in vitro* dieron como resultado que diversos virus, y entre ellos el BMV, si son sometidos a un pH 7.5 o mayor y una fuerza iónica igual o mayor a 0.5 M, sus cápsides proteínicas se disocian en trímeros y después de una disminución en el pH y la fuerza iónica se puede llevar a cabo el reensamble de las cápsides proteínicas del virión (Lucas et al. 2001). Este método

es utilizado eficientemente para eliminar el material genético y encapsidar moléculas aniónicas para fines terapéuticos (Douglas & Young, 1998; Peabody, 2003).

Por otra parte, la parte superficial de las partículas tipo virus consta de diferentes subunidades las cuales exponen grupos funcionales que se pueden modificar químicamente con ligandos. Chauhan et al. (2018) demostraron que es posible la modificación superficial de VLPs del bacteriófago P22 con actividad citocromo P450, realizando un entrecruzamiento con un derivado del polímero polietilenglicol bifuncional el cual está constituido por 4 unidades de polietilenglicol, un grupo éster succinimidílico y el grupo maleimida (NHS-PEG<sub>4</sub>-Mal) con moléculas de un derivado de estradiol uniéndose a través de enlaces amida, posteriormente este ligando se conjugó covalentemente mediante la adición de Michael con los grupos amino de la superficie de las VLPs. Los investigadores realizaron esta funcionalización para conseguir un direccionamiento específico hacia receptores de estrógeno situados en las células con cáncer de mama. Es bien sabido que este tipo de células presenta una afinidad por el estradiol (Chauhan et al., 2016; Fowler et al., 2016). Asimismo, los investigadores añadieron a las VLPs moléculas de protoporfirina que son sensibles a la luz UV de 356 nm, con el motivo de que cuando los nanobiorreactores se encontraran en las células con cáncer de mama pudieran ser irradiados a esta longitud de onda y sean activados, produciendo especies reactivas de oxígeno que provocaran la muerte celular específica de las células con cáncer de mama (Chauhan et al., 2018).

#### **2.4.5 Dispersión dinámica de la luz (DLS)**

La dispersión dinámica de la luz (*Dynamic light scattering, DLS*) es una técnica empleada para conocer el tamaño de partículas y la distribución de tamaños, y mediante la determinación del radio hidrodinámico de las partículas. El fundamento de la técnica está basado en el movimiento Browniano de las partículas de la muestra, el cual es factible medir al incidir luz a la muestra y así generar un patrón de dispersión de luz que es captado por un fotodetector. El patrón de dispersión de luz consiste en áreas iluminadas y oscuras, el área iluminada corresponde a la luz detectada en una misma fase de onda, es decir con interferencia constructiva, mientras que el área oscura es aquella que detecta fases de onda diferentes por lo que la interferencia es destructiva.

Experimentalmente, las partículas que se encuentran suspendidas en un medio líquido tienden a moverse aleatoriamente y a esto se le conoce como movimiento browniano. Es bien sabido que, en esta clase de movimiento, las partículas más pequeñas se desplazan más rápido que las partículas grandes, esto según la ecuación de Stokes-Einstein, descrita a continuación:

$$D_H = \frac{K_B T}{3\pi\eta D} \quad (1)$$

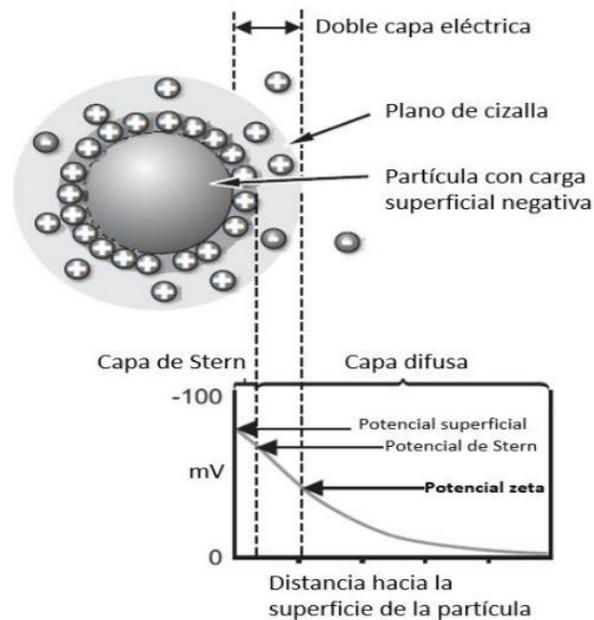
donde,  $D_H$  corresponde al diámetro hidrodinámico,  $K_B$  es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta,  $\eta$  es la viscosidad del solvente, y D corresponde al coeficiente de difusión.

Debido a la fluctuación de intensidad provocado por el movimiento de las partículas en un medio líquido se puede medir la tasa a la que fluctúa la intensidad. El equipo Zetasizer Nano ZS de Malvern con ayuda de un correlacionador digital compara la intensidad detectada y calcula el grado de correlación entre una medición y otra. De este modo, el programa relaciona una tasa baja de fluctuación con partículas grandes y la presencia de partículas pequeñas está determinada por una tasa alta de fluctuación. Para finalizar, el programa a partir de una función de correlación calcula la distribución de tamaño y la tasa de decaimiento para un número dado de distintos tamaños obteniendo un gráfico de distribución el cual está basado en la intensidad de tamaño (Instruments, 2009).

Se ha demostrado que la técnica de DLS se ha utilizado exitosamente para medir el radio hidrodinámico de partículas tipo virus (VLPs). Escobedo (2018) en su tesis de maestría utilizó esta técnica y demostró la distribución de tamaños para VLPs obtenidas del BMV. Además, hizo una comparación del radio hidrodinámico de estas partículas con el radio observado en microscopía electrónica de transmisión (TEM) observando una similitud en los resultados (Escobedo Rodríguez, 2018). Del mismo modo, Ramírez (2020) en su tesis de maestría demostró qué es factible la utilización de la técnica de DLS para un análisis rápido para el conocimiento del radio hidrodinámico de las VLPs obtenidas del BMV funcionalizadas debido a que existe una similitud en los resultados obtenidos en DLS y microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Ramírez Acosta, 2020).

### 2.4.6 Potencial zeta

El equipo Zetasizer Nano ZS de Malvern puede medir el potencial zeta de partículas cuando estas interactúan con un medio líquido. Lo realiza determinando la movilidad electroforética y aplicando la ecuación de Henry. En la interacción de una partícula con un medio líquido se genera una carga superficial en las partículas que se balancea de inmediato con los contraiones propios del medio líquido, formando un interfaz que se conoce como doble capa eléctrica. Esta capa que rodea a la partícula se conforma por dos partes: una región interior llamada capa compacta o de Stern, donde los iones se unen fuertemente y una región exterior conocida como capa difusa, donde la unión de iones es débil. La posición de los iones que se encuentren en el perímetro de la frontera se verá afectada debido al desplazamiento de una partícula ocasionando que los iones se muevan con la partícula. Esta frontera se conoce como plano de máxima aproximación o cizalla y la diferencia de potencial que existe en esa región se conoce como potencial zeta (Figura 3) (Instruments, 2009). Entonces, la carga eléctrica que se forma en el interfaz de una partícula entre su superficie y el medio líquido esta descrita por el potencial zeta, y su valor se mide en mV (milivoltios). En la práctica, si los valores de potencial zeta son altos (más positivos que +30mV o más negativos que -30mV) entonces se asume que las partículas se repelen unas a otras, evitando su agregación o floculación y se considera que la partícula es coloidalmente estable.



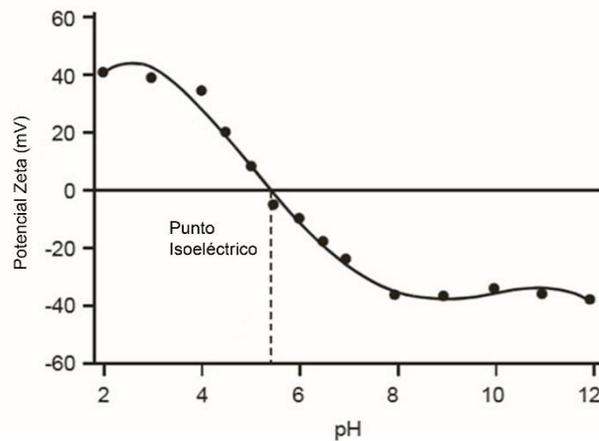
**Figura 3.** Representación gráfica de la formación de la doble capa eléctrica. Modificada de Instruments, 2009.

Como consecuencia de la carga de la partícula, al aplicar un campo eléctrico, la partícula será atraída por el electrodo de carga opuesta. La velocidad a la que la partícula se desplaza en el campo eléctrico se conoce como movilidad electroforética y con ella se obtiene el valor del potencial zeta, aplicando la ecuación de Henry:

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta} \quad (2)$$

donde  $z$  es el potencial zeta;  $U_E$  es la movilidad electroforética;  $\varepsilon$  es la constante dieléctrica;  $\eta$  es la viscosidad y  $f(ka)$  es la función de Henry.

El pH es el factor más importante en la medición del potencial zeta, ya que su valor puede variar dependiendo su acidez o alcalinidad. Estos cambios de valor se pueden representar en un gráfico de potencial zeta vs pH y el punto en donde el potencial zeta es cero es llamado punto isoeléctrico (Figura 4).

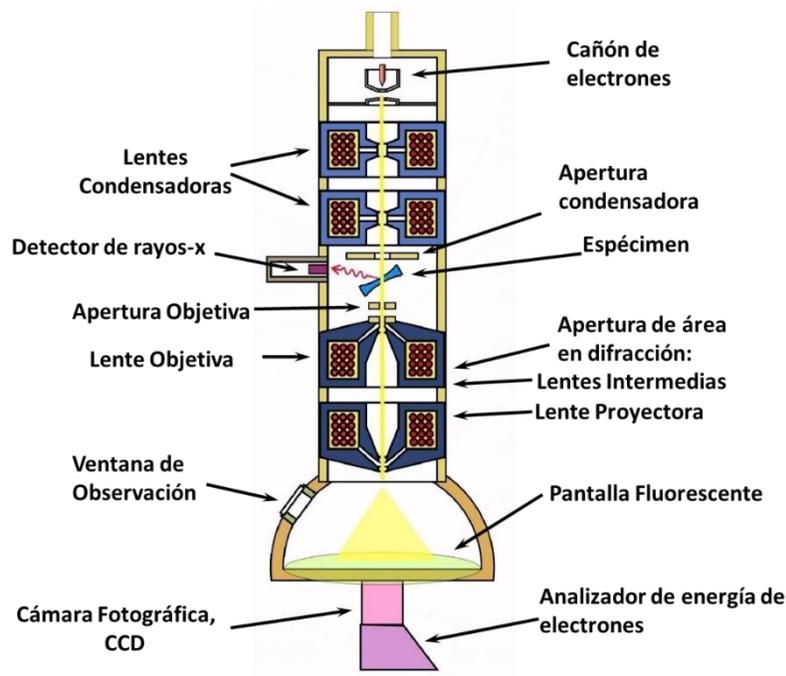


**Figura 4.** Representación del punto isoeléctrico. Gráfico de potencial zeta en función del pH. El punto en donde el potencial zeta es cero se conoce como punto isoeléctrico. Tomado de Instruments, 2009.

### 2.4.7 Microscopía electrónica de barrido

Una técnica empleada para la caracterización morfológica de nanopartículas, entre ellas las VLPs y los virus, es la microscopía electrónica de transmisión, TEM por sus siglas en inglés. Esta emplea un haz de electrones como fuente que posee una longitud de onda menor a 1 nm, con este haz se ilumina la muestra.

Una parte importante del microscopio electrónico es el cañón de electrones que puede ser filamento de tungsteno o el cristal hexaboruro de lantano ( $\text{LaB}_6$ ) el cual funciona como fuente de electrones en una cámara de vacío generando un haz que ilumina el espécimen de interés. En general, para la formación del haz de electrones es necesario aplicar un campo eléctrico de alto voltaje hasta que la fuente comience a emitir los electrones. Mediante una variedad de lentes el haz es enfocado paralelamente a lo largo de la columna del microscopio hasta incidir sobre un espécimen delgado que de facilidad al paso de los electrones. Diversos electrones se dispersan mientras que otros traspasan al espécimen incidiéndose sobre una pantalla fluorescente, finalmente se forma una imagen ampliada del espécimen (Figura 5) (Jeol, 2020).



**Figura 5.** Representación gráfica de las partes de un microscopio electrónico de transmisión. Modificada de Williams & Carter, 2009.

## Capítulo 3. Justificación, Hipótesis y Objetivos

---

### 3.1 Justificación

En el tratamiento de la enfermedad de Gaucher por la terapia de reemplazo enzimático, la enzima glucocerebrosidasa carece de estabilidad en plasma sanguíneo por lo que es necesario un número elevado de administraciones de la enzima al organismo del paciente para que haya un efecto terapéutico. Aunado a esto, está el costo extremadamente elevado de la enzima, lo que limita el tratamiento de los pacientes. Es por ello, que en este proyecto se plantea la encapsidación de la enzima glucocerebrosidasa dentro de VLPs derivadas de virus del BMV para conferirle estabilidad y aumente su vida media en la circulación sanguínea. Además, estos nanorreactores enzimáticos también se funcionalizarán con ligandos específicos a receptores de manosa en macrófagos para su posible internalización y así puedan actuar de manera específica.

### 3.2 Hipótesis

La encapsidación de la enzima glucocerebrosidasa en VLPs del BMV formará nanorreactores enzimáticos estables que proveerán protección a la enzima manteniendo su funcionalidad. La funcionalización de los nanorreactores con derivados de manosa permitirá dirigirlos a receptores específicos en macrófagos.

### 3.3 Objetivos

#### 3.3.1 Objetivo general

Diseñar, sintetizar y caracterizar nanorreactores con actividad glucocerebrosidasa funcionalizados con derivados de manosa, utilizando VLPs obtenidas del BMV para la encapsidación de la enzima.

### 3.3.2 Objetivos específicos

- Obtener las proteínas de la cápside del BMV.
- Establecer las condiciones de encapsidación de la glucocerebrosidasa en partículas tipo virus del BMV.
- Diseñar estrategias de funcionalización de las VLPs con derivados de manosa.
- Caracterizar catalítica y fisicoquímicamente las VLPs.

## Capítulo 4. Metodología

---

### 4.1 Producción del BMV

#### 4.1.1 Infección de hojas con BMV y cosecha de hojas infectadas

Para la obtención de virus, fue necesario la infección con el virus nativo del BMV a plantas de la especie *Hordeum vulgare* (cebada). La siembra de la planta se realizó en el invernadero del Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNYN) de la UNAM. Se sembraron 10 semillas en cada maceta con sustrato para facilitar su crecimiento, estas se regaron diariamente. A las dos semanas de la germinación se llevó a cabo la infección, para esto se provocó daño mecánico en cada hoja de la planta con una fibra de ángel metálica, después en la herida se colocó y se esparció una gota de 10  $\mu$ L del virus BMV nativo con una concentración de 0.2 mg/mL en cada hoja de la cebada. Posteriormente, se realizó la cosecha de las hojas una vez que se presentó clorosis, síntomas típicos de infección, que normalmente aparecen a las dos semanas después de la inoculación del virus en la planta. Finalmente, las hojas infectadas cosechadas se pesaron y se almacenaron a -20 °C.

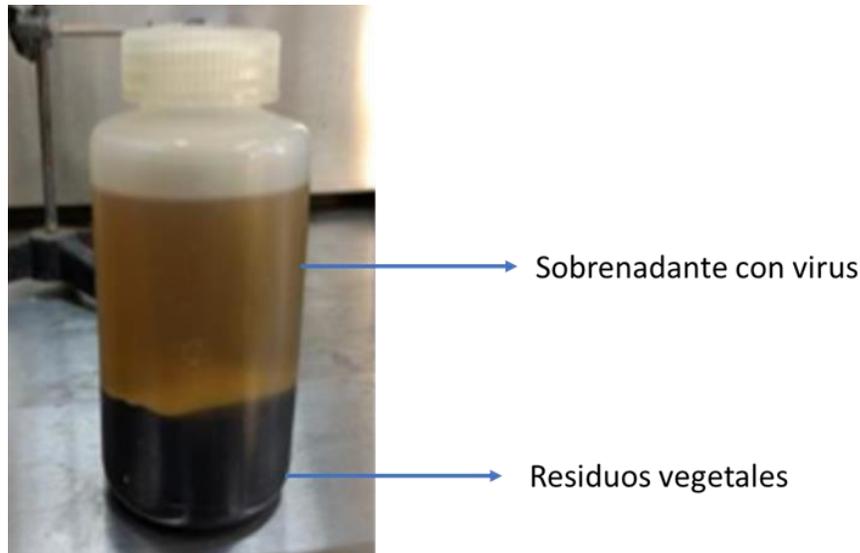
### 4.2 Purificación del BMV y de las proteínas de su cápside

La purificación del virus se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Cadena-Nava et al. (2012)

#### 4.2.1 Extracción del virus a través de hojas infectadas

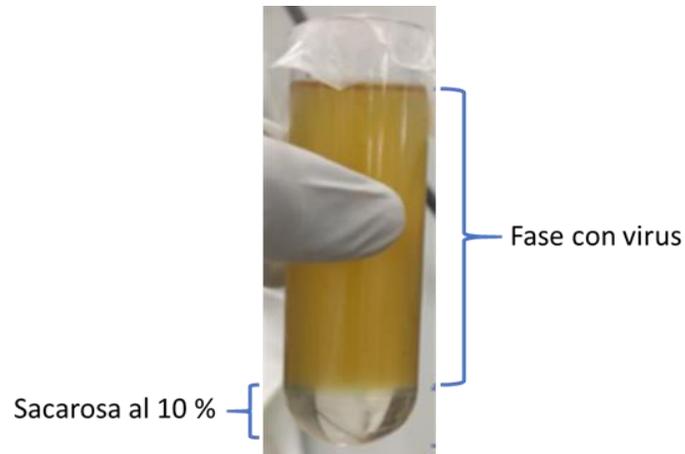
Para la obtención del virus, 50 g de las hojas de cebada infectadas se licuaron con una solución amortiguadora de extracción de virus (acetato de sodio 0.5 M, acetato de magnesio 0.08 M, pH 4.5). Se obtuvo una mezcla heterogénea que se filtró a través de una tela tipo gasa para eliminar los restos sólidos y sólo se guardó la fase líquida. Posteriormente, se realizó una solución 1:2 del

extracto con el virus filtrado con cloroformo y se transfirió en botes de teflón de 250 mL, una vez balanceados con solución amortiguadora de extracción se centrifugaron por 40 min a 10,000 rpm, 4°C, rotor JA-14 en una centrifuga marca Beckman, modelo JXN-26. Después de esto se obtuvieron dos fases; una con los residuos vegetales y el sobrenadante que es la parte que contiene el virus (Figura 6), se recuperó el sobrenadante y se agitó a 4°C por toda la noche, para eliminar el exceso de cloroformo.



**Figura 6.** Tubo de teflón que contiene las fases obtenidas después de centrifugar el extracto con virus y cloroformo. La fase superior de color amarillo contiene el virus mientras que la parte inferior corresponde a los residuos vegetales.

Pasado el tiempo de agitación, se colocaron 25 mL de la solución con el virus en tubos de policarbonato para ultracentrífuga de 38 mL. Cuidando de no mezclar las fases, se adicionaron 5 mL de sacarosa al 10% en el fondo del tubo con la muestra, debido a la densidad de las soluciones se formaron dos fases (Figura 7), la fase superior contiene al virus. Los tubos se balancearon y se centrifugaron por 2 h a 32,000 rpm, a 4°C, en un rotor SW-32Ti, en una ultracentrífuga marca Beckman, modelo XPN-100. Una vez terminada la centrifugación, rápidamente se descartó el sobrenadante y los pellets se resuspendieron con 200  $\mu$ L de solución amortiguadora de suspensión de virus, en esta parte se tuvo el cuidado de no hacer burbujas al pipetear.



**Figura 7.** Colchón de sacarosa para la purificación del virus. Se muestran las dos fases formadas debido a la diferencia en densidades de las soluciones. La fase inferior corresponde al colchón de sacarosa al 10%, mientras que la fase superior contiene el extracto con virus obtenido en el paso anterior.

La solución obtenida de la resuspensión de los pellets se colocó en partes iguales y con cuidado sobre un gradiente continuo de sacarosa del 5% al 40% que se encontraba repartido en 4 tubos para ultracentrífuga, una vez balanceados fueron centrifugados a 30,000 rpm, a 4°C, en un rotor SW-32Ti, por 2 h. Después de la centrifugación, los tubos con muestra se colocaron en un soporte universal en la oscuridad en donde se les incidió luz blanca desde abajo del tubo y de este modo se reveló una banda de color azul que es característica del virus, la banda se recuperó con una pipeta Pasteur.

Para deshacerse del exceso de sacarosa, se diluyó 1:4 la muestra de la banda azul recuperada con solución amortiguadora de suspensión de virus y se centrifugó a 32,000 rpm, a 4°C, en un rotor SW-32Ti, durante 3 h. Después de la centrifugación, se resuspendieron los pellets con 200 µL de solución amortiguadora de suspensión de virus y se colocaron todas las muestras de los pellets resuspendidos en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Para finalizar, se determinó la concentración y la pureza del virus obtenido con un espectrofotómetro UV-VIS modelo Nanodrop 200c, de la marca Thermo Scientific. Se midió la absorbancia a las longitudes de onda de  $A_{280}$  y  $A_{260}$ , se seleccionaron condiciones para ácidos nucleicos, dando como resultado un espectro con un pico de máxima absorbancia a 260 nm que corresponde a la presencia de ARN en el BMV. Para el análisis se utilizaron el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon = 27,013,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) y la longitud de la celda que la luz

atraviesa ( $b = 1$  cm). Estos datos fueron necesarios para calcular la concentración del virus en mol/L con la ecuación de Lambert-Beer:

$$C = \frac{A_{260}}{b \cdot \varepsilon} \quad (3)$$

Además, para cerciorarnos de la pureza del virus del BMV se eligieron razones de  $A_{260/280}$  con un valor igual o mayor a 1.5, debido a que la pureza del virus está relacionada con la proporción de ácidos nucleicos y proteína presente. Con estas mediciones, se prepararon alícuotas de 2 mg/mL de virus de BMV en tubos Eppendorf de 2 mL y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.2 Purificación de las proteínas de la cápside del BMV

Para desensamblar las proteínas de la cápside del virus, se empleó 4 mg de BMV los cuales fueron dializados en membranas de 14,000 kDa (Spectrum Laboratories), contra una solución amortiguadora de desensamble ( $\text{CaCl}_2$  500 mM, Tris-HCl pH 7.5 50 mM, EDTA 1 mM DTT 1 mM, PMSF 0.5 mM, pH 8) por 24 h a  $4^{\circ}\text{C}$  en agitación durante todo el proceso. Se recuperaron las muestras dializadas y se colocaron en tubos para centrifuga marca "Beckman Coulter" de capacidad de 4 mL. Los tubos se balancearon para ser centrifugados en un rotor 90Ti a 50,000 rpm, a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 8 h y 30 min. Finalizada la centrifugación la muestra obtenida se recuperó por alícuotas de 400  $\mu\text{L}$ , desde arriba hacia abajo evitando la mezcla con el pellet. Cada alícuota se analizó y cuantificó con espectrofotometría UV-VIS, en un modelo Nanodrop 200c, de la marca Thermo Scientific a una absorbancia de  $A_{280}$  y  $A_{280/260}$ . La absorbancia a 280 nm nos permitió conocer la concentración de proteína en la muestra y  $A_{280/260}$  determinó la razón de proteína y ácidos nucleicos presentes en la muestra. Las alícuotas con valores de  $A_{280} \geq 0.1$  y  $A_{280/260} \geq 1.5$  fueron consideradas como óptimas. Las alícuotas óptimas se mezclaron y dializaron en membranas de 14,000 kDa contra una solución amortiguadora de proteínas (NaCl 1 M, Tris HCl 20 mM pH 7.2, EDTA 1 mM) durante 12 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, la muestra se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### **4.3 Condiciones de encapsidación para la enzima Gcase**

Para llevar a cabo la encapsidación de la enzima Gcase fue necesario realizar ensayos previos para conocer su diámetro hidrodinámico, su carga superficial y su punto isoeléctrico. Todas estas características de la enzima se analizaron mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) en un Zetasizer Nano ZS de Malvern.

#### **4.3.1 Determinación del diámetro hidrodinámico y potencial zeta de la enzima Gcase**

Para medir el diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de la Gcase, se colocó en una celda de capilaridad una muestra de 1 mL de agua desionizada con 20  $\mu\text{g}$  de la enzima. La medición se realizó utilizando los parámetros de medición para proteínas y se eligió potencial zeta o tamaño, según fue el caso.

#### **4.3.2 Determinación del punto isoeléctrico de la enzima Gcase**

Para la determinación del punto isoeléctrico de la enzima Gcase se midieron los valores de potencial Z en solución amortiguadora de fosfatos con distinto pH. Para esto se agregaron 50  $\mu\text{g}$  de glucocerebrosidasa en 1 mL de solución salina amortiguadora de fosfatos (NaCl 138 mM, KCl 3 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8.1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.47 Mm) a pH 3, 4, 5, 6, 7. La medición se llevó a cabo utilizando celdas de capilaridad, y se utilizó el equipo Nano SZ de Malvern Instruments para el análisis.

## 4.4 Encapsidación de la enzima Gcase en VLPs del BMV

### 4.4.1 Ensamblajes de prueba

Para determinar las condiciones óptimas del ensamble de la enzima Gcase en partículas tipo virus del BMV se elaboraron múltiples ensambles de prueba siguiendo la metodología descrita por Cadena-Nava et al. (2012). Para esto, los ensambles se realizaron a diferentes proporciones, variando la cantidad de proteína de cápside y manteniendo constante la cantidad de la enzima Gcase.

Las mezclas se realizaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, manejando un volumen final de 150  $\mu$ L, utilizando una solución amortiguadora de proteínas para aforar el volumen. Para el ensamble las muestras fueron colocadas en diálisis contra una solución amortiguadora de ensamble (NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7.2, KCl 10 mM, MgCl 5 mM) utilizando membranas de diálisis de 14,000 kDa durante 12 h a 4°C, se montó un sistema de microdiálisis para los ensambles (Fig. 8) de acuerdo a la metodología proporcionada por Cadena-Nava (trabajo sin publicar). Después se cambió la solución de diálisis por una solución amortiguadora de suspensión de virus (acetato de sodio 50 mM, acetato de magnesio 8 mM, pH 6) por 6 h y después se dializó de nuevo contra una solución amortiguadora de ensamble por 12 h. Finalmente se recuperaron las muestras y se filtraron en tubos de la marca Amicon de 100 kDa para eliminar la enzima no encapsidada y la proteína de cápside libre.



**Figura 8.** Sistema de microdiálisis montado para realizar los ensambles de prueba de la proteína de cápside del BMV con enzima Gcase en diferentes relaciones de masa. Las muestras están sobre una membrana de diálisis que permite la transferencia iónica con la solución amortiguadora.

#### 4.4.2 Ensayo de cambio en la movilidad electroforética del ensamble final

El ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés) se realizó al ensamble final seleccionado de acuerdo con la metodología descrita por Cadena-Nava et al. (2012), 1:6. Este experimento se llevó a cabo en gel de agarosa al 1%, utilizando una solución amortiguadora de virus (acetato de sodio 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6) durante 4 h, a 4 °C. Las muestras fueron cargadas en un volumen final de 20  $\mu$ L, conteniendo 5  $\mu$ L de glicerol para aumentar la densidad de la muestra y evitar que se salga del pozo. Para los controles se utilizó el virus nativo del BMV, la enzima Gcase y la proteína libre de la cápside. Al terminar la electroforesis, las proteínas en los geles se tiñeron con una solución “Instant Blue”, y se mantuvo en agitación durante toda la noche. Al día siguiente los geles se lavaron con agua desionizada para eliminar el excedente de la solución de tinción.

#### 4.4.3 Gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para determinar las proporciones de la encapsidación de la enzima Gcase y la proteína de cápside se realizaron dos geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12%. La composición de los geles se encuentra descrita en la siguiente tabla 1:

**Tabla 1.** Composición del gel SDS-PAGE.

Gel concentrado		Gel separador	
Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)	Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O	6000	H <sub>2</sub> O	7000
Acrilamida	1500	Acrilamida	8000
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	2500	Tris-HCl 1 M pH 8.8	5000
PSA 10%	30	PSA 10%	100
TEMED	14	TEMED	20

Los geles se corrieron a 100 V durante 90 min en una cámara Mini-PROTEAN de Bio Rad. Cada carril se cargó con las masas de proteína de cápside o enzima Gcase indicadas en la siguiente tabla 2:

**Tabla 2.** Cantidades utilizadas para la obtención de la curva estándar para la cuantificación de las proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida.

<b>Gel de poliacrilamida de la enzima Gcase</b>		<b>Gel de poliacrilamida de la proteína de BMV</b>	
<b>Carril</b>	<b>Cantidad (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Carril</b>	<b>Cantidad (<math>\mu\text{g}</math>)</b>
2	0.5	2	0.5
3	1	3	1
4	1.5	4	1.5
5	2	5	2
6	2.5	6	3
7	3	7	6
8	6	8	8
9	VLPs	9	VLPs

La variación en las cantidades de las muestras en cada gel permitió realizar dos calibraciones; una para determinar la cantidad de enzima presente y la otra para determinar la masa de proteína de cápside. Esto se realizó mediante un análisis por densitometría utilizando el software "ImageJ" donde se graficó la intensidad de la banda correspondiente para cada muestra en el carril y se calculó el área bajo la curva correspondiente a la densidad de dicha banda. Finalmente, se utilizó el software OriginPro 2017 y se elaboraron los gráficos lineales que relacionó la intensidad de banda con la concentración de proteína de cápside y la enzima Gcase empleadas, de esta manera se permitió determinar la cantidad de proteína de cápside y de la enzima Gcase presentes en un volumen específico de VLPs.

## 4.5 Funcionalización de las VLPs-Gcase

Para la funcionalización sobre la superficie de las VLPs-Gcase se empleó el derivado de manosa; 4-aminofenil- $\alpha$ -D-manopiranosido como ligando y se usó un PEG multifuncional constituido por 4 unidades de polietilenglicol, un grupo éster succinimidílico y el grupo maleimida (NHS-PEG<sub>4</sub>-Mal). La funcionalización se llevó a cabo utilizando 300 equivalentes de NHS-PEG<sub>4</sub>-Mal y 300 equivalentes del derivado de manosa en DMSO, estos reactivos se mezclaron para comenzar con la reacción y se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora. Posterior a esto, la reacción se mezcló con 70  $\mu$ g de las VLPs-Gcase suspendidas en amortiguador de fosfatos (PBS) (pH 7.4) y se incubaron por 3 h a 4°C. Finalmente, para descartar el exceso de reactivos que no se acoplaron a las VLPs-Gcase, se purificaron las muestras por ultrafiltración a 8000g en tubos de la marca Amicon de 100 kDa después se resuspendió la muestra en PBS (100 mM, pH 7.4) y se empleó la técnica de dispersión dinámica de luz para determinar el tamaño hidrodinámico y su potencial zeta.

## 4.6 Caracterización de las VLPs

Los ensayos de caracterización se realizaron para las VLPs-Gcase y VLPs-Gcase-Man los cuales se compararon con los resultados de los controles de la enzima Gcase libre, el virus nativo del BMV y la proteína libre del BMV.

### 4.6.1 Dispersión dinámica de la luz

Para medir el radio hidrodinámico de las partículas se utilizó la técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS). Para esto se agregaron 10  $\mu$ g de la muestra en 40  $\mu$ L de volumen final en celdas UV-Cuvette micro y se realizaron tres series de mediciones para obtener su diámetro hidrodinámico. La medición se llevó a cabo en un equipo Nano-ZS de Malvern, y se utilizaron los parámetros de medición para proteínas.

#### **4.6.2 Potencial zeta**

Para medir el potencial zeta del ensamble, se agregaron 20  $\mu\text{g}$  de VLPs filtradas en un volumen final de 1 mL de agua desionizada confirmando que el pH sea de 7. La medición del potencial zeta de las muestras se realizó en agua desionizada a pH 7, se utilizaron las mismas cantidades en  $\mu\text{g}$  y se realizaron tres series de mediciones para obtener su potencial zeta. Se llevó a cabo utilizando celdas de capilaridad, utilizando el equipo Nano SZ de Malvern Instruments

#### **4.6.3 Microscopía electrónica de transmisión**

Las muestras se prepararon de acuerdo con el protocolo descrito por Cadena-Nava et al., (2012). Se colocaron 6  $\mu\text{L}$  de muestra en rejillas de cobre de 400 soporte formvar/carbón 400 mesh (TedPella). Las muestras se mantuvieron en la rejilla 2 min y después se retiró el exceso de muestra con papel filtro Whatman, de grado 4. Posteriormente se agregaron 6  $\mu\text{L}$  de acetato de uranilo al 4% a las rejillas por 2 min después se retiró el exceso de acetato de uranilo con papel filtro. Las rejillas se almacenaron en un desecador. La caracterización de las muestras fue realizada en el laboratorio de microscopía avanzada de CICESE con un microscopio electrónico de transmisión marca Hitachi modelo H-7500. El análisis de las micrografías se realizó mediante el software "Image J" del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH). Con los datos obtenidos, se graficaron las distribuciones de tamaño para cada ensamble.

#### **4.6.4 Ensayo de actividad enzimática de las VLPs con sustrato artificial**

Según lo establecido en Motabar et al., (2012) se midió la actividad enzimática de las VLPs-Gcase sin funcionalizar y con funcionalización VLPs-Gcase-Man para corroborar que la enzima siguiera teniendo actividad después de su encapsidación y funcionalización. Además, este análisis se comparó con la actividad de la enzima libre.

El ensayo con sustrato artificial 4-metilumbelliferil  $\beta$ -D-glucopiranosido (4MU-G) se realizó en una placa Elisa de 96 pozos, usando 0.5  $\mu$ g de las muestras de enzima Gcase, VLPs-Gcase y VLPs-GcaseMan. Para el sustrato la concentración final fue 12, 9.25, 8, 6, 2, 1, 0.5 y 0.25 mM en cada pozo de la placa. La reacción enzimática inició por la adición de 10  $\mu$ L de las VLPs-Gcase a 10  $\mu$ L del sustrato en cada pozo de la placa, el volumen se completó a 100  $\mu$ L con solución amortiguadora de actividad (ácido cítrico 50 mM,  $K_2HPO_4$  176 mM, ácido taurocólico 10 mM y Tween-20 0.01%, pH 5.9). Para terminar la reacción después de la incubación de 10 min a temperatura ambiente se adicionaron 100  $\mu$ L de acetonitrilo a cada pozo. Finalmente se midió la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 365 nm y 440 nm para emisión y con los datos obtenidos se realizó la regresión de una hipérbola rectangular de Michaelis-Menten calculada en el software GraphPad Prism 8.

#### **4.6.5 Evaluación de la estabilidad de las VLPs**

Para evaluar la estabilidad de las VLPs-Gcase y VLPs-Gcase-Man respecto a la enzima Gcase libre, se incubaron las partículas en amortiguador de fosfatos (PBS) durante intervalos de tiempo de 30 min, 2,4, 5 y 24 h a 37°C, esto para simular condiciones fisiológicas. El experimento se realizó en una placa Elisa de 96 pozos, empleando un volumen final por pozo de 200  $\mu$ L, se colocó una concentración final de 0.5  $\mu$ g de la muestra y 500  $\mu$ M para el sustrato en cada pozo de la placa. La reacción enzimática inició por la adición de la muestra a 20  $\mu$ L del sustrato en cada pozo de la placa. Para finalizar el tiempo de incubación, se agregaron 60  $\mu$ L de amortiguador de paro (NaOH 1 M, glicina 1 M, pH 10). Finalmente, la actividad enzimática se midió en un espectrofluorímetro a una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de onda de emisión de 440 nm.

## Capítulo 5. Resultados

---

### 5.1 Purificación del BMV y de las partículas de su cápside

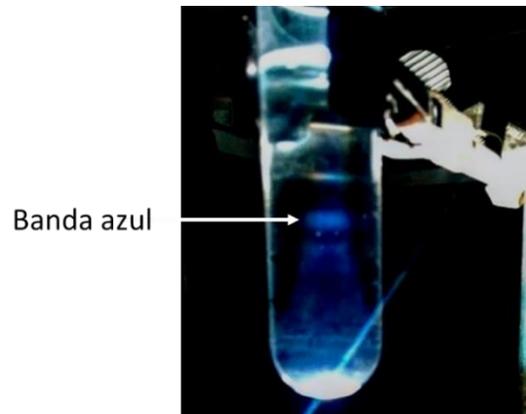
La recolección de hojas infectadas se realizó a la segunda semana después de haber hecho la infección a la planta de cebada y que esta presentara los signos característicos de clorosis (manchas amarillas en las hojas) (Figura 9). Se recolectaron 124.91 gramos de hojas infectadas de *Hordeum vulgare* (cebada).



Signos de clorosis

**Figura 9.** Signos característicos de la infección por BMV en hojas de cebada. Se señalan con una flecha azul las manchas amarillas en las hojas.

Posteriormente, se realizó la extracción y purificación del virus de BMV a partir de las hojas infectadas recolectadas. Finalmente, la muestra con el virus nativo de BMV obtenida tras la ultracentrifugación mediante un gradiente de densidades de sacarosa se le incidió luz blanca por debajo del tubo de policarbonato que la contenía, esto reveló la banda azul correspondiente al virus nativo de BMV (Figura 10). La intensidad de esta banda es proporcional a la concentración de virus presente.



**Figura 10.** Banda azul correspondiente al BMV obtenida por ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa. Al hacer incidir luz blanca por debajo del tubo de policarbonato, que contenía la muestra con virus del BMV, se reveló una banda de color azul debido a que el virus produce dispersión por efecto Rayleigh en la luz incidente resultando esta tonalidad.

El rendimiento total que se obtuvo para BMV fue de 65 mg por 50 gramos de hojas infectadas, por lo tanto, la eficiencia fue de 1.3 mg de virus por cada gramo de hoja. Esta muestra con el BMV fue considerada óptima debido que presentó una pureza  $A_{260/280}$  dentro del intervalo establecido de 1.5 a 1.7.

Por otra parte, para la obtención de proteínas libres de BMV se eligieron alícuotas con valores de  $A_{280} \geq 0.1$  y  $A_{280/260} \geq 1.5$ , esto indicó que la concentración de proteína era adecuada con una pureza óptima. La eficiencia de purificación obtenida para las proteínas de cápside de BMV recuperada por cada miligramo de virus fue del 74.5%.

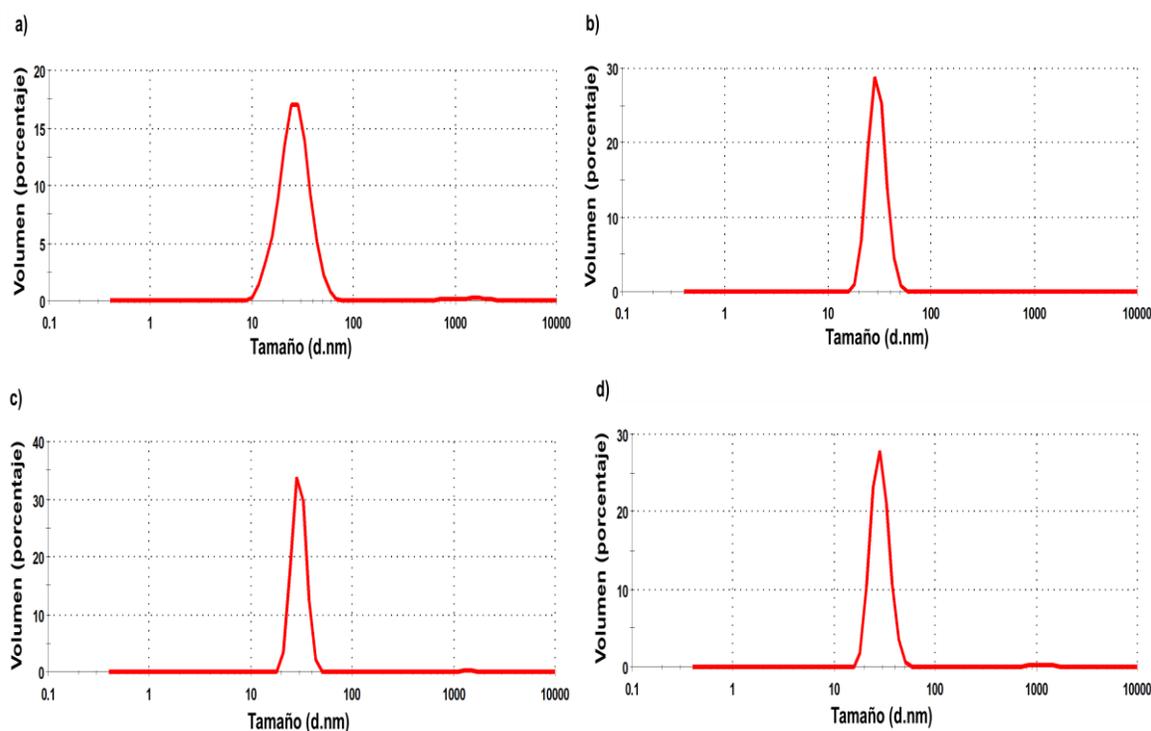
## 5.2 Encapsidación de la enzima glucocerebrosidasa (Gcase) en VLPs del BMV

Para establecer las condiciones óptimas de ensamble, inicialmente, se realizaron cuatro microensambles siguiendo las relaciones de masa (Gcase:CP) 1:3, 1:5, 1:6 y 1:8. La masa de proteína se varió mientras que se mantuvo constante la masa de la enzima glucocerebrosidasa (Gcase) la siguiente tabla 3 describe las proporciones que se emplearon.

**Tabla 3.** Proporciones de la enzima Gcase y proteína de cápside usados en los ensambles de prueba.

Relación	Enzima Gcase ( $\mu\text{g}$ )	Proteína libre de BMV ( $\mu\text{g}$ )
1:3	3.75	12
1:5	3.75	18
1:6	3.75	24
1:8	3.75	30

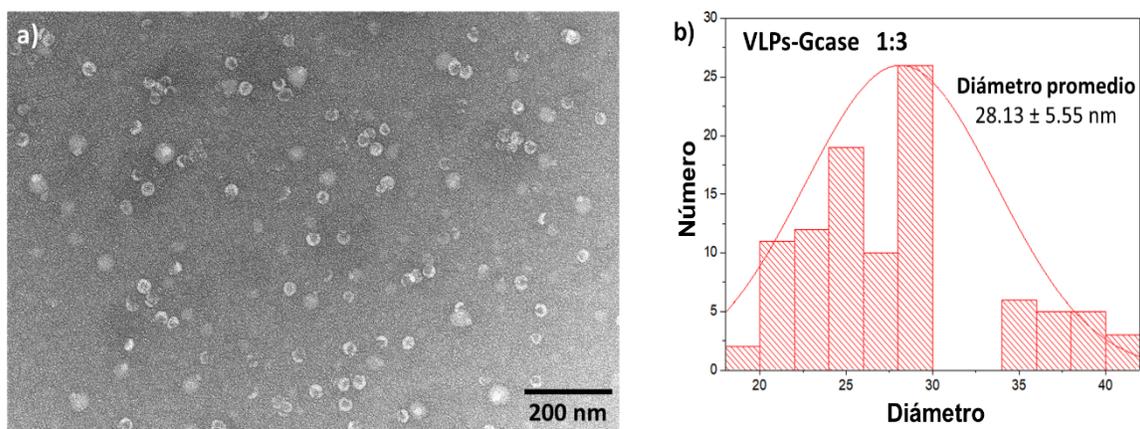
Los ensambles obtenidos de las relaciones mostradas anteriormente se analizaron por DLS para determinar su distribución de tamaño por volumen. En este análisis todas las relaciones muestran un máximo en 28.21 nm, sin embargo, se puede observar para la relación 1:3 el pico es más ancho que las otras relaciones, siendo la relación 1:6 la menos polidispersa debido a que el pico es más estrecho entre todas las relaciones de ensamble, lo que indica que hay menos variaciones de tamaño en la muestra (Figura 11).



**Figura 11.** Distribución de tamaño por volumen de las BMV-Gcase ensambladas en las relaciones: a) 1:3, b) 1:5, c) 1:6 y d) 1:8.

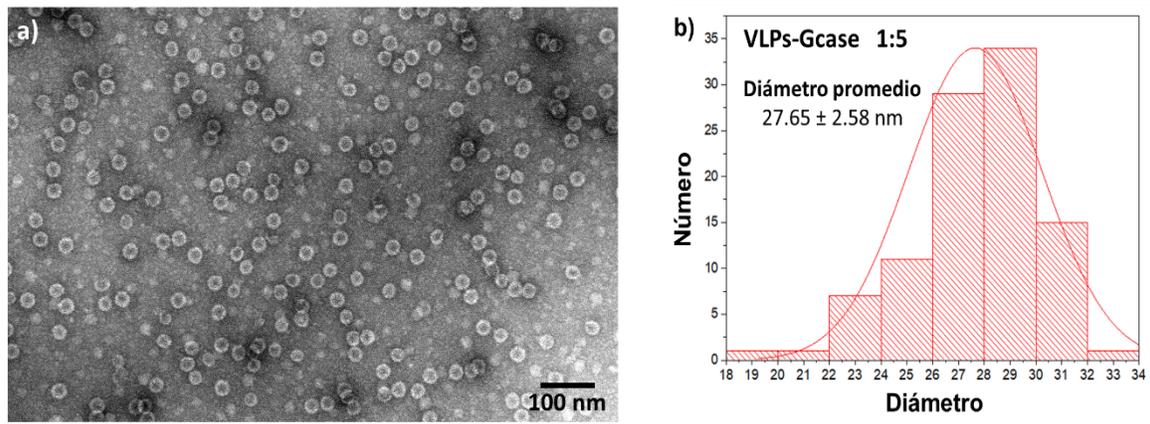
Por otro lado, estas muestras fueron visualizadas mediante microscopía electrónica de transmisión para observar la morfología obtenida y hacer una correlación con los resultados de tamaño obtenidos en DLS de las nanopartículas después del ensamble. Empleando el software ImageJ se midió el diámetro de 100 VLPs formadas en cada ensamble y con estos datos se graficó su distribución de tamaño.

En la muestra con una relación 1:3 (Figura 12) se observa una gran variedad de tamaños que engloban diámetros de 20 a 40 nm, siendo el diámetro promedio de 28.13 nm. Además, existe un número bajo de VLPs formadas para esta relación. Se observan algunas partículas incompletas, sin embargo, las VLPs formadas presentan un número de triangulación desde un intervalo de  $T=2$  hasta  $T=4$ .



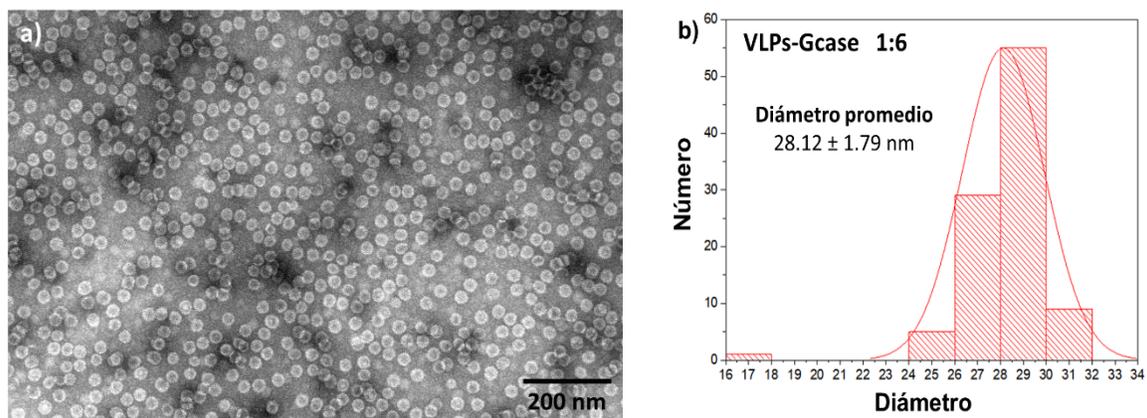
**Figura 12.** a) Micrografía electrónica a 80 kV de las BMV-Gcase ensambladas a una relación 1:3. b) Distribución de tamaño de las BMV-Gcase.

Para la relación 1:5 (Figura 13) los resultados obtenidos muestran una cantidad mayoritaria de VLPs formadas que la relación 1:3, el intervalo de diámetros es de 18 a 34 nm donde el promedio es de 27.65 nm. En esta muestra existen números de triangulación de  $T=2$  y  $T=3$  en las VLPs.



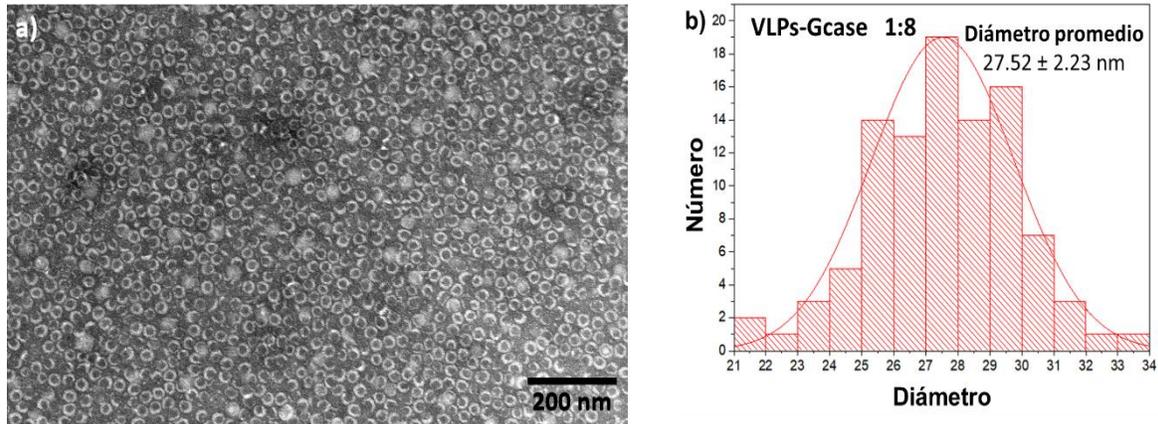
**Figura 13.** a) Micrografía electrónica a 80 kV de las BMV-Gcase ensambladas a una relación 1:5. b) Distribución de tamaño de las BMV-Gcase.

Las VLPs ensambladas a una relación 1:6 (Figura 14) presentaron una variación menor en el tamaño con un diámetro promedio de 28.12 nm comparando este diámetro con el del virus nativo del BMV se puede inferir que las nanopartículas formadas presentan una similitud con el BMV, ya que el diámetro del virus es de 28 nm. En esta muestra una población mayoritaria de VLPs presentan una geometría esférica con un número de triangulación  $T=3$ . Para esta relación existe una cantidad mayor de VLPs formadas que en las relaciones anteriores.



**Figura 14.** a) Micrografía electrónica a 80 kV de las BMV-Gcase ensambladas a una relación 1:6. b) Distribución de tamaño de las BMV-Gcase.

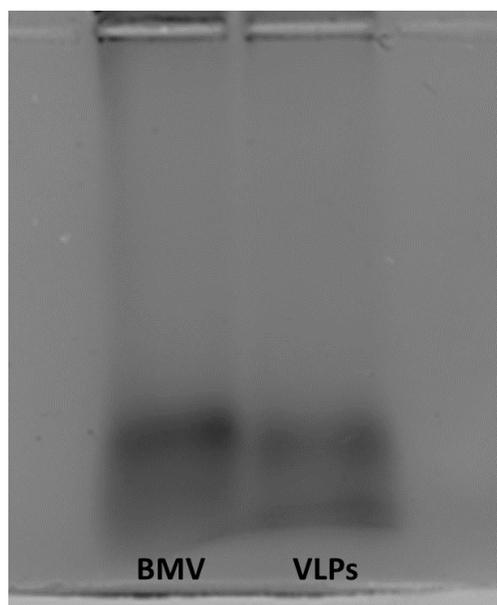
Para la última relación 1:8 (Figura 15) se observa una aglomeración de partículas, la población predominante es de 27.52 nm, existen tamaños en intervalo de 21 a 34 nm. Los números de triangulación correspondiente a las VLPs de este ensamble son de T=2 y T=3.



**Figura 15.** a) Micrografía electrónica a 80 kV de las BMV-Gcase ensambladas a una relación 1:8. b) Distribución de tamaño de las BMV-Gcase.

De acuerdo con los resultados obtenidos en DLS, TEM y los histogramas de distribución de tamaños para los ensambles de prueba se seleccionó la relación 1:6 para realizar los siguientes ensambles debido a que las VLPs que se formaron muestran un tamaño más uniforme y parecido al virus nativo del BMV, además que la morfología presente es esférica.

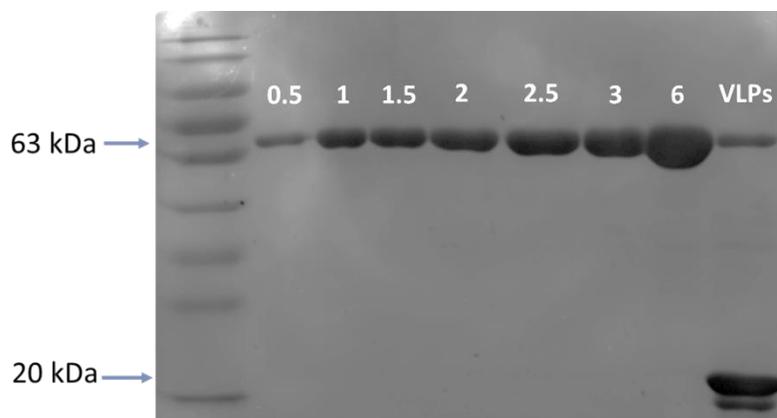
Sé realizó un ensayo de movilidad electroforética en gel de agarosa al 1% para observar la migración de las VLPs obtenidas. En el primer pozo se encuentra el control de BMV nativo y el segundo pozo corresponde al ensamble final de la enzima Gcase en las VLPs de BMV (1:6) (Figura 16). La migración de las BMV-Gcase mostró similitud a la del virus BMV por lo que se deduce que la enzima fue encapsidada exitosamente.



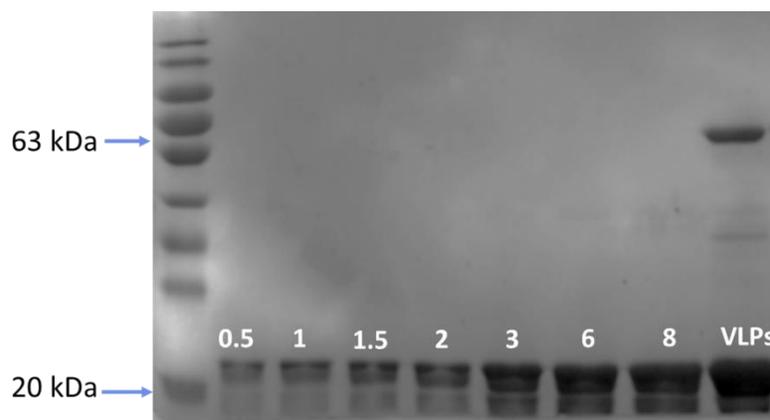
**Figura 16.** Ensayo de movilidad electroforética en gel de agarosa al 1%. Se observa una migración similar de las BMV-Gcase (VLPs) respecto al virus nativo BMV.

### 5.3 Estequiometría Gcase: Proteína de la cápside del BMV

Se elaboraron dos geles desnaturizantes de poliacrilamida, en uno de ellos se cargaron distintas cantidades de la enzima Gcase (Fig. 17), mientras que en el otro gel se depositaron distintas cantidades de proteína de la cápside del virus del BMV (Fig. 18), de esta manera fue posible determinar la cantidad de enzima Gcase encapsidada en VLPs. En el último carril de cada gel se agregó la muestra con VLPs filtradas para hacer el cálculo de su concentración de acuerdo con las intensidades de las bandas, además se cercioró la presencia de dos bandas alrededor de los 63 kDa correspondiente a la enzima Gcase y la otra aproximadamente a 20 kDa para la proteína de cápside (CP) del BMV.

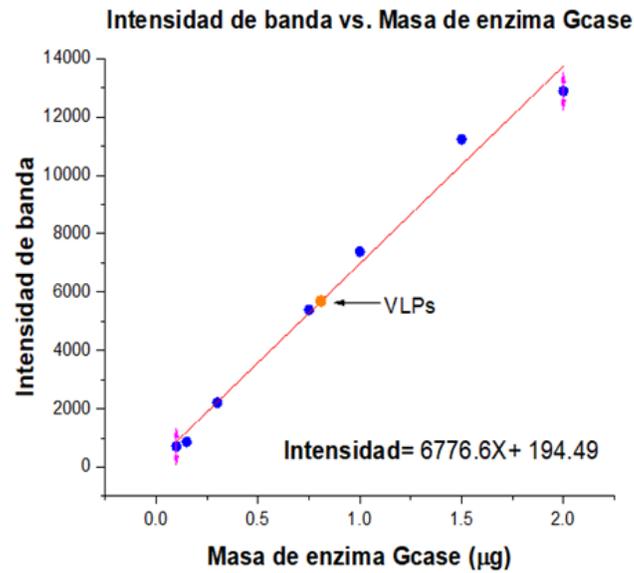


**Figura 17.** Gel desnaturizante de poliacrilamida con distintas concentraciones de enzima Gcase y en el último carril las BMV-Gcase (VLPs). En la muestra de VLPs se observa la presencia de dos bandas bien definidas correspondientes a la enzima Gcase en 63 kDa y a la proteína de cápside del BMV en 20 kDa.

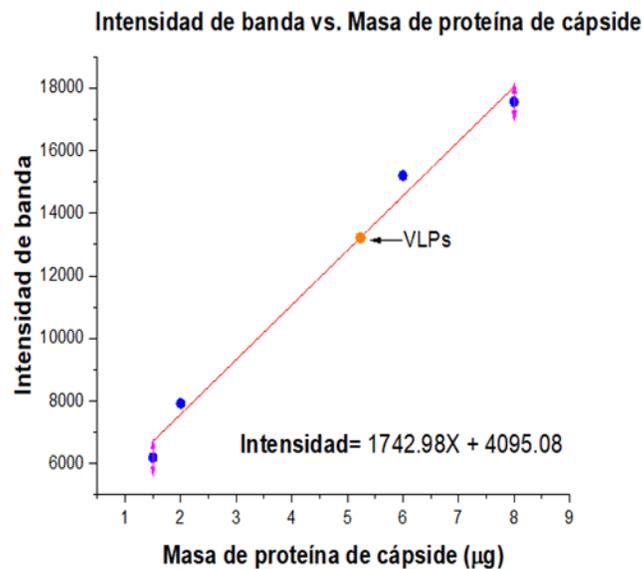


**Figura 18.** Gel desnaturizante de poliacrilamida con distintas concentraciones de proteína de la cápside del BMV y en el último carril las BMV-Gcase (VLPs). En la muestra de VLPs se observa la presencia de dos bandas bien definidas correspondientes a la enzima Gcase en 63 kDa y a la proteína de cápside del BMV en 20 kDa.

Con los resultados anteriores y utilizando el software ImageJ se determinó la intensidad de las bandas. Con estos datos y con el programa OriginPro 2017 se graficaron las relaciones de masa de enzima Gcase (Fig. 19) y proteína de cápside del BMV (Fig. 20). con la intensidad de las bandas de sus geles. En el caso de los datos obtenidos del gel con diferentes concentraciones de proteína de cápside presentaban un comportamiento no lineal de la curva, esto al considerar todos los datos, por lo que se tomó la regresión lineal entre los valores dentro del rango de la muestra de VLPs.



**Figura 19.** Relación lineal entre la intensidad de banda en función de la masa de la enzima Gcase. Los círculos azules corresponden a la intensidad de las bandas para las masas conocidas de la enzima. El círculo naranja representa la intensidad de la banda de las VLPs (BMV-Gcase).



**Figura 20.** Relación lineal entre la intensidad de banda en función de la masa de la proteína de cápside del BMV. Los círculos azules corresponden a la intensidad de las bandas para las masas conocidas de la proteína de cápside del BMV. El círculo naranja representa la intensidad de la banda de las VLPs (BMV-Gcase).

A partir de las ecuaciones de los gráficos se calcularon las relaciones de masa de la proteína de cápside del BMV y de la enzima Gcase:

$$7.79 \mu g_{CP} : 0.81 \mu g_{Gcase}$$

$$1 \mu g_{CP} : 0.11 \mu g_{Gcase}$$

De esta manera, se obtuvo la masa de proteína de cápside y enzima Gcase presentes en un volumen determinado de VLPs. A su vez, se utilizaron los pesos moleculares de la proteína de cápside (20.3 kDa) y de la Gcase (63 kDa) para calcular el número de moles presentes de la proteína de cápside y la enzima Gcase de acuerdo con las ecuaciones (5) y (6):

$$n_{BMVCP} = \frac{g_{BMVCP}}{p.m._{BMVCP}} = \# \text{ moles de BMV CP} = \frac{1 \mu g}{20.3 \times 10^3 g/mol} = 4.92 \times 10^{-11} \text{ moles de BMV CP} \quad (5)$$

$$n_{Gcase} = \frac{g_{Gcase}}{p.m._{Gcase}} = \# \text{ moles de Gcase} = \frac{0.11 \mu g}{63 \times 10^3 g/mol} = 1.75 \times 10^{-12} \text{ moles de Gcase} \quad (6)$$

Una vez que se obtuvieron estos valores, se calculó la relación molar entre la proteína de cápside y la enzima Gcase:

$$\frac{1.75 \times 10^{-12} \text{ moles de Gcase}}{4.92 \times 10^{-11} \text{ moles de BMV CP}} = 0.04 \frac{\text{moles de Gcase}}{\text{moles de BMV CP}}$$

Tenemos una relación de masa de 0.04 moles de enzima Gcase por cada mol de cápside.

Se consideró que las VLPs analizadas poseen una estructura T=3 que tiene 180 subunidades proteicas de 20.3 kDa (180 mol de CP = 1 mol de VLP), la relación molar de Gcase encapsidada por cada mol de VLPs ensambladas se determinó utilizando la siguiente ecuación (7):

$$\# \frac{\text{moles Gcase}}{\text{mol de BMV CP}} \times 180 \frac{\text{moles de BMV CP}}{\text{mol de VLP}} = \# \frac{\text{moles de Gcase}}{\text{mol de VLP}} \quad (7)$$

Por lo que finalmente tenemos  $\approx 6.4$  moles de Gcase por cada mol de VLP.

Para calcular la molaridad de confinamiento y porcentaje de ocupación, se usaron las ecuaciones 4 y 5, descritas por Tafoya Romo, (2017).

De acuerdo con los resultados obtenidos por el análisis de densitometría del gel desnaturizante de poliacrilamida tenemos  $\approx 6.4$  enzimas Gcase por cápside. El diámetro interno de la cápside se consideró de 21 nm que equivale a un volumen de  $4849.05 \text{ nm}^3$ .

$$M = \frac{(N_{enz})}{(V_{int})(N_A)} = \frac{6.4 \text{ enzimas}}{(4849.05 \text{ nm}^3)(6.022 \times 10^{23})} = 2.192 \text{ mM} \quad (8)$$

Donde M es molaridad de confinamiento,  $N_{enz}$  es el número de enzimas Gcase por cápside,  $V_{int}$  es el volumen interno de la cápside y  $N_A$  es el número de Avogadro.

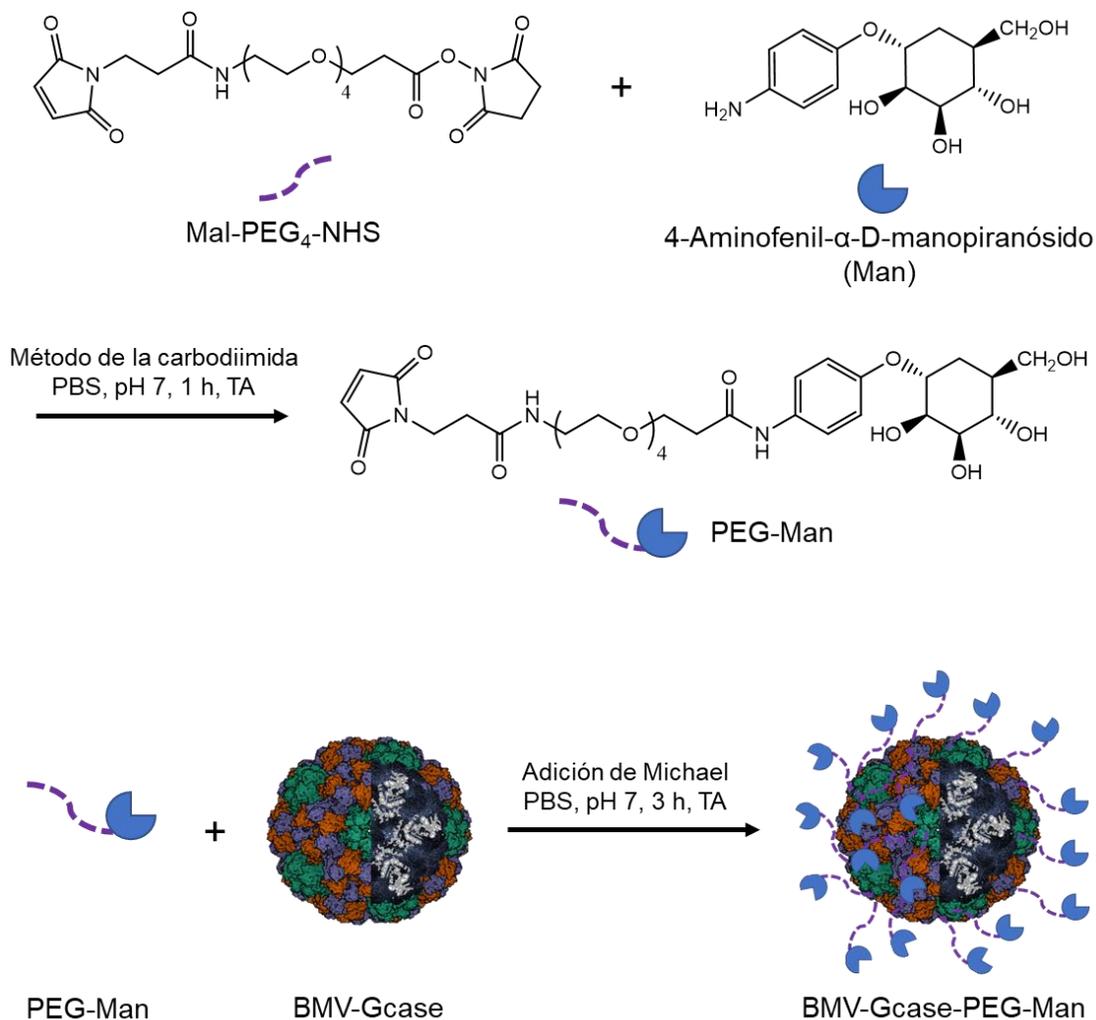
El porcentaje de ocupación fue calculado usando 4 nm como radio hidrodinámico de Gcase obteniendo un volumen de  $268.083 \text{ nm}^3$ .

$$\%Ocupación = \frac{(N_{enz})(V_{enz})(100)}{(V_{int})} = \frac{(6.4 \text{ enzimas})(268.083 \text{ nm}^3)}{(4849.05 \text{ nm}^3)} = 38.38\% \quad (9)$$

Donde  $N_{enz}$  es el número de Gcase por cápside,  $V_{enz}$  es el volumen de Gcase y  $V_{int}$  es el volumen interno de la cápside.

## 5.4 Funcionalización de las BMV-Gcase

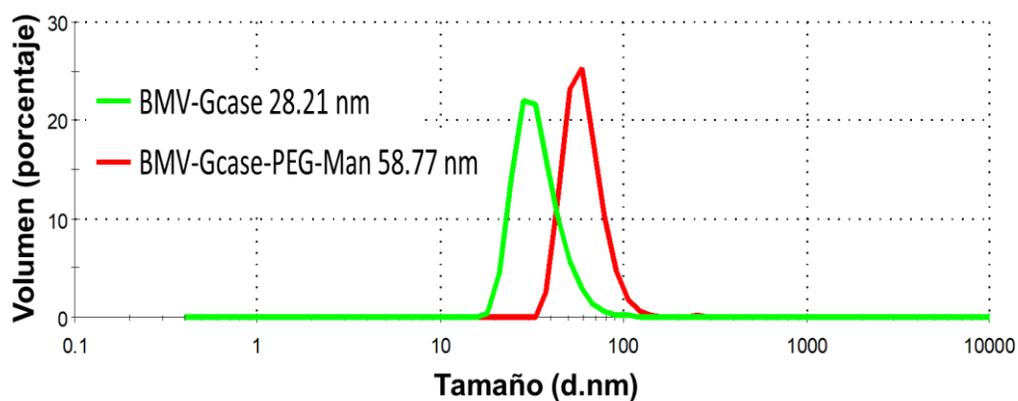
La estrategia de funcionalización sobre las BMV-Gcase inició mezclando NHS-PEG<sub>4</sub>-Mal y 4-aminofenil- $\alpha$ -D-manopiranosido acoplándose por un enlace amida por el método de la carbodiimida al paso de 1 h, posteriormente mediante la reacción de adición de Michael se conjugó este ligando mediante el grupo maleimida con los grupos amino expuestos en la superficie de las BMV-Gcase para obtener las nanopartículas BMV-Gcase-PEG-Man (Figura 21). Una vez obtenidas las nanopartículas modificadas, se prosiguió a realizar su caracterización.



**Figura 21.** Representación esquemática de la síntesis del ligando PEG-Man y la funcionalización sobre la superficie de las BMV-Gcase con este ligando.

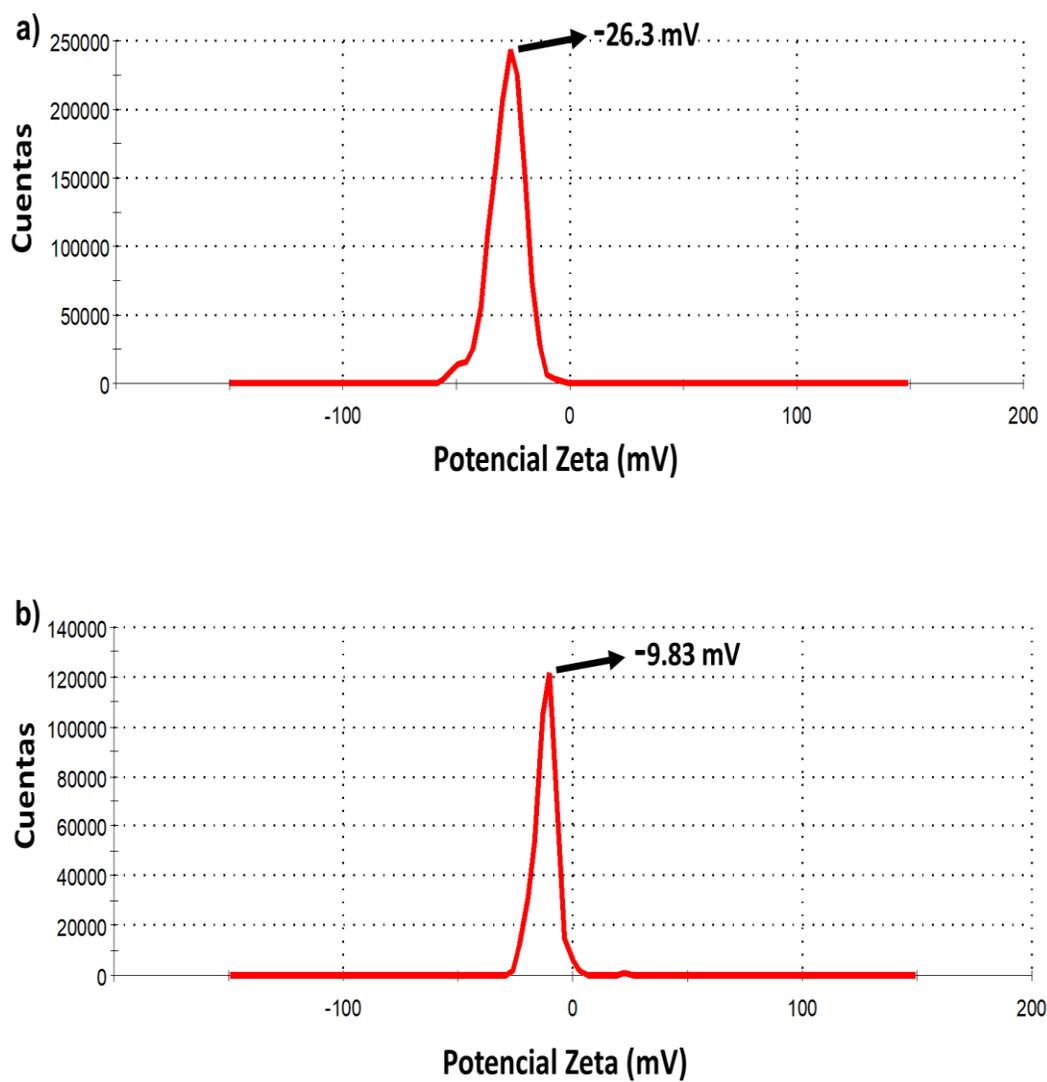
#### 5.4.1 Caracterización por dispersión dinámica de luz (DLS)

Tras la funcionalización de las BMV-Gcase con (NHS-PEG<sub>4</sub>-Mal) y el derivado de manosa, se realizó la medición de su diámetro hidrodinámico. Los resultados obtenidos mediante DLS mostraron un incremento en el tamaño de las BMV-Gcase-PEG-Man (nanopartículas funcionalizadas) de alrededor 30 nm en comparación con las BMV-Gcase (Figura 22).



**Figura 22.** Comparación en distribución de tamaño por volumen de las BMV-Gcase (verde) y BMV-Gcase-PEG-Man (rojo). Se muestra un incremento de tamaño de alrededor de 30 nm en las BMV-Gcase-PEG-Man respecto a las BMV Gcase.

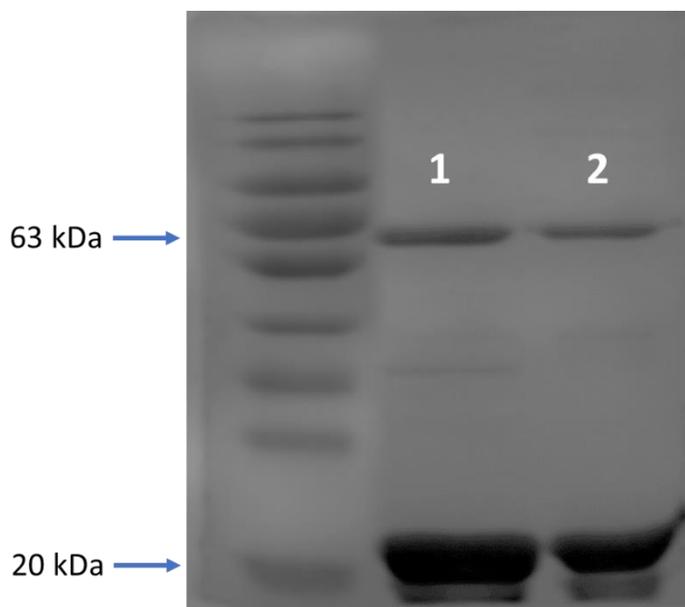
Siguiendo con la caracterización, se midió el potencial zeta para las BMV-Gcase y BMV-Gcase-PEG-Man, posteriormente con los resultados se pudo hacer una comparación de los cambios que ocurrieron tras la modificación química superficial de las VLPs., donde se observó un cambio notable en los valores, para las BMV-Gcase el potencial zeta corresponde a -26.3 mV mientras que para las BMV-Gcase-PEG-Man funcionalizadas con (NHS-PEG-Manosa) su valor es -9.83 mV (Figura 23).



**Figura 23.** Gráficos de potencial zeta para a) BMV-Gcase y b) BMV-Gcase-PEG-Man. Las mediciones se llevaron a cabo en agua desionizada, a un pH de 7. Se observa que tras la funcionalización de las BMV-Gcase estas poseen un potencial zeta menos negativo.

#### 5.4.2 Gel desnaturalizante de poliacrilamida

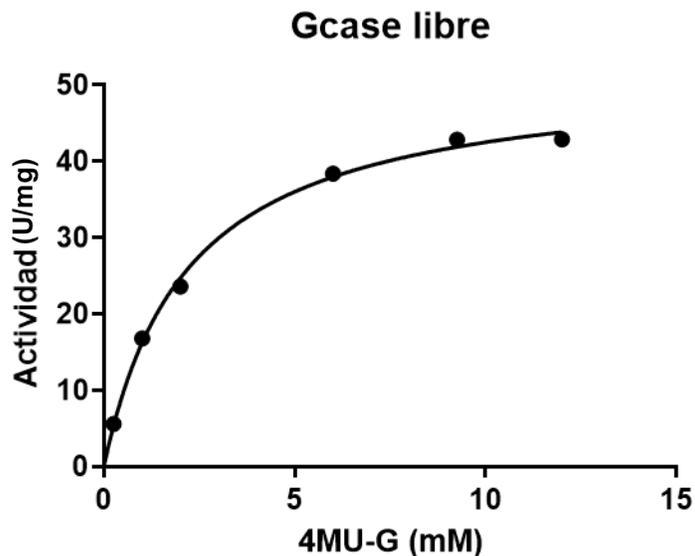
Las muestras de BMV-Gcase (carril 1) y BMV-Gcase-PEG-Man (carril 2) mediante un ensayo en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10% mostraron la presencia de dos bandas bien definidas, una correspondiente a la enzima Gcase a 63 kDa y la otra correspondiente a la proteína de cápside del BMV alrededor de los 20 kDa (Figura 24).



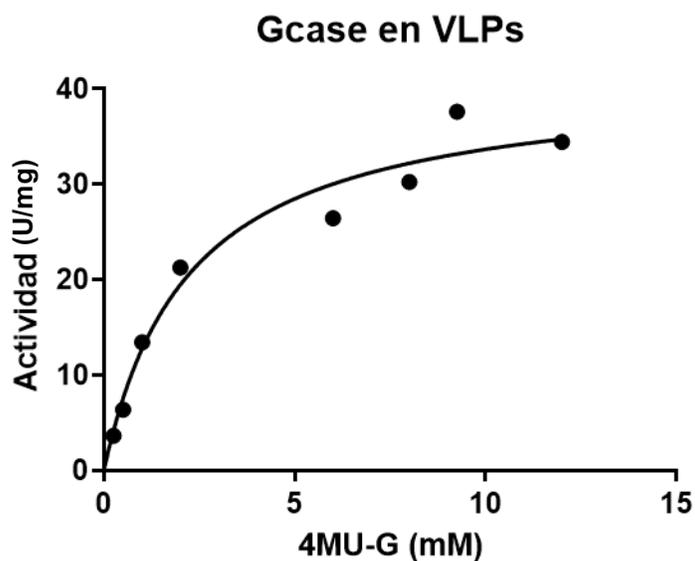
**Figura 24.** Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 10% con las BMV-Gcase en el carril 1 y BMV-Gcase PEG-Man en el carril 2. En las dos muestras se observa la presencia de dos bandas bien definidas correspondientes a la enzima Gcase a 63 kDa y a la proteína de cápside a los 20 kDa. En el caso de las BMV-Gcase-PEG-Man (carril 2) la presencia de las bandas bien definidas indica la integridad de las proteínas después de la funcionalización.

#### 5.5 Actividad enzimática de las nanopartículas con sustrato artificial

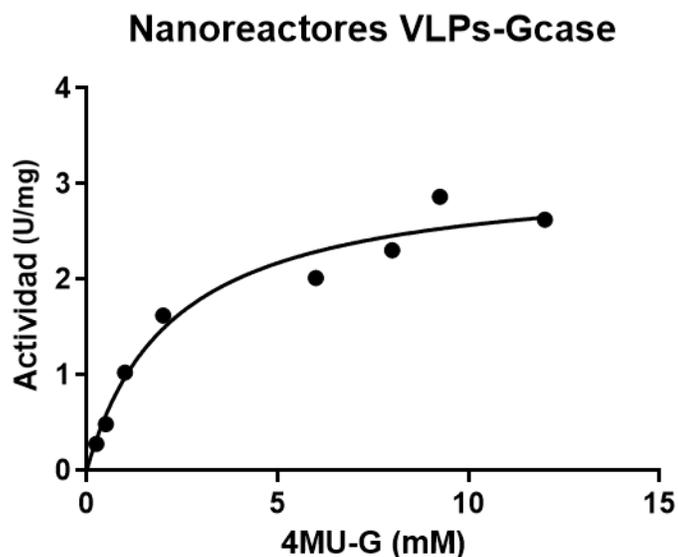
De acuerdo con los resultados obtenidos de la formación del producto 4-metilumbeliferona cuantificado por fluorescencia, en el ensayo de actividad enzimática Gcase se estimó una regresión de una hipérbola rectangular de Michaelis-Menten de la velocidad de reacción con la transformación del sustrato 4-metilumbelliferil  $\beta$ -D-glucopiranosido (4MU-G) para la enzima Gcase libre (Figura 25), la enzima Gcase en las VLPs (Figura 26) y el total de las BMV-Gcase (Figura 27).



**Figura 25.** Curva de Michaelis-Menten que corresponde a la actividad específica comparada con la concentración del sustrato artificial 4MU-G de la enzima Gcase libre. La U en la actividad se define como  $\mu\text{mole}/\text{min}$ . Los puntos en negro corresponden a los datos experimentales obtenidos por fluorescencia y la línea negra corresponde a la regresión de una hipérbola rectangular de Michaelis-Menten calculada en el software GraphPad Prism 8.



**Figura 26.** Curva de Michaelis-Menten que corresponde a la actividad específica comparada con la concentración del sustrato artificial 4MU-G de la enzima Gcase en VLPs sin funcionalizar. La U en la actividad se define como  $\mu\text{mole}/\text{min}$ . Los puntos en negro corresponden a los datos experimentales obtenidos por fluorescencia y la línea negra corresponde a la regresión de una hipérbola rectangular de Michaelis-Menten calculada en el software GraphPad Prism 8.



**Figura 27.** Curva de Michaelis-Menten que corresponde a la actividad específica comparada con la concentración del sustrato artificial 4MU-G de los nanorreactores con actividad Gcase. La U en la actividad se define como  $\mu\text{mole}/\text{min}$ . Los puntos en negro corresponden a los datos experimentales obtenidos por fluorescencia y la línea negra corresponde a la regresión de una hipérbola rectangular de Michaelis-Menten calculada en el software GraphPad Prism 8.

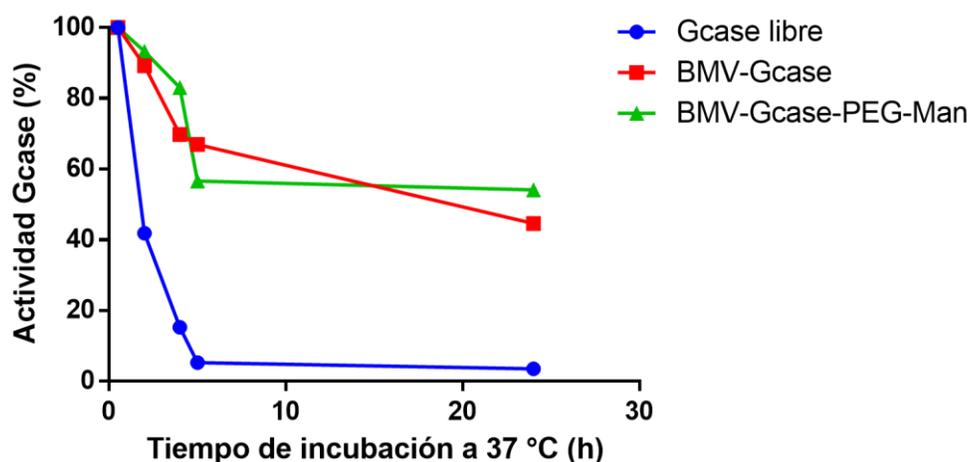
En la tabla 4 se resumen los resultados obtenidos para la constante de Michaelis-Menten  $K_m$ , velocidad máxima  $V_{\text{Máx}}$ , constante catalítica  $k_{\text{cat}}$  y eficiencia catalítica  $k_{\text{cat}}/K_m$  en el ensayo de actividad enzimática para la enzima Gcase libre, la cantidad de enzima encapsidada y para la cantidad total de nanorreactores con actividad Gcase utilizados en el ensayo. El peso molecular de la enzima es de 63 kDa por lo que 1 mg corresponde a 15.87 pmol. La eficiencia catalítica ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) de la enzima Gcase libre comparada con la Gcase encapsidada en VLPs fue mínimamente mayor.

**Tabla 4.** Constantes de Michaelis-Menten, velocidad máxima, constante catalítica y cociente  $k_{\text{cat}}/K_m$  de la enzima Gcase libre y enzima en VLPs y las BMV-Gcase.

	$K_m$ (mM)	$V_{\text{Max}}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$ )
Gcase libre	2.20	$51.88 \times 10^{-6}$	3242.5	1473.9
Enzima en VLPs	2.23	$41.2 \times 10^{-6}$	2596.1	1162.6
BMV-Gcase	2.23	$3.14 \times 10^{-6}$	197.9	88.6

## 5.6 Evaluación de la estabilidad de las nanopartículas

En la evaluación de la estabilidad de la enzima libre Gcase y las BMV-Gcase y las BMV-Gcase-PEG-Man (Funcionalizadas) a una temperatura de 37°C y un pH = 7.4 en amortiguador de fosfatos (PBS) para simular condiciones fisiológicas se observó que las BMV-Gcase y BMV-Gcase-PEG-Man mostraron una tendencia similar de pérdida de actividad en función del tiempo, manteniendo el 50% de su actividad al cabo de 24 h mientras que la enzima Gcase libre perdió alrededor de 60% de su actividad después de 30 min de incubación, eventualmente se condujo a su inactivación después de 5 h (Figura 28).



**Figura 28.** Gráfico de la pérdida de la actividad enzimática de la enzima Gcase libre, las BMV-Gcase y las BMV-Gcase-PEG-Man a diferentes tiempos de incubación en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.4 y 37°C.

## Capítulo 6. Discusión

---

En este proyecto fue necesario la obtención y purificación del virus nativo del BMV, este procedimiento se realizó aproximadamente en 6 semanas. El rendimiento obtenido en la producción de virus del BMV fue similar a lo reportado anteriormente por Ramírez (2020). Se sembraron 10 semillas de cebada germinadas en cada maceta, y después de aproximadamente 2 semanas fueron inoculadas con el virus nativo de BMV, se cosecharon las hojas que contenían el virus 3 veces.

De las hojas infectadas para la purificación de BMV, se obtuvo un rendimiento de 1.3 mg de virus por cada gramo de hoja infectada.

Para determinar la posibilidad de encapsidación de la enzima Gcase con proteínas de la cápside del BMV, por interacción electrostática, se midió el potencial zeta de la enzima Gcase en soluciones amortiguadoras con diferentes pH. La finalidad de esto fue de conocer el punto isoeléctrico de la enzima (mismo número de cargas positivas y cargas negativas). El valor del punto isoeléctrico puede inferir si el ensamble de las VLPs será favorable con dicho *cargo*, debido a que es necesario que la molécula de interés a encapsidar esté cargada negativamente para que exista una atracción electrostática entre la parte N-terminal de la proteína de cápside y la molécula *cargo* (Cadena-Nava et al. 2012; Tsvetkova & Dragnea 2015). Se encontró que el punto isoeléctrico de la Gcase es a un pH=5, por lo que a un pH mayor la carga efectiva de la proteína es negativa y a un pH=7 el potencial zeta de la enzima es -17.8 mV, por lo que a un pH=7.4 en el que se realiza el ensamble, la enzima tendrá carga negativa y será atraída electrostáticamente hacia la parte N-terminal de la proteína de cápside del virus, promoviendo de esta manera su posible encapsidación por el método de autoensamble descrito por Cadena-Nava et al. (2012). La estimación teórica del número de enzimas posibles a encapsidar en una cápside viral con número de triangulación T=3 es de aproximadamente 12, considerando el diámetro hidrodinámico de la enzima que es de  $\approx 8$  nm y el diámetro interno del BMV que es aproximadamente de 21 nm, esta aproximación se realizó suponiendo una geometría esférica de la enzima.

De acuerdo con los parámetros de diámetro y peso molecular de la enzima y la proteína de cápside se establecieron diferentes razones en masa para realizar los ensayos de encapsidación.

Considerando una relación de 12 moléculas por cápside se realizaron ensambles de prueba por medio de microdiálisis con la finalidad de seleccionar la mejor relación de encapsidación entre la enzima glucocerebrosidasa y proteína de cápside del BMV. El diámetro hidrodinámico obtenido mediante dispersión dinámica de luz para estos ensambles de prueba fue en promedio de alrededor de 28 nm, siendo la relación 1:3 la que presentó el pico más ancho y la relación 1:6 el pico más estrecho, esto sugiere la existencia de polidispersidad en los tamaños de las partículas formadas y una población de partículas más uniforme, respectivamente. Este resultado coincide con lo reportado para otras moléculas tal como el ARN que es uno de los polímeros naturales con mayor densidad de carga (Cadena-Nava et al. 2012), en donde se requiere una relación en masa de 1:6 de RNA: CP.

Las micrografías de TEM sustentan los resultados obtenidos por DLS. Para las relaciones de masa 1:3 y 1:8 existe una alta polidispersión mientras que para las relaciones 1:5 y 1:6 existen nanopartículas con distribución de tamaño uniforme, además en la relación 1:8 se observan abundantes VLPs vacías y aglomeradas, siendo la relación 1:6 la que presentó la mejor distribución debido a un menor intervalo de variación en el tamaño y con el mayor número de nanopartículas formadas de tamaño alrededor de 28 nm que era lo esperado debido a que es el tamaño del virus nativo BMV, por lo tanto, esta fue la relación empleada en los posteriores ensambles. Por otra parte, el gel nativo de agarosa del ensamble a una razón 1:6 mostró una movilidad electroforética similar al virus nativo del BMV, sugiriendo el correcto ensamble de las VLPs.

Para tener conocimiento de cuánta enzima fue encapsidada en las VLPs se realizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida para posteriormente determinar las proporciones entre la enzima y proteína de cápside a través de densitometría que se realiza tras el análisis de la intensidad de las bandas en los geles. Para ello, se utilizaron concentraciones ascendentes de enzima y de la proteína de cápside que permitieron establecer una relación lineal entre la intensidad de la banda y la concentración de la enzima y proteína de cápside. Con esta relación se determinó que por 1  $\mu\text{g}$  de proteína de cápside se encapsidaron 0.11  $\mu\text{g}$  de enzima Gcase. Por lo tanto, se encuentran 6.4 moléculas de enzima Gcase por cápside. Una de las atribuciones por las que fueron pocas moléculas de enzima Gcase encapsidadas pudo ser debido a su estructura ocasionando un impedimento estérico.

Estos resultados muestran también un desbalance entre las cargas de la cápside y la enzima. La proteína de cápside posee 9 cargas  $e^+$  en N-terminal e interactúan con 3 moléculas de Gcase que poseen 2 cargas  $e^-$ . Esto implica 1620 cargas  $e^+$  en el interior de la cápside de la VLP contra 16 cargas  $e^-$  con las que contribuyen 8 moléculas encapsidadas de la enzima Gcase. Sin embargo, las interacciones electrostáticas entre proteína-proteína son esenciales ya que favorecen la formación de la VLP y finalmente promueven su estabilidad.

En la enfermedad de Gaucher el sustrato glucocerebrósido se acumula en los macrófagos de diferentes tejidos, estudios previos determinaron que la ruta principal de internalización de la enzima Gcase es a través de los receptores de manosa en macrófagos (Sato & Beutler, 1993) es por esto que se eligió 4-aminofenil- $\alpha$ -D-manopiranosido como ligando selectivo debido a su alta especificidad hacia los receptores de manosa en macrófagos al contener un grupo de manosa y además posee un grupo amino activo para la funcionalización de los nanorreactores. Por otro lado, La existencia de un gran número de grupos amino y carboxilo en la superficie de las VLPs permite funcionalizar estas partículas activando estos grupos, en este caso los grupos que se activaron fueron los amino mediante el derivado de manosa.

Se utilizó PEG multifuncional como enlazador. La utilización de PEG también permite el control sobre un reconocimiento inespecífico y aún más importante reduce la respuesta inmunogénica a los nanorreactores. La Pegilación de sistemas de liberación de fármacos con PEG ha sido una herramienta empleada frecuentemente ya que impide un reconocimiento del sistema inmune de los organismos (efecto camuflaje). El PEG un polímero soluble en agua y no iónico por lo que es estable en plasma sanguíneo y evita la fagocitosis al no interactuar con proteínas específicas en este proceso celular. Además, el PEG aumenta el tamaño hidrodinámico de los sistemas a los que se enlaza lo que prolonga el tiempo en la circulación sanguínea evitando la excreción del organismo (Knop et al., 2010). Se empleó NHS-PEG<sub>4</sub>-Mal debido que es un enlazador heterobifuncional ya que posee un grupo reactivo diferente en cada terminación, esto permite una conjugación en dos pasos y así minimizar una aglomeración o polimerización indeseable. Sabiendo esto, se realizó primeramente la mezcla del PEG bifuncional con el derivado de manosa 4-aminofenil- $\alpha$ -D-manopiranosido debido a que el sitio -NHS (N-hidroxisuccinimida) en el PEG reacciona con mayor rapidez con grupos amino de esta manera se asegura que el derivado de manosa se enlaza covalentemente con el PEG mediante el -NHS, a esta reacción se le conoce como método de la

carbodiimida. Por otra parte, el grupo maleimida tiene alta afinidad por grupos tiol, pero en ausencia de ellos y a un pH mayor a 7 reacciona con grupos amino. Sabiendo esto, se llevó a cabo la reacción de adición entre el grupo maleimida terminal en el PEG con los grupos amino que se encuentran en la superficie de las VLPs (Fig. 21).

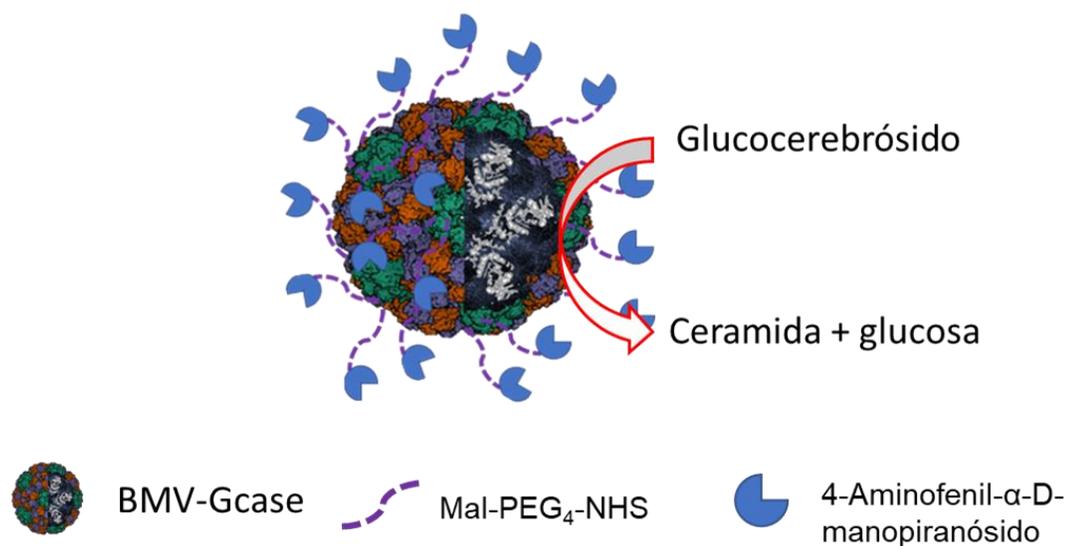
Las observaciones realizadas por DLS tras la funcionalización de las VLPs muestran que su diámetro hidrodinámico incremento aproximadamente 30 nm y que el potencial zeta es más positivo, el diámetro hidrodinámico depende en gran medida de las propiedades químicas de la superficie, por lo que este cambio en las BMV-Gcase-PEG-Man anticipa una funcionalización exitosa. En el caso del gel desnaturalizante de poliacrilamida se observa la presencia de las bandas correspondientes a la enzima y la proteína de cápside bien definidas en el peso molecular esperado lo cual indica la integridad de las proteínas después de la funcionalización.

Por lo que respecta al ensayo de actividad enzimática, se cuantificó esta propiedad tanto de la enzima Gcase libre, así como de la enzima encapsidada en VLPs. En este análisis, encontramos que el sustrato es ligeramente más afín a la enzima Gcase en forma libre ( $K_M = 2.20$ ) que cuando la enzima está en forma encapsidada ( $K_M = 2.23$ ), pero la diferencia no es significativa. Este punto es importante ya que nos muestra que la accesibilidad del sustrato al interior de la cápside no se ve afectada. Por lo tanto, los resultados indican no hay limitaciones de transferencia de masa en los nanorreactores. La actividad catalítica de los nanorreactores BMV-Gcase fue de 78.9% comparada con la de la enzima Gcase libre. Esta disminución en la actividad en la enzima encapsidada puede deberse al confinamiento de las moléculas de enzima y que no todas tengan acceso al sustrato.

En el tratamiento de la enfermedad de Gaucher la enzima  $\beta$ -glucocerebrosidasa (Gcase) es administrada vía intravenosa, por lo tanto, la enzima debería retener su actividad en la circulación sanguínea hasta que sea internalizada por las células diana y sea activada en el pH ácido del lisosoma. Por ello, fue importante evaluar la actividad enzimática de la enzima libre Gcase y las VLPs con y sin funcionalización después de la incubación de las muestras a una temperatura de 37 °C y un pH 7.4 a diferentes intervalos de tiempo. La información obtenida es significativa dado que se puede obtener una idea de la estabilidad de la proteína de la cápside que compone a las VLPs, en el caso de ser administradas a través de la vía intravenosa, considerando que la VLP tiene que permanecer un tiempo en la circulación sanguínea hasta que los ligandos sean reconocidos por los

macrófagos. La enzima Gcase después de su encapsidación mejoró la estabilidad en estas condiciones por lo que se puede asumir que se podrá obtener una vida media de circulación sanguínea más alta que mejorará significativamente la absorción y reducirá la necesidad de inyecciones múltiples que eventualmente resultarán en un menor costo de la terapia. Además, la estabilidad de la enzima Gcase encapsidada mejoró en  $\approx 15$  veces más en comparación de la enzima Gcase libre.

Debido a la temperatura y el pH en el que se llevó a cabo el ensayo puede que la enzima libre haya sufrido un cambio en su estructura porque perdió alrededor del 60% de su actividad a los tan solo 30 min de incubación. En cambio, para las enzimas en las VLPs con y sin funcionalización mantuvieron el 50% de su actividad al cabo de 24 h lo que comprueba que las proteínas de cápside sirven de protección evitando la degradación de la enzima cargo. Estos resultados demuestran que las partículas son estables en condiciones fisiológicas y por lo tanto pueden servir como un excelente nanorreactor con actividad Gcase (Figura 29) para administrar vía intravenosa la enzima Gcase.



**Figura 29.** Representación esquemática de un nanorreactor de VLPs del BMV con actividad Gcase y funcionalizado con NHS-PEG<sub>4</sub>-Mal y 4-aminofenil- $\alpha$ -D-manopiranosido. En la imagen, se muestra la transformación del sustrato glucocerebrósido a ceramida y glucosa por la enzima Gcase.

## Capítulo 7. Conclusiones

---

Se concluye que en este proyecto se logró exitosamente la síntesis de nanorreactores con actividad  $\beta$ -glucocerebrosidasa.

Por medio de la correlación del tamaño de las VLPs determinado por TEM y DLS con densitometría obtenida de la electroforesis en geles desnaturalizantes, se determinó que por cada VLP se encapsidaron alrededor de 6.4 moléculas de la enzima Gcase.

Además, fue posible funcionalizar con NHS-PEG-Mal y el derivado de manosa la superficie exterior de las VLPs mediante una conjugación covalente en dos pasos. Lo anterior, fue corroborado por medio de DLS. Los análisis de DLS para las VLPs con o sin funcionalización determinaron la diferencia en el potencial zeta de 16.47 mV y el incremento de aproximadamente 30 nm en el diámetro de los nanorreactores funcionalizados.

Así también las VLPs mostraron una muy buena actividad enzimática, las constantes de Michaelis-Menten para la enzima Gcase libre ( $K_M=2.20$  mM) y para la enzima encapsidada en VLPs ( $K_M=2.23$  mM). La eficiencia de actividad de la enzima en VLPs fue del 78.9% respecto a la enzima Gcase libre.

En condiciones fisiológicas protegiendo a la enzima de posible degradación y manteniendo su actividad en un 50% después de 24 h. La estabilidad de la enzima Gcase encapsidada mejoró en aproximadamente 15 veces más en comparación de la enzima Gcase libre en estas condiciones.

Estos nanorreactores obtenidos pueden ser aprovechados para la implementación de la terapia de reemplazo enzimático en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher, sin embargo, futuros experimentos deben realizarse para la validación e internalización de nanorreactores con actividad Gcase para su administración vía intravenosa. Finalmente es de importancia destacar que de acuerdo con nuestro conocimiento este es el primer trabajo en donde se encapsida la enzima Gcase en partículas tipo virus.

## Literatura citada

---

- Ahmed, F., & Discher, D. E., 2004. Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL: Hydrolysis-triggered controlled release vesicles. *Journal of Controlled Release*, 96(1), 37–53. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.12.021>
- Bennett, L. L., & Mohan, D., 2013. Gaucher disease and its treatment options. *Annals of Pharmacotherapy*, 47(9), 1182–1193. <https://doi.org/10.1177/1060028013500469>
- Beutler, E., 1992. Gaucher disease: New molecular approaches to diagnosis and treatment. *Science*, 256(5058), 794–799. <https://doi.org/10.1126/science.1589760>
- Beutler E., Kay A., Saven A., Gamer P., Thurston D., Dawson A, & B. Rosenbloom, 2009. *Enzyme replacement therapy for Gaucher disease*. 1183–1189.
- Brumshtein, B., Salinas, P., Peterson, B., Chan, V., Silman, I., Sussman, J. L., ... Futerman, A. H., 2010. Characterization of gene-activated human acid- $\beta$ -glucosidase: Crystal structure, glycan composition, and internalization into macrophages. *Glycobiology*, 20(1), 24–32. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp138>
- 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., Arun, A., Singh, S., Manohar, M., Chuttani, K., Konwar, R., ... Datta, A., 2016. Bivalent Approach for Homodimeric Estradiol Based Ligand: Synthesis and Evaluation for Targeted Theranosis of ER(+) Breast Carcinomas. *Bioconjugate Chemistry*, 27(4), 961–972. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00024>
- Chauhan, K., Meza, J. M. H., Hernández, A. G. R., & Moreno, K. J., 2018. Multifunctionalized biocatalytic P22 nanoreactor for combinatory treatment of ER + breast cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0345-2>
- Dean, S. N., Turner, K. B., Medintz, I. L., & Walper, S. A., 2017. Targeting and delivery of therapeutic enzymes. *Therapeutic Delivery*, 8(7), 577–595. <https://doi.org/10.4155/tde-2017-0020>
- Douglas, T., & Young, M., 1998. Host-guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages. *Nature*, 393(6681), 152–155. <https://doi.org/10.1038/30211>
- Escobedo Rodríguez D. A., 2018. *Nanovehículos para insulina*. Tesis de maestría. Centro de

Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.

- Fowler, A. M., Clark, A. S., Katzenellenbogen, J. A., Linden, H. M., & Dehdashti, F., 2016. Imaging Diagnostic and Therapeutic Targets: Steroid Receptors in Breast Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, 57(Supplement\_1), 75S-80S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.157933>
- Franco-Ornelas, S., & Grupo de Expertos en Enfermedad de Gaucher., 2010. Consenso Mexicano de Enfermedad de Gaucher. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 48(2), 167–186. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2010/im102j.pdf>
- García Díaz, J. D., Mesa Latorre, J. M., Corps Fernández, D., & Valbuena Parra, A., 2016. Enfermedades por depósito lisosomal. *Medicine (Spain)*, 12(19), 1072–1081. <https://doi.org/10.1016/j.med.2016.09.020>
- Hruska, K. S., LaMarca, M. E., Scott, C. R., & Sidransky, E., 2008. Gaucher disease: Mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Human Mutation*, 29(5), 567–583. <https://doi.org/10.1002/humu.20676>
- Instruments, M. Manual: Zetasizer Nano user manual. , (Man0317-5.0) inc addendum - (26-05-10) §, 2009.
- Khan, M., Emmadisetty, S., Yasmeen, A., & Zaman, S., 2017. Gaucher's Disease: Prenatal and Post Natal Diagnostic Dilemma and Biochemical Aid - Case Series and Review of Literature. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 19(5), 1–11. <https://doi.org/10.9734/BJMMR/2017/29680>
- Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., & Schubert, U. S., 2010. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: Pros and cons as well as potential alternatives. *Angewandte Chemie - International Edition*, 49(36), 6288–6308. <https://doi.org/10.1002/anie.200902672>
- Koyani, R., Pérez-Robles, J., Cadena-Nava, R. D., & Vazquez-Duhalt, R., 2017. Biomaterial-based nanoreactors, an alternative for enzyme delivery. *Nanotechnology Reviews*, 6(5), 405–419. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2016-0071>
- Lucas, R. W., Kuznetsov, Y. G., Larson, S. B., & McPherson, A., 2001. Crystallization of brome mosaic virus and T = 1 brome mosaic virus particles following a structural transition. *Virology*, 286(2), 290–303. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0897>
- Motabar, O., Goldin, E., Leister, W., Liu, K., Southall, N., Huang, W., ... Zheng, W., 2012. A high throughput glucocerebrosidase assay using the natural substrate glucosylceramide. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(2), 731–739. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5496-z>
- Narayanan, K. B., & Han, S. S., 2017. Icosahedral plant viral nanoparticles - bioinspired synthesis of nanomaterials/nanostructures. *Advances in Colloid and Interface Science*, 248, 1–19.

<https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.08.005>

Nuñez R., 2020. *CCMV y BMV como potenciales nanovehículos en tratamientos contra el cáncer de mama*. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México.

O. González-Davis, K. Chauhan, R. V.-D. 2019. Pharmaceutical Biocatalysis. In P. Grunwald 1st ed., Jenny Stanford publishing, New York. ch. 18 pp. 637-671. <https://doi.org/10.1201/9780429295034>

Peabody, D. S., 2003. A viral platform for chemical modification and multivalent display. *Journal of Nanobiotechnology*, 1, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-1-5>

Ramírez Acosta K. 2020. *Desarrollo de un sistema antimicrobiano basado en nanopartículas tipo virus*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.

Sato, Y., & Beutler, E., 1993. Binding, internalization, and degradation of mannose-terminated glucocerebrosidase by macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 91(5), 1909–1917. <https://doi.org/10.1172/JCI116409>

Sengar, P., García-Tapia, K., Can-Uc, B., Juárez-Moreno, K., Contreras-López, O. E., & Hirata, G. A. 2019. Simultaneous paramagnetic and persistence-luminescence in GAGG:Ce,Pr nanoparticles synthesized by sol-gel for biomedical applications. *Journal of Applied Physics*, 126(8). <https://doi.org/10.1063/1.5098788>

Sengar, P., Garcia-Tapia, K., Chauhan, K., Jain, A., Juarez-Moreno, K., Borbón-Nuñez, H. A., ... Hirata, G. A. 2019. Dualphotosensitizer coupled nanoscintillator capable of producing type I and type II ROS for next generation photodynamic therapy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 536, 586–597. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.090>

Sengar, P., Juárez, P., Verdugo-Meza, A., Arellano, D. L., Jain, A., Chauhan, K., ... Fournier, P. G. J. 2018. Development of a functionalized UV-emitting nanocomposite for the treatment of cancer using indirect photodynamic therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0344-3>

Stirnemann, J. Ô., Belmatoug, N., Camou, F., Serratrice, C., Froissart, R., Caillaud, C., ... Berger, M. G., 2017. A review of gaucher disease pathophysiology, clinical presentation and treatments. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms18020441>

Tsvetkova, I. B., & Dragnea, B. G., 2015. Encapsulation of Nanoparticles in Virus Protein Shells. In *Protein Cages* (pp. 2–3). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2131-7>

- Vriezema, D. M., Aragonès, M. C., Elemans, J. A. A. W., Cornelissen, J. J. L. M., Rowan, A. E., & Nolte, R. J. M., 2005. Self-assembled nanoreactors. *Chemical Reviews*, 105(4), 1445–1489. <https://doi.org/10.1021/cr0300688>
- Wilkerson, J. W., Yang, S. O., Funk, P. J., Stanley, S. K., & Bundy, B. C., 2018. Nanoreactors: Strategies to encapsulate enzyme biocatalysts in virus-like particles. *New Biotechnology*, 44(April), 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.04.003>
- Williams, D. B., & Carter, C. B., 2009. Transmission electron microscopy: A textbook for materials science. In *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-76501-3>
- Xu, X., Costa, A., & Burgess, D. J., 2012. Protein encapsulation in unilamellar liposomes: High encapsulation efficiency and a novel technique to assess lipid-protein interaction. *Pharmaceutical Research*, 29(7), 1919–1931. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0720-x>
- Yoo, J., Irvine, D. J., Discher, D. E., & Mitragotri, S., 2011. *Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers*. 10(July). <https://doi.org/10.1038/nrd3499>
- Zarco-roman, J., 2011. Gaucher disease in Mexico. Epidemiologic overview. *Acta Pediátrica de México*, 32(5), 277–280. <https://doi.org/10.18233/APM32No5pp277-280>
- Zhang, Y., Dong, Y., Zhou, J., Li, X., & Wang, F., 2018. Application of plant viruses as a biotemplate for nanomaterial fabrication. *Molecules*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/molecules23092311>