

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



**Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida
con orientación en Biotecnología Marina**

**Encapsidación del ARNm de la Granzima B de humano en
partículas tipo virus del CCMV**

Tesis

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

Presenta:

Kee Whun Leo Dan Avila

Ensenada, Baja California, México
2016

Tesis defendida por

Kee Whun Leo Dan Avila

y aprobada por el siguiente comité:

Dr. Marco Antonio De León Nava
Director

Dr. Rubén Darío Cadena Nava

Dr. Alejandro Huerta Saquero

Dra. Kristina Marie Herbert

Dra. Mónica Elizabeth Tentori Espinosa



Autoridades

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Biotecnología Marina

Dra. Rufina Hernández Martínez
Director de Estudios de Posgrado

Kee Whun Leo Dan Avila © 2016

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso del autor

Resumen de la tesis de **Kee Whun Leo Dan Avila**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Encapsidación del ARNm de la Granzima B de humano en partículas tipo virus del CCMV

Resumen aprobado por:

Dr. Marco Antonio De León Nava
Director de tesis

Las aplicaciones nanotecnológicas de los virus se ven involucradas en áreas tan diversas como el desarrollo de nanomateriales y la nanomedicina. Hoy en día se emplean estas partículas en una gran diversidad de formas que van desde su uso como nanocontenedores para la protección del cargo hasta la entrega a regiones específicas de moléculas terapéuticas a tejidos de interés. En este estudio utilizamos una característica presente en varios virus, la capacidad de autoensamblarse *in-vitro*, y encapsidar ARN de cadena sencilla (ssRNA), en el presente trabajo se enfocó en el uso de un ssRNA: ARN mensajero (ARNm) de la proteína pro-apoptótica Granzima B (GzmB) de humano. La GzmB es una enzima proteolítica expresada principalmente en células asesinas naturales (NK) y linfocitos T citotóxicos (CTLs). Ésta se encarga de inducir apoptosis en células blanco que experimenten alteraciones fenotípicas, como células malignas o infectadas por patógenos intracelulares. En este estudio se utilizó la proteína de la cápside (CP) del virus de la clorosis moteada del caupí (CCMV) para formar partículas tipo virus (VLPs) y que tuvieran como cargo el ARNm de la Granzima B de humano.

Tras la realización de diferentes ensayos de encapsidación, los resultados sugieren que la CP del CCMV es capaz de formar VLPs conteniendo el ARNm de la Granzima B de humano. El análisis de viabilidad e inducción de apoptosis en células mononucleares de mamífero en co-cultivo con CCMV y su CP demuestra la biocompatibilidad del virus y su proteína con células humanas.

Palabras clave: CCMV, VLP, Granzima, Encapsidación, Apoptosis

Abstract of the thesis presented by **Kee Whun Leo Dan Avila**, as a partial requirement to obtain the Master in Life Science with orientation in Marine Biotechnology.

Human Granzyme B mRNA encapsidation in CCMV virus-like particles

Abstract approved by:

Marco Antonio De León Nava, Ph. D.
Thesis Director

The use of viruses for the development of nanotechnological applications can be found in areas of research as diverse as nanomaterials and even nanomedicine. There have recently surged vast amounts of applications for these biological nanoparticles ranging from their use as nanocontainers for cargo protection to targeted delivery of therapeutic molecules to specific tissue. In this study we utilize a trait found in most viruses, the capability of *in vitro* self-assembly and single stranded RNA (ssRNA) encapsidation. In the work here presented we focus on the use of a specific ssRNA: messenger RNA (mRNA) of the pro-apoptotic human protein Granzyme B (GzmB). GzmB is a proteolytic enzyme mainly expressed in natural killer cells (NK) and cytotoxic T lymphocytes (CTLs). This protein is responsible for the induction of apoptosis in target cells exposing phenotypic alterations, such as malign cells or cells infected by intracellular pathogens. In this study we utilize the capsid protein (CP) from Cowpea Chlorotic Mottled Virus (CCMV) to assemble virus-like particles (VLPs) containing as cargo human Granzyme B mRNA.

After tackling various encapsidation assays, results suggest that CCMV CP is capable of forming VLPs containing human Granzyme B mRNA. Cell viability and apoptosis induction analysis of mammal mononuclear cells co-cultured with CCMV and CP, independently, demonstrate virus and protein biocompatibility with human cells.

Keywords: CCMV, VLP, Granzyme, Encapsidation, Apoptosis

Dedicatoria

Dedico mi tiempo y esfuerzo a mis padres y a mi persona, ya que sin ellos la vida como la conozco sería totalmente diferente, yo sería totalmente diferente.

Agradecimientos

A todas las personas que interactuaron conmigo en el pasado, las que interactúan actualmente y a las que interactuarán conmigo en el futuro.

A mis padres, tanto biológicos como académicos, quienes se llevan y merecen casi la totalidad del crédito.

A mis familiares directos e indirectos y amistades merecedores por igual de una gran parte de todos mis logros.

A mi pareja, mi apoyo, mi motivación, Danna Arellano; quien siempre me dice que seré capaz de cumplir todos mis “proósitos”.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por albergarme y permitirme intercambiar energía con todos los pelicanos.

Al Departamento de Innovación Biomédica (DIB) y sus integrantes por permitirme la entrada a sus diferentes áreas y tomar mi mano en tiempos de dificultad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por hacerme sentir como un puma.

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) y todos sus integrantes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por apoyarme económicamente durante mi periodo académico y experimental.

A todos mis sinodales por tanta paciencia y apoyo incondicional.

A todos los investigadores involucrados en apoyarme durante la fase del trabado experimental.

A mi director de tesis, Marco De León, por cuidarme y apoyarme durante este tiempo de craneo y Cetto intenso.

¡Gracias al equipo de Liones! ¡Woof! ¡Woof! ¡Miau! ¡Brugulugulugulu!

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimiento.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
Abreviaturas.....	x
1. Introducción.....	1
1.2 Antecedentes.....	2
1.2.1 Nanopartículas Virales.....	2
1.2.2 Encapsidación de Moléculas.....	7
1.2.3 Granzimas.....	8
2. Hipótesis.....	11
2.1 Objetivo.....	11
3. Metodología.....	12
3.1 Obtención de la CP.....	13
3.1.1 Inoculación del virus en caupí.....	13
3.1.2 Purificación del virus.....	14
3.1.3 Separación de la CP y ARN viral.....	15
3.2 Amplificación del plásmido portador del gen de la Granzima B.....	16
.....	16
3.2.1 Transformación de bacterias.....	17
3.2.2. Miniprep por lisis alcalina.....	17
3.3 Obtención del ARNm de la Granzima B.....	18
3.3.1 Preparación del ADN.....	18
3.3.2 Transcripción del gen.....	20
3.3.3 Purificación del ARNm.....	21
3.4 Encapsidación.....	22
3.4.1 Ensayos de proporción CP y ARNm.....	22
3.5 Evaluación de la viabilidad e inducción de apoptosis en PBMCs de humano.....	22
3.5.1 Estimulación y tinción multiparamétrica de citometría de flujo.....	23
4. Resultados.....	25
4.1 Obtención de la CP.....	25
4.1.1 Inoculación del virus en caupí.....	25
4.1.2 Purificación del virus.....	26
4.1.3 Separación de la CP y el ARN viral.....	26

4.2 Amplificación del plásmido con el gen de la Granzima B.....	26
4.2.1 Transformación de bacterias	26
4.2.2. Miniprep por lisis alcalina	27
4.3 Obtención del ARNm de la Granzima B.....	27
4.3.1 Preparación del ADN.....	27
4.3.2 Transcripción del gen y purificación del ARNm.....	28
4.4 Encapsidación	29
4.4.1 Ensayos de proporción CP y ARNm.....	29
4.5 Efecto del CCMV y CP en la viabilidad e inducción de apoptosis en células humanas.....	31
5. Discusión	35
6. Conclusión	39
7. Perspectivas	40
Lista de referencias bibliográficas.....	41
Anexo	46
A1. Soluciones y amortiguadores.....	46
A2. Citometría de flujo	48
A3. Efecto del CCMV y su CP sobre otras células mononucleares.	51

Lista de figuras

Figura		Página
1	Esquema de la metodología general.....	9
2	Hojas de caupí perforadas con chip.....	11
3	Estructura general del plásmido portador del gen.....	15
4	Cebadores utilizados en la modificación y amplificación del gen de la Granzima B.....	18
5	Purificación de células mononucleares de sangre periférica.....	23
6	Perforación de hoja de caupí.....	23
7	Integridad de la CP.....	24
8	Amplificación mediante la PCR para modificar el gen de interés.	26
9	Transcripción <i>in vitro</i> inicial.....	27
10	Transcripción <i>in vitro</i> utilizando gen modificado con nuevos cebadores.....	27
11	Primer resultado de encapsidación.....	28
12	Segundo resultado de encapsidación.....	29
13	Encapsidación final.....	29
14	Imagen representativa del análisis multiparamétrico básico de citometría de flujo en PBMCs.....	30
15	Viabilidad de PBMCs incubadas con CCCMV y su CP.....	31
16	Apoptosis en PBMCs incubadas con CCCMV y su CP.....	32

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Reactivos y volúmenes para la PCR.....	19
2	Condiciones del termociclador.....	19
3	Reactivos y volúmenes para la transcripción <i>in vitro</i>	20

Abreviaturas

7AAD	7-aminoactinomicina D
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CCCP	Carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona
CCMV	Virus de la clorosis moteada del caupí
CD14	Cúmulo de diferenciación 14
CP	Proteína de la cápside
CTL	Linfocito T citotóxico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligada a enzimas
EtBr	Bromuro de etidio
FBS	Suero fetal bovino
GzmB	Granzima B
Hsp70	Heat shock protein 70
LB	Luria-Bertani
LIF	Leukaemia-Inhibitory Factor
mRNA	Messenger RNA
NEB	New England Biolabs
NK	Célula asesina natural
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PE	Ficoeritrina
PEG	Polietilenglicol
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic-acid)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ssRNA	Single stranded RNA
TBE	Tris/Borato/EDTA
T _m	Temperatura de fusión
VLP	Virus-like particle
VNP	Viral nanoparticles

1. Introducción

La habilidad de controlar y dirigir la entrega de compuestos químicos es crucial para un tratamiento médico eficiente y efectivo. Sin embargo, la carencia de control de la biodisponibilidad de los compuestos siendo administrados hacia un sitio de interés representa uno de los mayores retos de la medicina moderna. Un problema de gran importancia, en particular, es la solubilidad de los fármacos. Un compuesto de poca o nula solubilidad presenta un desempeño reducido debido a la baja acumulación en las regiones de interés. Los efectos secundarios son generalmente a causa de la pérdida del fármaco debido a su baja solubilidad durante la administración (Allen y Cullis, 2004). Encontrar una manera de contener y entregar compuestos de interés para evitar este tipo de problemas es de suma importancia para el avance de la medicina.

Las formas convencionales de combatir el problema de la baja solubilidad consisten en producir los fármacos en forma de sales o utilizar excipientes como solventes orgánicos, aceites o surfactantes. Recientemente el diseño de sistemas acarreadores eficientes y modulables como nanopartículas, nanocontenedores y biomateriales está recibiendo atención considerable. Las modificaciones físicas y químicas para el diseño de estos sistemas acarreadores como aquellas de tamaño, carga y adición de grupos funcionales imponen efectos directos sobre la captación celular, la distribución, la acumulación, la retención y el tiempo de excreción (Doane *et al.*, 2012).

Los acarreadores semi-sintéticos como los puntos cuánticos, dendrímeros, vesículas, y liposomas presentan ciertas ventajas y desventajas. En términos de biocompatibilidad, farmacocinética, toxicidad e inmunogenicidad los virus constantemente sobresalen como un sistema acarreador molecular con mayores ventajas y aplicaciones (Wen, Rambhia *et al.*, 2013).

El uso del virus de la clorosis moteada del caupí (CCMV) como nanopartícula de trabajo en la biotecnología tiene casi 20 años, desde que Douglas y Young lo

seleccionaron por su estructura altamente dinámica, la cual es capaz de separarse en componentes proteínicos y genéticos para luego retomar su conformación silvestre (1998). El enfoque de su estudio fue el uso de la separación de las proteínas de la cápside ante incrementos y reducciones de pH y fuerza iónica para intercambiar el cargo natural (ácido nucleico) por material sintético. Desde entonces, variedad de materiales se encapsidan en el CCMV y en muchas otras nanopartículas tipo virus (VNP).

En este trabajo se pretendió utilizar partículas tipo virus (VLPs) del CCMV como transportador y método de entrega de ARN mensajero (ARNm) que codifique para la proteína pro-apoptótica Granzima B (GzmB) de humano. Hasta donde sabemos, este trabajo es el primer estudio que utiliza la encapsidación del mensajero de la Granzima B en VLPs como medio de entrega. Estudios anteriores utilizaron nanotubos de carbono para la entrega efectiva de proteínas pro-apoptóticas como el Citocromo C (Konduru *et al.*, 2009). Otras investigaciones se realizaron utilizando nanopartículas sintéticas, como las microesferas de ácido polilactico-co-glicolico (PLGA), de forma exitosa ante la entrega de componentes inmunosupresores como la betametasona (Higaki *et al.*, 2005), inhibidores bifuncionales de péptidos y el factor inhibidor de leucemia (LIF) (Buyuktimkin *et al.*, 2012). Es por esto que el enfoque de este estudio es determinar los diferentes factores para la encapsidación eficiente del ARNm de la GzmB.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Nanopartículas Virales

Justo entre lo vivo y lo inerte se encuentran los virus. Estas entidades consisten de ácido nucleico encapsulado en proteínas, cuyo conjunto ensamblado se denomina cápside, la cual en algunos casos cubre o es rodeada por una membrana de lípidos llamada envoltura. Un virión, o una partícula viral completa e infecciosa, contiene el material genético que codifica para proteínas que le permiten al virus replicarse y ser transmitido de una célula a otra y de un organismo a otro. Los virus son parásitos intracelulares obligados, es decir, solamente logran replicarse dentro de una célula.

Esto se debe a que carecen de elementos esenciales para el crecimiento y la replicación. Específicamente carecen de 1) sistemas enzimáticos para la producción de los compuestos básicos para la vida – nucleótidos, aminoácidos, carbohidratos y lípidos, 2) sistemas enzimáticos para la generación de energía química generalmente en forma de trifosfato de adenosina (ATP) mediante fotosíntesis o por metabolismo de azúcares y otras moléculas, 3) maquinaria para la síntesis de proteínas como ribosomas y ARN de transferencia y 4) membranas que concentren y localicen estas moléculas utilizadas en el crecimiento y metabolismo.

A diferencia de otros parásitos intracelulares obligados como la *Chlamydia trachomatis* y las bacterias del género *Rickettsia* que permanecen intactos y conservan su material genético, los virus se desintegran al menos parcialmente para liberar su material genético dentro de la célula que infectan. Una vez liberado, el material genético funciona como plantilla, o molde, para la síntesis de ADN, ARN o proteínas dependiendo del tipo de ácido nucleico del virus.

Existe una gran variedad de virus en el mundo y probablemente todo ser vivo puede ser infectado por al menos un tipo de virus. Los virus son altamente diversos en su morfología, genomas, tamaño y mecanismos de replicación. Sin embargo, todos albergan un genoma conformado por solo un tipo de ácido nucleico; ADN o ARN. Ambas moléculas pueden ser mono-hebra o de doble hebra, lineal o circular, segmentado o no-segmentado y específicamente en el caso del ARN sentido positivo o sentido negativo. El ARN sentido positivo se puede utilizar directamente como ARNm, traduciendo directamente a proteína; mientras que, el ARN sentido negativo es una secuencia complementaria de un ARNm codificante. Es por esto que el ARNm se necesita replicar en sentido positivo para lograr la infección en la célula hospedera (Acheson *et al.*, 2011).

Los virus son enfoque de estudio desde hace más de 100 años y el conocimiento detallado de la estructura y el funcionamiento de un gran número de ellos se continúa acumulando. Durante muchos años el enfoque principal ha sido comprender las infecciones virales y sus enfermedades.

Durante los años 50, distintos investigadores comenzaron a pensar en los virus no sólo como patógenos, sino como herramientas biotecnológicas. Tomando brevemente el ejemplo de los bacteriófagos para el desarrollo de la biotecnología molecular, donde sus genomas y maquinaria de expresión de proteínas fueron fundamentales. Un área de investigación que presentó poco desarrollo fue el uso de bacteriófagos como terapia antibacteriana: terapia con fagos, pero el desarrollo de los antibióticos que demostraron ser más eficientes y comprendidos en su época desplazó la terapia con base en los bacteriófagos (Clark *et al.*, 2006).

En la década de los 70 surge un cambio de enfoque donde se busca la producción de VLPs para su uso en vacunas anti-virales. Las partículas tipo virus se conforman por las proteínas de la cápside viral sin el material genético, es decir, una partícula viral no infecciosa incapaz de replicarse. Uno de los primeros usos biotecnológicos para las VLPs fue su utilización como andamio o plataforma para la presentación de secuencias antigénicas de otros patógenos (Ludwig *et al.*, 2007).

En la década de los 80 se presenta la explotación de virus de plantas como vectores de expresión para la producción de proteínas farmacéuticas en plantas. Las ventajas de producir proteínas en plantas son, principalmente, la ausencia de productos animales, un bajo costo de producción, y cuando se utiliza un vector de expresión viral, altos niveles de expresión. Un amplio espectro de proteínas con acción farmacológica y anticuerpos terapéuticos han sido producidos mediante el uso de esta tecnología (Avram *et al.*, 2002; Canizares *et al.*, 2005).

Finalmente, de los años 90 en adelante los virus se han modificado para su utilización en diversidad de áreas desde la física de materiales hasta la biomedicina. La modificación química por bioconjugación de las partículas virales nos permite utilizarlas como moléculas de visualización, para terapia, entrega de compuestos químicos, como nanomateriales e incluso en la generación de electricidad (Wang *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2013; Kan-Davelaar *et al.*, 2014).

El uso de nanopartículas virales y sus semejantes, que va desde fungir como biorreactores, vehículos de entrega y herramientas visuales hasta andamios, ha resultado ser un área de investigación en expansión. Estas nanopartículas generalmente se obtienen directamente de virus pero también se pueden producir de forma recombinante. El virus como tal se separa en sus componentes proteínicos y nucleicos mediante una metodología bien establecida y desarrollada por Bancroft a final de los 60 y mejorada por diferentes investigadores como Rao y colaboradores en 1994. Dicha metodología nos permite trabajar con las proteínas del virus, las cuáles mediante el uso de condiciones fisicoquímicas específicas, se auto-ensamblan alrededor de materiales con características específicas como carga negativa neta y tamaño (Cadena-Nava *et al.*, 2012).

En la actualidad el número de métodos que intentan entregar fármacos o moléculas en sistemas biológicos es muy diverso. No sólo surgen nuevas técnicas, éstas por igual hacen posible la modificación y el detallado ajuste permitiendo a los investigadores trabajar según sus necesidades y las necesidades del proyecto en mano. Retomando los sistemas de entrega, las partículas virales son altamente modulables mediante esta variedad de metodologías. Estos procesos permiten la afinación de la región externa, interna e inter-subunidad de la partícula de entrega. La modificación de cualquier región literalmente confiere funcionalidad a las partículas virales. Las modificaciones de las partículas que más se utilizan se basan en técnicas genéticas y químicas con la intención de funcionalizar a las partículas con base en el carácter dependiente de su aplicación.

Modificar las nanopartículas permite regular aspectos como la toxicidad del compuesto encapsidado, protección ante la degradación o secuestro de la molécula, capacidad de dirigir el compuesto e incremento del tiempo de circulación. Diversos estudios exponen estas modulaciones; funcionalidad externa (Wu, 2012; Hommersom, 2014) y capacidad de carga de partículas tipo-virus (Lockney *et al.*, 2011).

Las partículas virales sobresalen en áreas de interés biotecnológico como la biocompatibilidad, producción, funcionalización y la homogeneidad estructural. Estudios prometedores, dependientes de cápsides virales, han mejorado la eficiencia de fármacos, reducido toxicidad de moléculas y dirigido complejos de partículas tipo-virus cargadas con fármacos (Ma *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2013; Yildiz *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2013).

Particularmente, el virus de la clorosis moteada del caupí, uno de los primeros modelos en ser caracterizado y utilizado como objeto de estudio con fines biotecnológicos, es utilizado por los científicos de hoy en día. La robustez de su cápside y su capacidad de sufrir transiciones conformacionales reversibles lo hace un andamio molecular prometedor. Éste es un virus de planta que pertenece al género *Bromovirus* de la familia *Bromoviridae*. Su cápside tiene un diámetro exterior de 26 nanómetros y uno interior de 18, carece de una envoltura lipídica por lo que se denomina desnudo. La cápside se compone de 180 proteínas idénticas con una triangulación Caspar-Klugg¹ de T=3 que a su vez alberga, de manera tripartita, un genoma basado en ARN de una cadena o monocatenario de sentido positivo (Acheson *et al.*, 2011, Garmann *et al.*, 2016).

La capacidad de este virus de realizar transiciones estructurales reversibles dependientes de pH y fuerza iónica forman la principal causa de su selección como objeto de estudio. La cápside se expande aproximadamente 10% a un pH de 6.5 en condiciones de fuerza iónica débil ($I < 0.1$ M). Esta expansión permite la difusión de moléculas de bajo peso molecular al interior y exterior de la cápside. Al incrementar el pH arriba de 7 y la fuerza iónica a 1 M el virus se separa en dímeros de proteínas de la cápside y ARN. Posterior al desensamble se puede remover el material genético y modular las condiciones fisicoquímicas para el auto-ensamble de la cápside (Bancroft *et al.*, 1967). La alta producción del virus de forma silvestre o de forma heteróloga permiten su uso para el desarrollo de VLPs a gran escala.

¹ La fórmula utilizada es H^2+HK+k^2 donde H es el número de movimientos en el eje X y K el número de movimientos en el eje Y partiendo desde un pentámero y moviéndose hacia el pentámero más cercano. Si T=3 entonces solamente se requiere un movimiento a la derecha y uno hacia arriba para llegar al pentámero más cercano. $(1)^2+(1)(1)+(1)^2 = 3$

1.2.2 Encapsidación de Moléculas

La encapsidación de diferentes compuestos químicos permite utilizar las partículas tipo virus de diferentes formas y para diferentes motivos. Como un ejemplo de encapsidación de enzimas Sánchez y colaboradores en el 2014 utilizan partículas tipo virus del CCMV para la encapsidación de Citocromo P450. La encapsidación del citocromo permitió la activación de los pro-fármacos quimioterapéuticos tamoxifen y resveratrol tras la interacción con la cavidad interior de la VLP. Esto demuestra la capacidad del CCMV de encapsidar, transportar, proteger y entregar (Azizgolshani *et al.*, 2014) gran variedad de moléculas así como fungir como nanoreactor donde el cargo permanece protegido mientras éste cumple su función.

En un estudio con otra VLP se logró encapsidar el fármaco doxorubicina, utilizado como tratamiento quimioterapéutico contra el cáncer, en VLPs del virus del mosaico en pepino (CMV). La encapsidación de este compuesto redujo su acumulación en células de tejido sano disminuyendo significativamente los efectos secundarios. Otro logro de este estudio fue la funcionalización de la cápside viral para potenciar el efecto antitumoral del fármaco, acción realizada exitosamente gracias a la especificidad conferida por la adición de ácido fólico al exterior de la cápside (Zeng *et al.*, 2013).

Finalmente, Kaiser y colaboradores nos muestran resultados favorables sobre la biodistribución del CCMV en tejido murino y su tiempo de depuración del organismo (Kaiser *et al.*, 2007). El grupo utilizó modelos de ratones vírgenes y de ratones previamente inmunizados con el virus. Ambos presentaron acumulaciones en tiroides, tracto digestivo e hígado con una depuración del 64-89% de la carga viral en el transcurso de 24 horas. La respuesta inmunitaria del ratón ante la introducción del CCMV a su sistema circulatorio demostró ser mínima y de rápida recuperación. Donde después de 21 días, los ratones inoculados no presentaron diferencias significativas en peso y apariencia.

1.2.3 Granzimas

Las principales células citotóxicas del sistema inmune de los mamíferos son las células asesinas naturales y los linfocitos T CD8⁺. Estas células se activan cuando reconocen antígenos particulares y se tornan células efectoras (linfocitos T citotóxicos) al expresar ambos tipos de moléculas citotóxicas. Ya activadas reducen la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas que las mantienen en los nódulos linfáticos y a su vez generan receptores que les permiten la migración hacia sitios de infección o invasión tumoral.

Una característica principal de estas células es que contienen lisosomas especializados de carácter ácido conocidos como gránulos citotóxicos. Estos gránulos se movilizan como otras vesículas secretoras, por ejemplo las vesículas que contienen neurotransmisores, cuya ubicación es cercana a la de la sinapsis neuronal. Los gránulos citotóxicos contienen granzimas, perforina, granulicina y serglycina además de otros componentes presentes en todos los lisosomas como Lamp1, catepsinas, proteínas asociadas a membrana (VAMPs), entre otros. Estas moléculas realizan funciones que van desde el procesamiento de las granzimas y protección de las moléculas efectoras hasta la exocitosis del gránulo (Paul *et al.*, 2013).

Las granzimas o enzimas de gránulos, son una familia de serín proteasas altamente homólogas contenidas en algunas de las células del sistema inmune innato y adaptativo, principalmente linfocitos T CD8⁺ y células asesinas naturales. Su función principal es la inducción de muerte celular programada o apoptosis, mediante diferentes vías de señalización. Además existe evidencia de que las granzimas desempeñan cierta regulación de la inflamación y migración celular actuando sobre sustratos extracelulares (Boivin *et al.*, 2009). Hasta la fecha se han descrito cinco granzimas humanas que se expresan por tres grupos de genes, siendo las Granzimas A y B (GzmA y GzmB respectivamente) las más abundantes. No se conoce una función definida para las restantes, Granzimas del tipo H, K y M.

La Granzima B, cuyo sitio de hidrólisis es después de un ácido aspártico como la mayoría de las caspasas, es la más estudiada y parece tener un papel biológico predominante (Chowdhury *et al.*, 2008). Esta proteína se sintetiza como una preproenzima que requiere de dos cortes proteolíticos. Estos cortes liberan la secuencia señal de 18 amino ácidos y un motivo diaminoácido (Gly-Glu) del amino terminal. Al realizarse estos cortes, la enzima se considera madura, tomando su conformación catalítica o activa (Caldas *et al.*, 2006).

En general, se reconocen diversas rutas de entrada de las granzimas al citosol de la célula blanco. La vía previamente considerada como la más común, es mediante poros generados en la membrana plasmática de la célula blanco. Estos poros son formados por porinas, otro de los integrantes de los gránulos citotóxicos, permitiendo así el paso de las granzimas. Un nuevo modelo postula que las porinas generan orificios microscópicos en la membrana plasmática, causando un flujo de calcio hacia el interior de la célula blanco. Este flujo induce en la célula una respuesta membranal donde se endocitan las granzimas y cualquier otro compuesto adherido a la membrana celular (Keefe *et al.*, 2005). Otro estudio demuestra que la entrada a la célula es dependiente de una molécula denominada dinamina, cuya acción resulta en la formación de endosomas que contienen ambas moléculas, perforina y granzima (Veugelers *et al.*, 2004). Se cree que el método de escape del endosoma por las granzimas es mediante los poros generados por porinas como lo explican Shi y colaboradores en el 2005.

Una vez dentro del citoplasma, las granzimas inducen apoptosis utilizando diferentes vías de señalización en diferentes lugares de la célula blanco. En el caso de la Granzima B, la proteólisis del dominio de interacción BH3 (bid) y el inhibidor de la ADNasa activada por caspasas (ICAD) en el citosol son unas de las formas para inducir apoptosis. Las otras vías se activan cuando la granzima llega a compartimientos membranosos como el núcleo y la mitocondria. Las Granzimas A y B se traslocan rápidamente al núcleo donde la Granzima B hidroliza laminina B y la polimerasa poli-ADP-ribosa 1 (PARP1). El funcionamiento detallado de la Granzima B y los factores de los que depende aún no se conocen en su totalidad. Se observa

que puede inducir apoptosis independientemente de perforina. La necesidad de un transportador de membrana parece no ser siempre el caso ya que la unión de la Granzima B a la membrana celular induce apoptosis, fenómeno que carece de una descripción científica detallada. Otras moléculas permiten el paso de la granzima hacia el citosol. La proteína de choque térmico 70 (Hsp70), conocida por funcionar como chaperona de algunos péptidos a través de la membrana celular, transloca a la Granzima B del medio extracelular al intracelular (Gross *et al.*, 2003). La Hsp70 es importante ya que se expresa extracelularmente sobre la membrana plasmática por un gran número de células cancerosas y células estresadas (Murphy, 2013).

Estos antecedentes demuestran lo prometedor de este campo de estudio donde los virus, con su alta homología estructural y la capacidad de sufrir modificaciones extra, inter e intra-cápside, se utilizan para generar mejores respuestas ante el combate de enfermedades actualmente difíciles de atenuar o curar. La encapsidación del ARN mensajero de la Granzima B, una proteína pro-apoptótica de múltiples vías de acción, representa el paso inicial para la elaboración de mejores tratamientos terapéuticos.

2. Hipótesis

Las partículas tipo virus del CCMV poseen las características fisicoquímicas y estructurales para encapsidar el ARNm de la Granzima B de humano.

2.1 Objetivo

Encapsidar el ARNm de la Granzima B humana en partículas tipo virus del CCMV.

Objetivos particulares

1. Obtener el ARNm de la Granzima B de humano.
2. Purificar el virus de la clorosis moteada del caupí y su proteína de la cápside.
3. Evaluar la encapsidación del ARNm de la Granzima B en las VLPs.
4. Evaluar el efecto del CCMV, la CP y VLPs en la viabilidad de células de humano.

3. Metodología

En esta tesis se evalúa la capacidad de las VLP, formadas a partir de la CP del CCMV, de encapsidar y entregar de manera funcional el ARNm de la Granzima B de humano. Se procedió a encapsidar, posterior a la purificación de la CP del CCMV, el ARNm de la Granzima B. La proteína de la cápside viral se obtuvo de inóculos en el hospedero silvestre del virus, *Vigna unguiculata*, comúnmente nombrado caupí. El ARNm se obtuvo directamente del gen GZMB mediante transcripción *in vitro* para la cual se utilizó un kit T7 mMessage mMachine (Thermo Fisher Scientific). Para obtener el resultado deseado del kit de transcripción se diseñó un oligonucleótido que, mediante PCR, añadió la secuencia del promotor T7 para la transcripción del ARNm de la Granzima B y modificó el gen. La modificación del gen se basó en la eliminación de los tripletes codificantes para el diaminocácido de maduración, Gly-Glu. Ya obtenidos los componentes principales, proteína de la cápside y ARNm, se realizaron ensayos de encapsidación mediante la adición de los componentes en proporciones de 6 a 1 (proteína y ácido nucleico respectivamente) según los antecedentes (Azizgolshani *et al.*, 2013; Cadena-Nava *et al.*, 2011). El esquema general de la metodología se presenta en la figura 1.

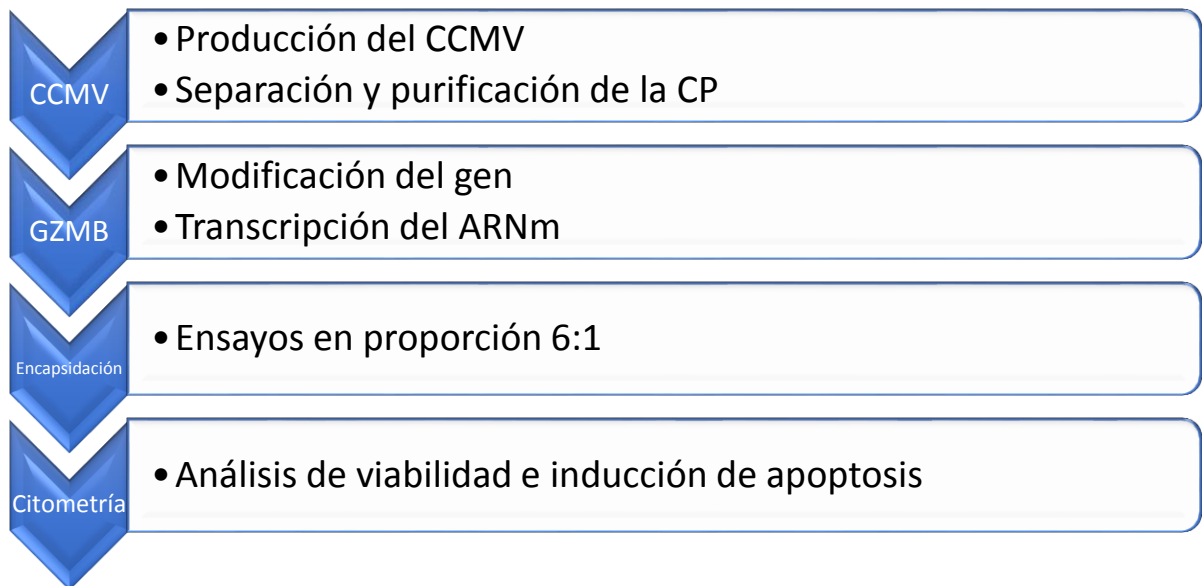


Figura 1. Esquema general de la metodología.

3.1 Obtención de la CP

La metodología para la amplificación del CCMV se describe por Kuhn en 1964, quien describe el proceso de inoculación mecánica, periodo de crecimiento y cosecha para la purificación del virión. El proceso de purificación del virus ha sido mejorado por varios investigadores, método que se utilizó según la bibliografía más reciente (Bancroft *et al.*, 1967; Rao *et al.*, 1994).

3.1.1 Inoculación del virus en caupí

La metodología de inoculación del virus en su hospedero natural fue descrita por Kuhn en 1964 donde se utiliza un agente abrasivo para generar cortes en la superficie de las hojas del caupí. En nuestro estudio se sustituyó la abrasión mecánica por micro-perforaciones que fueron realizadas con un chip de computadora (Figura 2). El protocolo de inoculación se describe a continuación.

Se observaron de las plántulas de caupí durante 10 días hasta que las primeras hojas se desarrollaran lo suficiente. Estas fueron sembradas desde la semilla en abono comercial “Miracle Grow” (The Scotts Company LLC, México) dentro de macetas de 14 cm de alto y 12 cm de ancho.

La inoculación del virus se realizó mediante la perforación de las hojas, por ambos lados de la nervadura central. Perforada la hoja, se colocó una gota de 20 μ l portando CCMV a una concentración de 1 μ g/ μ l. Se esparció la gota sobre los orificios con el dedo índice cubierto por un guante de látex. Finalmente se regaron las plántulas de manera general para impulsar su recuperación y crecimiento.



Figura 2. Hojas de caupí perforadas con un chip de computadora. Las gotas sobre las perforaciones contienen el inoculo del CCMV.

Se mantuvieron las plantas en observación durante 2.5 semanas hasta la aparición de manchas cloróticas en las hojas. Se removieron las hojas con manchas y se conservaron a -80°C en bolsas de 1 galón para congelador marca Ziploc (S.C. Johnson & Son Inc., EUA).

3.1.2 Purificación del virus

Para la cosecha del virus se pesaron las hojas infectadas previamente conservadas a -80°C , y se colocaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Se homogenizaron 275 g de hojas descongeladas en un mortero al cual se le añadieron 275 mL de amortiguador de extracción (Anexo 1) adicionado con 2.75 mL de β -mercaptoetanol. Se agregó arena de mar desacidificada y esterilizada para facilitar el proceso de homogenizado. Ya que se obtuvo una pasta fina se procedió a filtrarla utilizando 3 capas de gasa fina. Se conservó la fase líquida y se descartó el material sólido restante.

Al volumen obtenido se le agregó un volumen idéntico de cloroformo, agitando la muestra durante 2 horas bajo campana de extracción. Se centrifugó a 10,000 rpm (12,000 g) durante 17 minutos a 4°C . Colectamos el sobrenadante y se colocó en

agitación a 4°C durante 4 horas. Transcurrido el tiempo se tomó la solución y se colocó sobre un colchón de sacarosa al 10% en tubos de 6 mL ultra claros para ultracentrifuga. Se centrifugó la muestra a 28,000 rpm (58500 g) durante 138 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1 mL de amortiguador de suspensión (Anexo 1).

La muestra obtenida se colocó en el fondo de un vaso de precipitado de 1L y con un gradiente de sacarosa al 25% previamente preparado y enfriado a 4°C. Se centrifugó a 28,000 rpm (58,500 g) durante 78 minutos a 4°C. Se retiraron los tubos cuidadosamente y mediante la iluminación de la muestra con luz blanca en un cuarto oscuro se observó la franja azul característica del virus. Se extrajo la franja y se colocó en un tubo de 1.5 mL. La muestra obtenida se centrifugó a 60,000 rpm (104,552 g) por 100 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón con amortiguador de suspensión y suave agitación manual. Se midió la concentración y pureza con espectrofotometría de radiación UV-Vis (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, EUA).

3.1.3 Separación de la CP y ARN viral

El estudio de Bancroft muestra que el desensamble del virus se ve facilitado en altas concentraciones de sales a un pH cercano a 7. El amortiguador de desensamble permite principalmente propiciar el hinchamiento de los viriones del CCMV que lleva a la separación de las CP, dejando el ARN viral en suspensión, que pasará a agregarse. De igual forma, los iones de calcio presentes en el amortiguador fomentan la precipitación del ARN, facilitando la separación de las proteínas y el ARN mediante ultracentrifugación.

Inicialmente, el virus se purificó mediante una membrana de diálisis de celulosa con tamaño de poro de 8 a 12 kDa en 1 litro de amortiguador de desensamble (Anexo 1) durante 24 horas a 4°C en agitación constante. Finalizado el tiempo se tomó la solución de la membrana de diálisis y se colocó en un tubo ultra claro apropiado para el rotor de ángulo fijo Ti-90. Se ajustó el volumen final de la

muestra a 2.5 mL con amortiguador de desensamble filtrado y estéril. Se centrifugó a 50,000 rpm (95589 g) durante 8 horas y 45 minutos a 4°C. Se removió la muestra de la ultra-centrifuga (con sumo cuidado) y se tomaron alícuotas de 500 µl, de arriba hacia abajo, sin perturbar la solución. Cada muestra de 500 µl se colocó en un tubo de 1.5 mL. Se midió la concentración y pureza de los 5 tubos en el espectrofotómetro de radiación UV-Vis y se conservaron aquellas muestras que presentaron una absorbancia igual o mayor a 1.5 (A280/A260). La muestra conservada se colocó en diálisis utilizando una membrana de diálisis de celulosa, con tamaño de poro de 8 a 12 kDa, en 1 litro de amortiguador de proteína (Anexo 1) durante 12 horas a 4°C. Transcurrido el tiempo se midió la concentración y pureza mediante espectrofotometría UV-Vis y se almacenó el producto a 4°C.

3.2 Amplificación del plásmido portador del gen de la Granzima B

El plásmido donador se ordenó de la página de PlasmID Database (creada por el DF/HCC ADN Resource Core en apoyo a académicos e instituciones). Este plásmido comercial, pDNR-Dual, en el cual se encuentra el gen de interés se muestra en la figura 3. Para obtener una gran cantidad de plásmido se decidió transformar bacterias competentes y purificar el plásmido por miniprep con lisis alcalina, proceso que permite la purificación de plásmidos de interés.

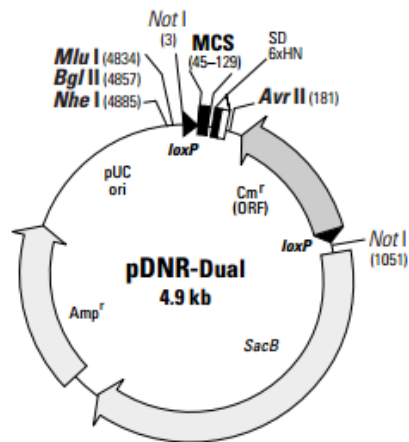


Figura 3. Esquema del plásmido portador del gen de la Granzima B.

3.2.1 Transformación de bacterias

Para la amplificación del gen se transformaron bacterias *Escherichia coli* DH5 α electrocompetentes según el protocolo que se describe en el “Current Protocols in Molecular Biology” por Ausubel y colaboradores (2003). Se comenzó con la descongelación de las bacterias en hielo. A las bacterias descongeladas se les añadió 0.5 μ g del plásmido portador del gen y se mezcló suavemente mediante micro-pipeteo ligero. Se transfirió la muestra a una celda de electroporación previamente colocada en hielo (ésta se levantó y golpeó fuertemente sobre la mesa repetidas veces, así bajando la muestra al fondo de la celda). Se aseguró que la celda careciera de humedad en su exterior secándola con papel secante y se colocó en el aparato de electroporación.

Una vez que se colocó la celda se activó el dispositivo generando un pulso eléctrico. Se retiró la celda, inmediatamente añadiéndole 1 mL de medio LB (Anexo 1) y se transfirió la muestra total a un tubo de 1.5 mL de capacidad. Se incubó a 37°C con agitación moderada durante 60 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se plaquearon muestras de 200 μ l, 100 μ l y 50 μ l en cajas Petri separadas, todas con medio LB adicionado con carbenicilina a una concentración final de 1 mg/mL. Se incubaron las cajas a 37°C toda la noche.

3.2.2. Miniprep por lisis alcalina

Ya presentes las colonias independientes en las placas de selección se tomó una colonia y con ella se inocularon 6 mL de medio LB estéril. La muestra se dejó saturar, incubando a 37°C toda una noche (aproximadamente 8 horas). Transcurrido el tiempo se tomaron 4 alícuotas de 1.5 mL y se centrifugaron a máxima velocidad durante 20 segundos en una microcentrífuga (Centrifuge 5417R, Eppendorf, EUA). Al finalizar se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió con 100 μ l de solución GTE y 1 μ l de ARNasa libre de ADNasa a una concentración de 10 mg/mL, dejando la muestra incubar 5 minutos a TA. Después se añadieron 200 μ l de solución NaOH/SDS, mezclando por golpeteo con el dedo índice y posteriormente incubando en hielo por 5 minutos. Concluido el tiempo, se añadieron 150 μ l de una solución de

acetato de potasio y se agitó con un vórtex a máxima velocidad durante 2 segundos, finalmente se incubó en hielo durante 5 minutos.

Pasados los 5 minutos se centrifugaron las muestras en microcentrífuga a máxima velocidad durante 20 segundos, precipitando así los restos celulares y el ADN cromosomal. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 mL y se le añadieron 800 µl de etanol absoluto mezclando los componentes. La muestra se incubó a -80°C por 30 minutos para precipitar los ácidos nucleicos. Pasados los 30 minutos la muestra se centrifugó durante 1 minuto a TA. Posteriormente se descartó el sobrenadante, se lavó el botón con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó de nuevo a máxima velocidad durante 1 minuto. Finalizada la centrifugación se descartó el sobrenadante y se dejó secar el botón a TA. Ya seco el botón se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril y se almacenó a 4°C.

3.3 Obtención del ARNm de la Granzima B

3.3.1 Preparación del ADN

Para realizar la transcripción *in vitro* fue necesario que la secuencia a transcribir presentara un promotor de la transcripción como el SP6, T7 o T3. En nuestro experimento se utilizó el promotor T7, unido al gen de interés mediante PCR utilizando oligonucleótidos (IDT). Estos oligonucleótidos no solo nos permitieron añadir las secuencias del promotor, a su vez excluyeron el di-péptido de maduración y amplificaron el gen. La cola poli-T del cebador antisentido permitió obtener un mensajero con una terminación poli-A (Figura 4).

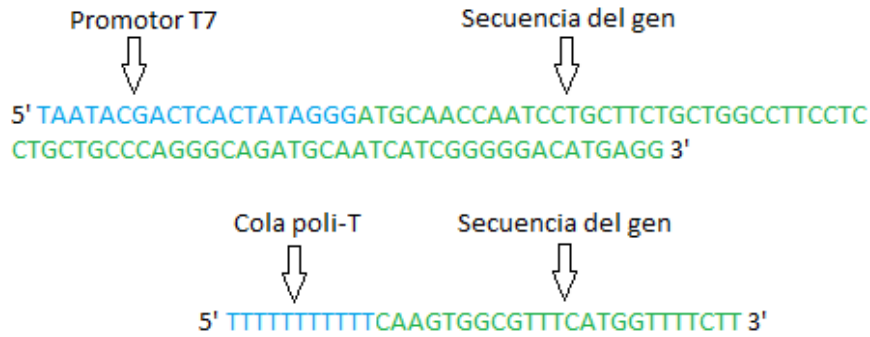


Figura 4. Obtención del ARNm sin la secuencia de maduración. Superior: Cebador sentido. Incluye la secuencia del promotor T7 y la secuencia inicial del gen de la Granzima B excluyendo la secuencia del péptido de maduración. Inferior: Cebador antisentido. Incluye una cola poli-T y la secuencia terminal del gen.

Para la PCR se utilizó el kit GoTaq® Flexi ADN Polymerase de Promega. La PCR se realizó según las especificaciones del fabricante de la siguiente manera. Se colocaron los diferentes componentes del kit en un tubo para PCR estéril y libre de nucleasas; 10 µl de 5X Flexi Buffer GoTaq® incoloro, 6 µl de solución de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de dNTPs 10 mM cada uno, 1 µl de cebador sentido, 1 µl de cebador antisentido, 0.5 µl de ADN polimerasa GoTaq®, 1 µl del ADN template, y finalmente se aforó a 50 µl con agua destilada estéril libre de nucleasas (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de reactivos, su volumen a utilizar y su concentración final según el fabricante.

Componente	Volumen Final	Concentración Final
5X Flexi Buffer GoTaq® verde o incoloro.	10 µl	1X
Solución MgCl ₂ , 25 mM	2-8 µl	1.0-4.0 mM
Mezcla de nucleótidos para PCR, 10 mM c/u	1 µl	0.2mM cada dNTP
Cebador sentido	X µl	0.1-1.0 µM
Cebador antisentido	Y µl	0.1-1.0 µM
GoTaq® ADN polimerasa (5u/µl)	0.25 µl	1.25 u
ADN template	Z µl	<0.5 µl/50 µl
Agua libre de nucleasas	a 50 µl	

Las condiciones para el termociclador se establecieron según las recomendaciones del fabricante del kit de PCR (Tabla 2).

Tabla 2. Condiciones generales del termociclador.

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización Inicial	95°C	2 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	0.5-1 minuto	25-35 ciclos
Alineamiento	42-65°C	0.5-1 minuto	
Extensión	72°C	1 minuto/kb	
Extensión final	72°C	5 minutos	1 ciclo
Conservación	4°C	Indefinido	1 ciclo

3.3.2 Transcripción del gen

Para la obtención del transcrito de interés se utilizó el kit comercial T7 mMessage mMachine® (Life Technologies, EUA) siguiendo el protocolo del fabricante. Se pasaron los componentes del kit (Tabla 3) por vórtex asegurando que todo esté en solución y luego se centrifugaron brevemente para bajar las soluciones. La reacción se llevó a cabo a TA (ya que el contenido de espermidina en el amortiguador de reacción puede precipitar el ADN template si se realiza en hielo). Primero se añadieron 5 µl de agua libre de nucleasas, luego 10 µl de NTP/CAP, 2 µl de amortiguador de reacción, 1 µl de template de PCR y finalmente 2 µl de la mezcla de enzimas en un tubo de PCR ultra-claro. Se golpeó ligeramente con el dedo índice para mezclar los componentes. Una vez mezclados se centrifugó unos segundos para colectar la muestra al fondo del tubo. La muestra se incubó a 37°C durante 2 horas.

Tabla 3. Cantidades y componentes para la transcripción *in vitro*.

Cantidad	Componente
a 20 μ l	Agua libre de nucleasas
10 μ l	NTP/CAP 2X
2 μ l	Amortiguador de Reacción 10X
0.1 - 0.2 μ g 1 μ g	Templete de PCR Templete de plásmido linealizado
2 μ l	Mezcla de enzimas

3.3.3 Purificación del ARNm

La purificación se llevó a cabo mediante el uso del kit comercial de Qiagen “QIAquick Gel Extraction Kit” Cat. No. 28704 siguiendo las instrucciones del fabricante.

La muestra que se obtuvo de la transcripción *in vitro* fue evaluada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñida con bromuro de etidio (10 mg/mL) en amortiguador TBE durante 1 hora a TA. Transcurrida la hora se colocó el gel en un transiluminador de UV donde se cortaron los segmentos de gel que contenían ARNm. Se determinó el peso de los cortes de gel y al ser mayor que el peso máximo de gel por reacción, se separaron los cortes en dos tubos de 2 mL. A estos tubos se les añadieron 450 μ l del amortiguador QG y se calentó la muestra a 50°C durante 15 minutos. Se agitaron los tubos cada 3 minutos utilizando un vórtex.

Ya disuelto por completo el gel de agarosa, se agregaron 450 μ l de isopropanol a cada tubo y se mezcló asegurando la homogeneidad. Se transfirieron 700 μ l de cada muestra a columnas de purificación, se insertaron en sus tubos de recolección y se centrifugaron a 13,000 rpm (24,853 g) durante 1 minuto. Se descartó el líquido y se repitió el proceso con la muestra restante. Ya descartado el líquido por segunda vez se añadieron 500 μ l de amortiguador QG a cada columna y se

centrifugó a 13,000 rpm (24,853 g) por 1 minuto. Se descartó el amortiguador y se lavaron ambas columnas con 750 µl del amortiguador PE, se incubó durante 5 minutos previo a la centrifugación. Culminado el tiempo se descartó el amortiguador PE y se centrifugó de nuevo, retirando el exceso del amortiguador.

Se transfirieron las columnas a tubos estériles de 1.5 mL y se les colocó en su centro 30 µl de agua destilada estéril. Se incubó durante 5 minutos para posteriormente centrifugar a 13,000 rpm durante 1 minuto. Para finalizar se descartaron las columnas y se midieron las concentraciones de las muestras mediante espectrofotometría UV-Vis.

3.4 Encapsidación

Se probó la condición de encapsidación que presentaría la mayor eficiencia en la formación de VLPs estables a partir de CP y el ARNm de la Granzima B. Antecedentes reportan la proporción 6:1, la adición de 6 veces más proteína que ARN, como la proporción “mágica” (Cadena-Nava *et al.*, 2011) por lo cual se realizaron ensayos alrededor de esta proporción.

3.4.1 Ensayos de proporción CP y ARNm

Para la realización del ensayo de encapsidación se utilizó una membrana de diálisis con tamaño de poro de 8 a 12 kDa. La muestra se dializó en amortiguador de ensamble (Anexo 1) durante 12 horas. Durante este tiempo las CPs encapsidaron el ARNm que funcionó como agente nucleador de la proteína.

3.5 Evaluación de la viabilidad e inducción de apoptosis en PBMCs de humano

La muestra de sangre fue recolectada de donadores sanos acorde a la declaración de Helsinki de la asociación médica mundial y de la ley Mexicana de la salud bajo un consentimiento informado. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

fueron aisladas por punción venosa de donadores sanos por un gradiente de densidad usando Ficoll-Paque™ (GE, EUA) (Figura 5). Posteriormente 2×10^6 células/mL fueron cultivadas en placas de poliestireno de 24 pozos (Costar, Cambridge, MA) en RPMI-1640 más 5% de suero fetal bovino, 1 mM HEPES (GIBCO, EUA), 2 mM L-Glutamina (GIBCO, EUA), 100 UI/mL Penicilina (GIBCO, EUA), 100 µg/mL Estreptomina (GIBCO, EUA), 50 µg/mL Gentamicina (GIBCO, EUA) e incubadas durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂.

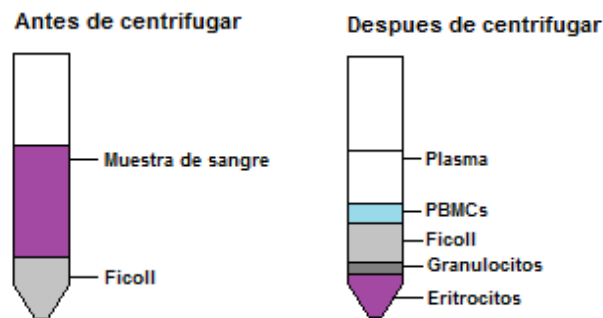


Figura 5. Purificación de células mononucleares de sangre periférica.

3.5.1 Estimulación y tinción multiparamétrica de citometría de flujo

Las PBMCs (2×10^6) fueron incubadas durante 24 horas bajo el siguiente esquema:

1. Sin estímulo
2. CCMV (0.5 µg, 1.0 µg y 5.0 µg)
3. CP (0.5 µg, 1.0 µg y 5.0 µg)
4. CCCP (1.0 µg)

Después de la incubación, las células fueron tratadas por 5 minutos con bloqueador (Biogenex, EUA) y teñidas con diferentes anticuerpos: anti-human CD3-APC (BD Pharmingen, EUA), anti-human CD19-APCCy7 (BD Pharmingen, EUA), anti-human CD14-PE (BD Pharmingen, EUA) y anti-human active caspase-3 FITC (BD Pharmingen, EUA), y el marcador de viabilidad 7AAD (BD Pharmingen, EUA).

La lectura de las muestras se realizaron utilizando el equipo Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA). Con este equipo se adquirieron 30,000 eventos por muestra. El análisis de las muestras se llevó a cabo con el software FlowJo ® verX.0.6 (Tree Star, Inc., EUA).

4. Resultados

Debido a la metodología y la secuencia experimental que se utilizó en este estudio se comenzó con la producción de la CP, componente principal de la partícula tipo virus. En este periodo inicial se obtuvieron plántulas de caupí en un invernadero hasta la formación de las primeras hojas maduras para su posterior inoculación con el CCMV. Inmediatamente se extrajo el virus, se separó en sus diferentes componentes y se almacenó la proteína.

4.1 Obtención de la CP

4.1.1 Inoculación del virus en caupí

La metodología de inoculación se basó en la perforación de las hojas del caupí con un chip de computadora como se muestra en la figura 6 y posteriormente inoculadas con una solución de virus CCMV. Todas las plantas crecieron, posterior a su tratamiento, adecuadamente para nuestros fines ya que permitieron la obtención de suficiente virus para los experimentos posteriores.



Figura 6. Perforación de una hoja de caupí con un chip.

4.1.2 Purificación del virus

La inoculación del caupí resultó positiva pero con un bajo rendimiento, tras la obtención de solamente 2.34 mg/mL del CCMV a partir de 224.11 g de hojas infectadas. Con este procedimiento se suelen producir entre 20 y 40 mg de virus por cada 100 g de tejido vegetal (Bancroft *et al.*, 1967).

4.1.3 Separación de la CP y el ARN viral

Como resultado de la separación mediante diálisis y ultracentrifugación se obtuvieron 0.56 mg/mL de CP con una relación de absorbanza 260/280 ($A_{260/280}$) de 0.64, a partir de un tubo con una concentración de 1 mg/mL de virus silvestre. La concentración y pureza se determinaron utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific, EUA). Se determinó la integridad de la proteína mediante un gel de poliacrilamida al 15% (Figura 7).

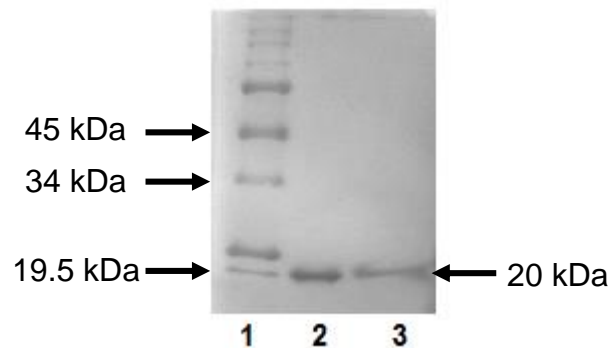


Figura 7. Electroforesis de la proteína de la cápside del CCMV. Gel de poliacrilamida al 15%. Escalera de proteína (carril 1) CCMV silvestre (carril 2) y CP purificada (carril 3). El gel se corrió durante 1 hora 45 minutos a 44 voltios (V) constantes.

4.2 Amplificación del plásmido con el gen de la Granzima B

4.2.1 Transformación de bacterias

Utilizando el protocolo descrito en la sección 3.2.1 se obtuvo una gran cantidad de colonias de *E. coli* DH5 α transformantes de las cuales se seleccionó la placa con el menor número (para evitar tomar más de una colonia). Se inocularon 4

cajas Petri con medio LB agar adicionado con carbenicilina como método de selección, con diferentes volúmenes de medio saturado de bacterias (150 μ l, 100 μ l, 50 μ l y 20 μ l). Solo se obtuvieron colonias independientes en las placas con 50 y 20 μ l de DH5 α transformadas. El antibiótico de selección fue utilizado a una concentración de 100 μ g/mL.

4.2.2. Miniprep por lisis alcalina

Los resultados de los minipreps realizados presentaron como promedio una concentración de 1552.9 ng/ μ l con una pureza promedio de 1.87 (A260/280). El plásmido que se obtuvo se utilizó para la modificación y amplificación del gen de la Granzima B.

4.3 Obtención del ARNm de la Granzima B

4.3.1 Preparación del ADN

Las PCRs que se realizaron utilizando los cebadores personalizados presentaron una baja amplificación del gen de interés. Se analizaron los resultados del PCR en gel de agarosa al 2% añadido con 7 μ l de bromuro de etidio (EtBr) 10 mg/mL para visualizar el ADN, en amortiguador TBE. Se cargaron 2 μ l de escalera de 100 pb de New England Biolabs (NEB) en el carril 1 y 5 μ l en los siguientes carriles de los cuales 3 μ l son de muestra y 2 μ l de amortiguador de carga como se muestra en la figura 8.

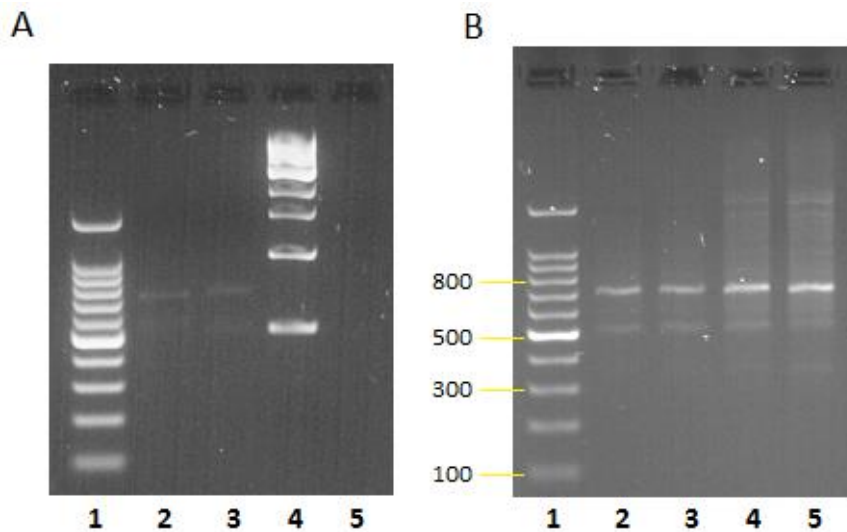


Figura 8. Amplificación del gen de la Granzima B modificado. (A) La banda de mayor intensidad de los carriles 2 y 3 expone el gen de la Granzima B modificado cuyo número de pares de bases es de 766. Escalera de 100 pb (carril 1), escalera de 1000 pb (carril 4) y resultado de PCR sin template como control negativo (carril 5). (B) Banda de mayor intensidad en carriles 2-5 representa el gen modificado. Gel de agarosa 2% de escalera de 100 pb (carril 1), resultado de la amplificación de 0.5 µg de plásmido portador del gen (carril 2 y 3) y resultado de la amplificación de 1.0 µg de plásmido portador (carril 4 y 5). Ambos geles fueron de agarosa al 2% en TBE con 7 µl de EtBr 10mg/mL y se corrieron a 80V constantes durante 1.5 hrs.

4.3.2 Transcripción del gen y purificación del ARNm

Se obtuvieron aproximadamente 7.4 µg de ARNm para la Granzima B en las cuatro muestras que exponen bandas, de las cuales la más intensa corresponde al ARNm (Figura 9).

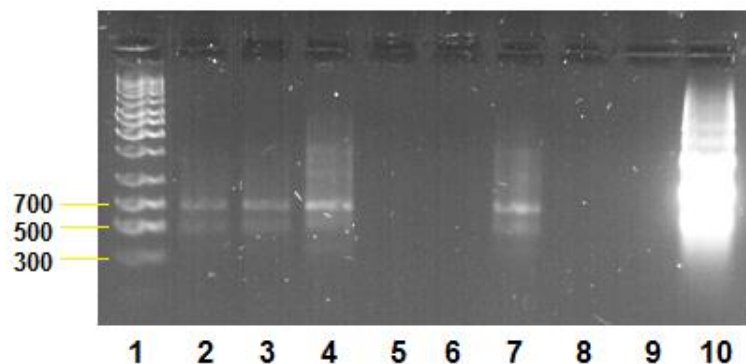


Figura 9. Electroforesis del ARNm de la Granzima B. Escalera de 1 kb de Axygen (carril 1), ARNm de 0.5 µg de ADN (carril 2 y 3), ARNm de 1.0 µg de ADN (carril 4-7), ARNm de 2.0 µg de ADN (carril 8), control negativo; sin template (carril 9), control positivo; factor de elongación de *Xenopus* (carril 10). Condiciones de electroforesis a 40V constantes durante 2 hrs. Gel de agarosa 1.5% en TBE con 7 µl de EtBr 10 mg/mL. Se muestra un exceso del control positivo en el carril 10.

En transcripciones posteriores, se utilizó el gen modificado utilizando cebadores nuevos de IDT como ADN molde. En esta transcripción *in vitro* se obtuvo una concentración mayor del ARNm; aproximadamente 1 µg/µl. Se observa la banda del mensajero en la figura 10.

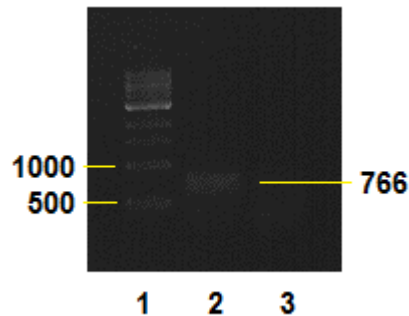


Figura 10. Electroforesis del ARNm de la Granzima B. Escalera de 1 kb (carril 1), ARNm (carril 2) y ARNm degradado con calor (carril 3). Condiciones de electroforesis a 100V constantes durante 1 hora. Gel de agarosa 1.0% en TBE con 7 µl de EtBr 10 mg/mL y 500 µl de cloro comercial.

4.4 Encapsidación

4.4.1 Ensayos de proporción CP y ARNm

Utilizando las proporciones de 6 a 1 de proteína a ARNm, respectivamente, se realizó la diálisis correspondiente para fomentar la formación de cápsides virales alrededor del mensajero cuya movilidad electroforética sea semejante a la del virus silvestre. El resultado al concluir la diálisis se analizó mediante electroforesis (Figura 11).

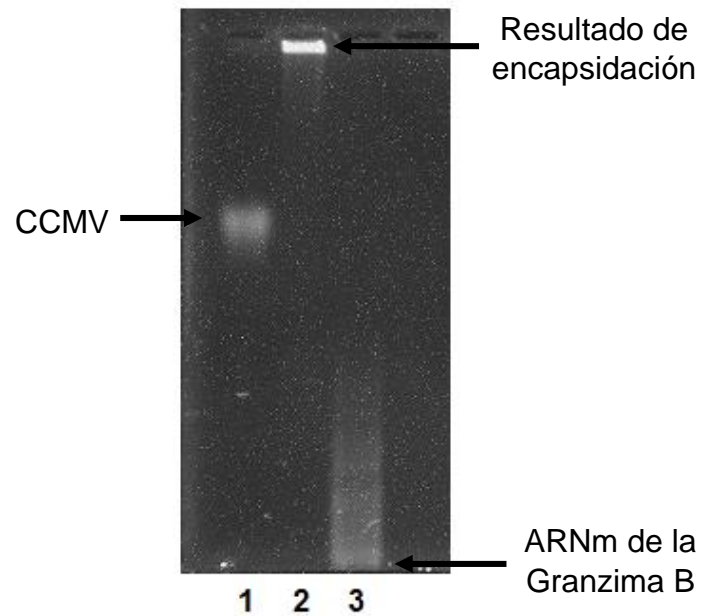


Figura 11. Encapsidación de ARNm de Granzima B con la CP del CCMV. CCMV silvestre (Carril 1), resultado de encapsidación (Carril 2) y ARNm de la Granzima B (Carril 3). El gel se corrió a 44V constantes durante 3.5 horas. Gel de agarosa 1% en amortiguador de virus. Nucleótidos teñidos con GelRed.

La encapsidación se realizó por duplicado con la diferencia de que la segunda muestra de ARNm se purificó utilizando el producto comercial para purificación de nucleótidos Amicon Ultra 0.5 mL de Sigma-Aldrich. Se muestran los resultados a continuación en la figura 12.

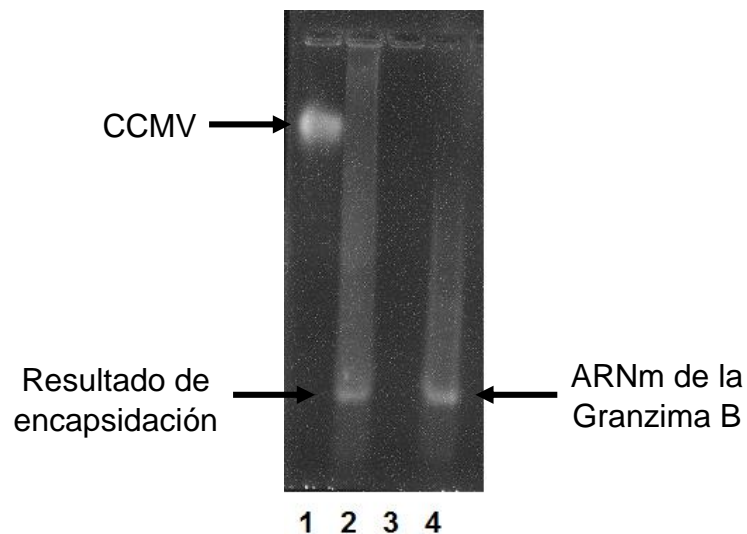


Figura 12. Encapsidación de ARNm de Granzima B con la CP del CCMV. CCMV silvestre (Carril 1), resultado de encapsidación (Carril 2), proteína de la cápside (Carril 3) y ARNm de la Granzima B (Carril 4). El gel se corrió a 44V constantes durante 3 horas. Gel de agarosa 1% en amortiguador de virus. Nucleótidos teñidos con GelRed.

Finalmente, se realizó otro ensayo utilizando ARNm producto del uso de nuevos cebadores de IDT y CP recién purificada, resultando en una VLP con movilidad electroforética semejante a la del virus silvestre (Figura 13).

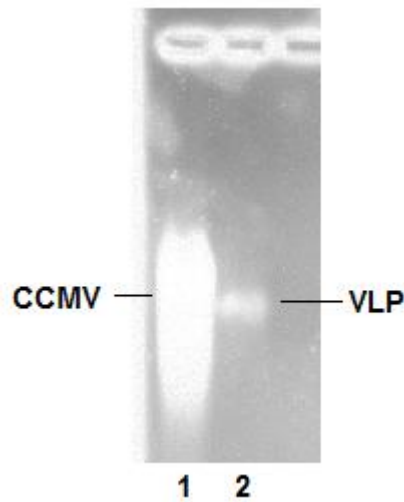


Figura 13. Encapsidación de ARNm de Granzima B en la CP del CCMV. 18 μ g de CCMV silvestre (Carril 1) y VLP de CP y ARNm (Carril 2). El gel se corrió a 44V constantes durante 3 horas. Gel de agarosa 1% en amortiguador de virus. Nucleótidos teñidos con GelRed. Se muestra un exceso del CCMV en el carril 1.

4.5 Efecto del CCMV y CP en la viabilidad e inducción de apoptosis en células humanas

Se evaluó el efecto del CCMV y su CP en la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de humano. Mediante la citometría de flujo caracterizamos los eventos inicialmente por tamaño y complejidad interna. Las evaluaciones de tamaño lineal y de área discriminaron eventos con formas no representativas de un solo evento o lectura. Ya seleccionados los eventos representativos procedimos a evaluar utilizando marcadores fluorescentes unidos a anticuerpos. El utilizar los marcadores nos permitió la selección de los grupos celulares específicos debido a sus características externas únicas como proteínas de membrana.

La figura 14 muestra las regiones seleccionadas de eventos evaluados. Las regiones permiten seleccionar eventos relevantes mientras excluyen aquellos que no son significativos para el estudio como células muertas, conglomerados y detritos.

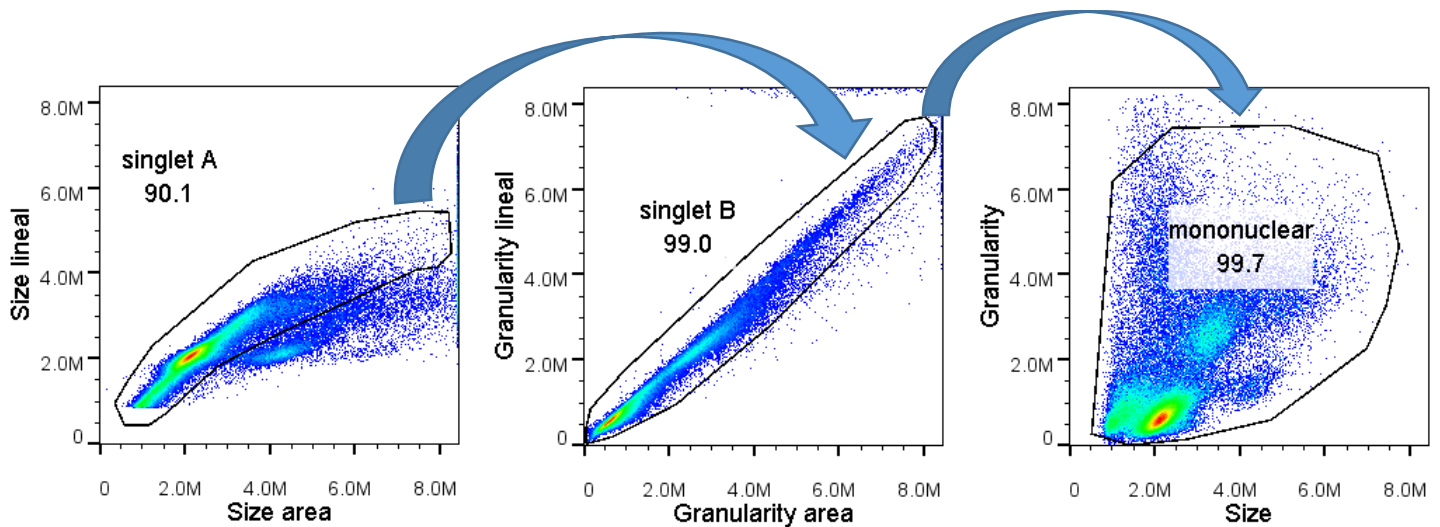


Figura 14. Imagen representativa del análisis multiparamétrico básico de citometría de flujo en células mononucleares de sangre periférica. Las regiones indican los eventos seleccionados para el análisis.

Los resultados indican que las nanopartículas (CCMV y CP) no afectan la viabilidad ni inducen apoptosis en linfocitos B co-cultivados durante 24 horas (Figura 15 y 16). El 7-aminoactinomicin-D (7AAD) es un marcador intracelular con alta afinidad por el ADN que solamente se introduce en células con una membrana disfuncional, por ejemplo células muertas. Al comparar el porcentaje de eventos obtenidos en cada cuadrante “Q6” de la figura 15, cuyo valor corresponde al porcentaje de eventos positivos para el 7AAD, no se observan diferencias relevantes.

La figura 16 muestra el porcentaje de eventos (células) que presentan caspasa 3 activada, lo que indica que las células están en proceso de apoptosis. Este ensayo indica que los linfocitos B no mueren por apoptosis mediada por caspasa 3, por la interacción con CCMV o CP. Asimismo se realizaron ensayos del efecto de las nanopartículas sobre los monocitos y linfocitos T. Los resultados se muestran en el anexo 2.

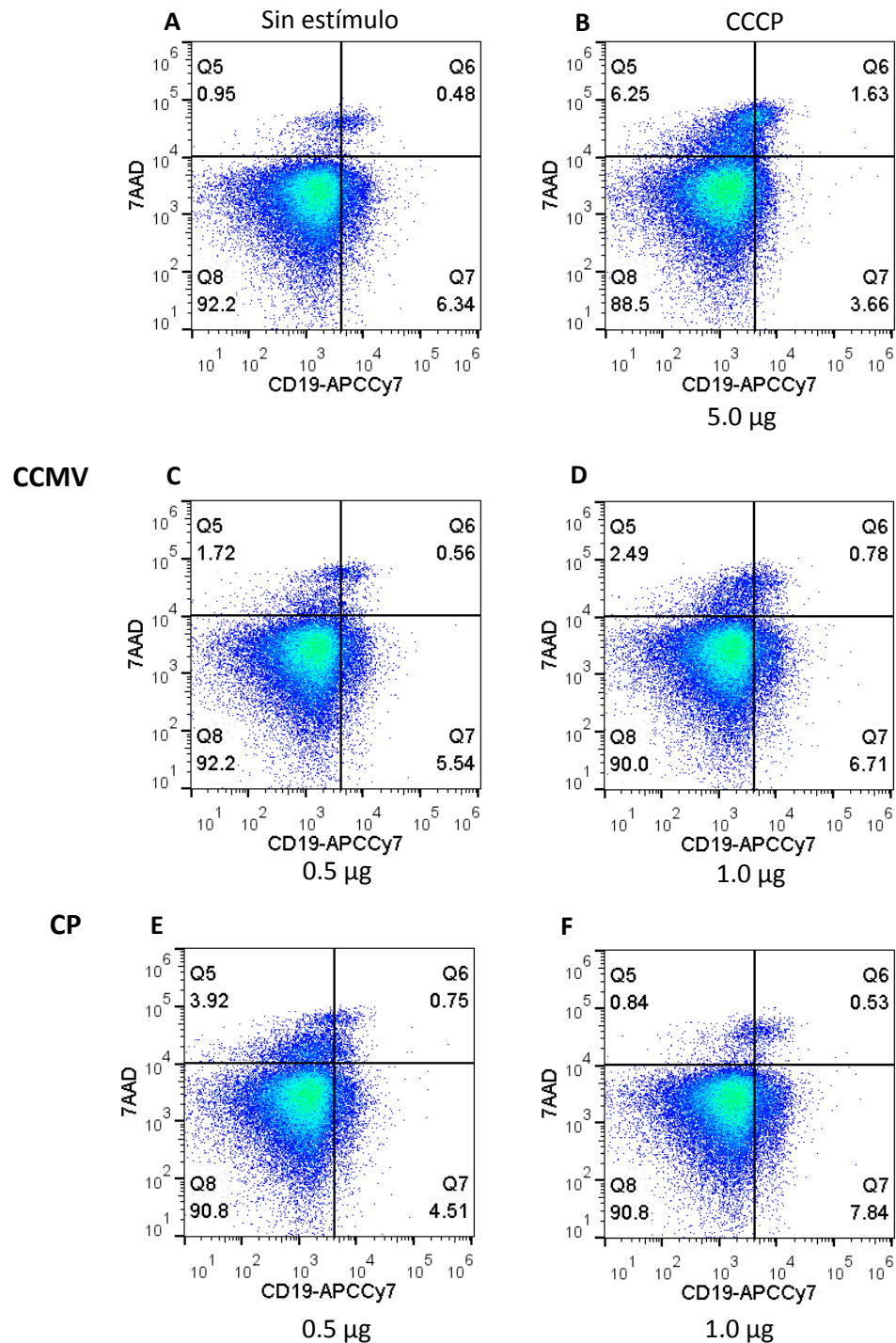


Figura 15. Viabilidad de PBMCs incubadas con CCCMV y CP. Porcentaje de linfocitos B (CD19⁺) teñido con 7AAD después de ser incubados por 24 horas con: 0.5 µg y 1.0 µg de CCMV (C y D) y CP (E y F). 7AAD: 7-aminoactinomicina D, CCCP: Carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona.

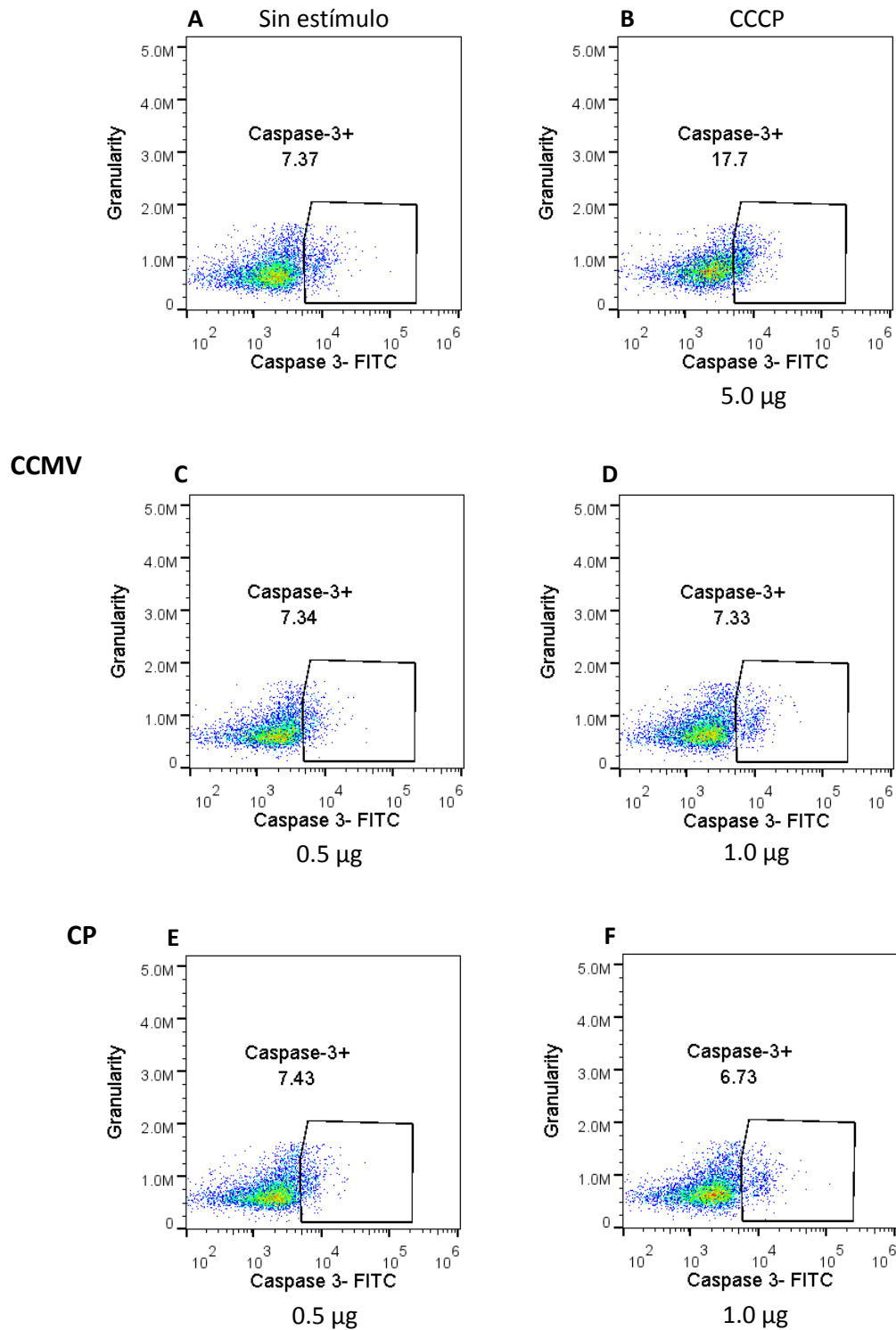


Figura 16. Apoptosis en PBMCs incubadas con CCCMV y CP. Porcentaje de linfocitos B (CD19⁺) marcados con anti-human active caspase-3, 24 horas post-incubación con: 0.5 µg y 1.0 µg de CCMV (C y D) y CP (E y F). CCCP: Carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona.

5. Discusión

Nuestro estudio describe la producción del ARNm modificado de la GzmB y su encapsidación con la CP del CCMV. Los estudios de viabilidad e inducción de apoptosis evaluados por citometría de flujo sugieren que existe biocompatibilidad del CCMV y su CP con células humanas mononucleares. Éstas se seleccionaron para los ensayos de viabilidad debido a su facilidad de extracción y purificación. Para esto fue necesaria la previa purificación del CCMV y su desensamble para obtener la CP. Este proceso fue descrito previamente y ligeramente modificado en diferentes ocasiones según los objetivos de otros laboratorios con base en sus investigaciones anteriores.

El desarrollo del proyecto presentó varias eventualidades que se discuten a continuación siguiendo el orden de los resultados.

La purificación del CCMV de *V. unguiculata* demostró ser de bajo rendimiento. Posibles factores como la temperatura del invernadero donde crecieron las plántulas del caupí o una co-infección del hospedero por otro patógeno podrían explicar los resultados. Durante el crecimiento y desarrollo del caupí la temperatura del invernadero donde se producía se vio incrementada por factores climatológicos.

La especulación sobre la infección por otro patógeno se ve favorecida ya que durante el periodo de expansión del virus, se observaron manchas de carácter no clorótico. La infección del CCMV en las hojas del caupí suele presentar sólo manchas cloróticas, por lo que las manchas de coloración marrón o café sugieren la infección por otro patógeno, posiblemente un hongo. El estrés generado por la co-infección, la reducción de recursos disponibles o algún efecto de la interacción entre ambos patógenos son algunos de los factores que potencialmente redujeron el rendimiento de la purificación del CCMV.

La metodología inicial de digestión y ligación del gen de la Granzima B en un vector de clonación no demostró resultados significativos porque se decidió tomar

otra vía de acción que consistió en la amplificación y modificación del gen de la Granzima B con la PCR.

Mediante la PCR, y con la utilización de cebadores diseñados para este trabajo se le añadió el promotor de transcripción T7 al gen y a su vez se eliminó el diaminoácido de maduración. Esta modificación, respectivamente, permite la transcripción *in vitro* y la completa activación de la proteína resultante de la traducción del ARNm. Hipotetizamos que de no ser hidrolizado el diaminoácido, la acción de la Granzima B en el citoplasma de la célula blanco no sería posible y por lo tanto, la actividad pro-apoptótica de la proteína no tendría efecto.

Los resultados de la PCR presentaron un menor rendimiento de lo esperado. Posibles explicaciones giran alrededor del cebador sentido ya que es de tamaño mayor a los comúnmente utilizados en una PCR. El cebador sentido presenta una T_m por encima de los 80°C, potencialmente reduciendo considerablemente su capacidad de alineamiento y extensión. De igual manera se pensó que la cantidad de G·C en el cebador podría ser un factor limitante para la amplificación. Por esto se llevó a cabo una PCR con una concentración mayor de GTP/CTP. Este incremento no demostró resultados significativos. Finalmente se decidió corroborar la integridad de los cebadores, lo cual demostró el grado de degradación que eliminó su funcionamiento. Al momento de identificar el problema se adquirieron nuevos cebadores cuyo funcionamiento permitió la generación del gen de la Granzima B modificado.

La transcripción del gen de la Granzima B resultó inicialmente en poco rendimiento, obteniendo como máximo 118.2 ng/μl del mensajero y como total en cuatro reacciones exitosas 7.4 μg. Las posibles causas de esta reducción de la transcripción se limitan a la incorrecta replicación del gen de la Granzima B mediante el uso de los cebadores degradados. Esta limitante provocaría que lo poco que se obtuvo de la amplificación no presentara el promotor, factor esencial para la transcripción *in vitro*. La presencia de inhibidores de la transcripción se descartó al observar el control positivo. Utilizando el producto de la PCR con los nuevos

cebadores se obtuvo una cantidad considerablemente mayor, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, en volúmenes de 30 μl .

Una vez que se sintetizó una cantidad suficiente de ARNm, se procedió a realizar los ensayos de encapsidación. En ellos se utilizó la proteína de la cápside del CCMV obtenida de la purificación del virus silvestre de su hospedero natural como se mencionó en la metodología. Empleando la proporción de 6 a 1 de proteína a ARNm, respectivamente, se realizó el ensayo de encapsidación que dio resultados poco significativos. La nula movilidad electroforética del complejo CP+ARNm señala a la formación de complejos, posiblemente de trímeros o tetrámeros, de partículas tipo virus y el ARNm. Esto evitaría el desplazamiento de la muestra en el gel de electroforesis. La presencia de posibles contaminantes como DEPC en el agua utilizada en la transcripción *in vitro* podría generar problemas en la formación de cápsides semejantes o idénticas a las nativas, por lo cual se decidió utilizar agua MilliQ esterilizada por autoclave. Se repitió el experimento pero ahora utilizando ARNm purificado mediante una centrifugación modificada que implica utilizar filtros Amicon Ultra 0.5 mL (Sigma-Aldrich, EUA). En los resultados se observó que la muestra de encapsidación del ARNm se desplazó en el gel de igual manera que el control cuya composición era de solo ARNm. Esta similitud se atribuye a que la CP no logró la encapsidación del ARNm de la Granzima B ya que la CP probablemente se encontraba degradada tras la exposición a factores ambientales como la temperatura o a un manejo incorrecto. Asimismo, evitando la formación de las cápsides ya que las proteínas no podrían interactuar entre sí o con el ARNm.

Finalmente se repitió la generación de ARNm con los nuevos cebadores, se purificó y se procesó una nueva alícuota de CP para realizar de nuevo el ensayo de encapsidación. Las nuevas muestras de ambos componentes permitieron la formación de cápsides alrededor del ARNm provisto, obteniendo así un complejo con movilidad electroforética casi idéntica a la del virus silvestre. Ésto demostró la capacidad de la CP del CCMV para encapsidar el ARNm de la Granzima B de humano.

El análisis de viabilidad indica que las nanopartículas utilizadas en este estudio no impactan de manera relevante la viabilidad ni inducen apoptosis en linfocitos B. La comparación de los porcentajes de monocitos y linfocitos B presentando el 7AAD, con respecto a su control positivo, no expone diferencias destacadas. En cambio, los linfocitos T presentaron un incremento en el porcentaje con respecto al control negativo lo cual indica reducción de viabilidad. La presencia de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los receptores tipo Toll (TLR) y los dominios de oligomerización y unión de nucleótidos (NOD) en linfocitos T podría ser una explicación para este fenómeno. El reconocimiento de las nanopartículas por los receptores podría funcionar de manera deletérea en la ausencia de otros receptores o co-estimuladores. Diferentes combinaciones de receptores y co-estimuladores modulan la supervivencia celular, proliferación y producción de citosinas.

Con respecto a la inducción de apoptosis solamente los monocitos presentaron una mayor cantidad de eventos apoptóticos. Fenómeno que se observó solamente en las células incubadas con 0.5 μg de CCMV y aquellas con 0.5 μg de CP. La inducción de apoptosis a la concentración más baja del virus y la proteína, y no a la concentración mayor, podría deberse a la saturación de receptores para la detección del complejo viral o de la CP. En cuanto a la inducción de apoptosis, especulamos que este fenómeno ocurre debido a la naturaleza fagocítica de los monocitos, y que la captura de estos cuerpos extraños induzca la muerte celular programada.

En conjunto, los resultados indican que es necesario realizar varios ensayos más para obtener un ARNm de la GrzB íntegro, asimismo, demostrar la encapsidación de este material genético en VLPs. Ya se comprobó que la CP y el CCMV no afectan, por sí solos, la viabilidad de células sanguíneas humanas, por lo que el complejo ARNm-CP promete generar el efecto buscado en las células blanco.

6. Conclusión

La capacidad del CCMV para encapsidar material genético heterólogo funge como el paso inicial para el desarrollo de bionanopartículas funcionales. Un resultado muestra que sí es posible encapsidar el ARNm de la Granzima B en VLPs del CCMV. Sin embargo, este resultado solo se obtuvo una vez por lo cual es necesario reproducirlo.

Con la metodología planteada en este proyecto se obtuvo el ARNm de la Granzima B de humano. Asimismo, se logró la purificación del virus de la clorosis moteada del caupí y su proteína de la cápside.

La biocompatibilidad del CCMV y de su CP con células de mamífero (humano) y el mantenimiento de la viabilidad de estas células tras dicha exposición apunta a un uso prometedor de estas partículas virales en relación a sistemas biológicos, principalmente en el de mamíferos.

Las limitaciones de nuestro estudio incluyen la aplicación de las partículas en sistemas con mayor complejidad, desde murino hasta humano, determinando la biocompatibilidad de todos los componentes de la nanopartícula a corto y largo plazo según la longevidad del modelo. La utilización de un solo tipo de nanopartícula no permite percibir la increíble variedad de sistemas de encapsidación, protección y entrega para moléculas de interés. Los ensayos de viabilidad e inducción de apoptosis presentaron pocas repeticiones potencialmente generando información subjetiva.

7. Perspectivas

Procesar un mayor número de muestras en los análisis de viabilidad e inducción de apoptosis para la elaboración de análisis estadísticos relevantes. Manejar un mayor rango de concentraciones de las nanopartículas en los estudios de biocompatibilidad. Utilizar diferentes sistemas de encapsidación, funcionalizar el sistema de entrega con el motivo de lisar células diana mediante la selección de marcadores moleculares específicos, enmascarar la partícula utilizando polietilenglicol (PEG) para evitar la reacción con componentes del sistema inmune, unir péptidos de escape endosomal y de liberación del ARN mensajero para su transcripción en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Lista de referencias bibliográficas

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., and Nalbant, A. (2016). Flow cytometry: Basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1-14.
- Ali, A., and Roossinck, M. J. (2007). Rapid and efficient purification of Cowpea chlorotic mottle virus by sucrose cushion ultracentrifugation. *Journal of Virological Methods*, 141(1), 84–86.
- Allen, T. M., and Cullis, P. R. (2004). Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science (New York, N.Y.)*, 19;303(5665), 1818–1822.
- Aranda, P. S., LaJoie, D. M., and Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33(2), 366-369.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K, editors. (1992). Short protocols in molecular biology: a compendium of Methods in current protocols in molecular biology. Second edition. New York, Wiley. ISBN: 0471577359.
- Avci-Adali, M., Behring, A., Keller, T., Krajewski, S., Schlensak, C., and Wendel, H. P. (2014). Optimized conditions for successful transfection of human endothelial cells with in vitro synthesized and modified mRNA for induction of protein expression. *Journal of Biological Engineering*, 8(1), 1.
- Azizgolshani, O., Garmann, R. F., Cadena-Nava, R., Knobler, C. M., and Gelbart, W. M. (2013). Reconstituted plant viral capsids can release genes to mammalian cells. *Virology*, 441(1), 12–17.
- Bancroft, J. B., Hiebert, E., Rees, M. W., and Markham, R. (1968). Properties of cowpea chlorotic mottle virus, its protein and nucleic acid. *Virology*, 34(2), 224–239.
- Bancroft, J. B., Hills, G. J., and Markham, R. (1967). A study of the self-assembly process in a small spherical virus. Formation of organized structures from protein subunits in vitro. *Virology*, 31(2), 354–379.
- Boivin, W. A., Cooper, D. M., Hiebert, P. R., and Granville, D. J. (2009). Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 89(11), 1195–1220.
- Büyüktimkin, B., Wang, Q., Kiptoo, P., Stewart, J. M., Berkland, C., and Siahaan, T. J. (2012). Vaccine-like Controlled-Release Delivery of an Immunomodulating Peptide To Treat Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Mol. Pharmaceutics Molecular Pharmaceutics*, 9(4), 979-985.

- Cadena-Nava, R. D., Comas-Garcia, M., Garmann, R. F., Rao, a. L. N., Knobler, C. M., and 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*, 28;86(6), 3318–3326.
- Chen, Z. G. (2010). Small-molecule delivery by nanoparticles for anticancer therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 16(12), 594–602.
- Comas-Garcia, M., Cadena-Nava, R. D., Rao, a. L. N., Knobler, C. M., and Gelbart, W. M. (2012). In Vitro Quantification of the Relative Packaging Efficiencies of Single-Stranded RNA Molecules by Viral Capsid Protein. *Journal of Virology*, 86(22), 12271–12282.
- Doane TL, Burda C. (2012). “The Unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy.” *Chemical Society Reviews* 41(7): 2885-2911.
- DoB, B. (2010). Generation of an expression system for human granzyme B and analysis of the in vitro and in vivo efficiency. *Dissertation*. 1 (1), p1-112.
- Doll, T. a P. F., Raman, S., Dey, R., and Burkhard, P. (2013). Nanoscale assemblies and their biomedical applications. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 10(80), 20120740.
- Domingo-Espín, J., Unzueta, U., Saccardo, P., Rodríguez-Carmona, E., Corchero, J. L., Vázquez, E., and Ferrer-Miralles, N. (2011). *Engineered biological entities for drug delivery and gene therapy: Protein nanoparticles*. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 104, 247-298.
- Fritsch, K., Finke, J., and Grulich, C. (2013). Suppression of granzyme B activity and caspase-3 activation in leukaemia cells constitutively expressing the protease inhibitor 9. *Annals of Hematology*, 92(12), 1603-1609.
- Galdiero, S., Falanga, A., Vitiello, M., Grieco, P., Caraglia, M., Morelli, G., and Galdiero, M. (2014). Exploitation of viral properties for intracellular delivery. *Journal of Peptide Science*, 20(7), 468–478.
- Garmann, R. F., Comas-Garcia, M., Knobler, C. M., and Gelbart, W. M. (2016) Physical principles in the self-assembly of a simple spherical virus. *Accounts of chemical research*, 49(1), 48-55.
- Georgens, C., Weyermann, J., and Zimmer, A. (2005). Recombinant virus like particles as drug delivery system. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 6(1), 49–55.
- Granville, D. J. (2010). Granzymes in disease: bench to bedside. *Cell Death and Differentiation*, 17(4), 565–566.

- Gross, C., Koelch, W., DeMaio, A., Arispel, N., and Multhoff, G. (2003). Cell Surface-bound Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Mediates Perforin-independent Apoptosis by Specific Binding and Uptake of Granzyme B. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41173-41181.
- Higaki, M. (2005). Treatment of experimental arthritis with poly(D, L-lactic/glycolic acid) nanoparticles encapsulating betamethasone sodium phosphate. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(8), 1132-1136.
- Hommersom, C. a, Matt, B., van der Ham, a, Cornelissen, J. J. L. M., and Katsonis, N. (2014). Versatile post-functionalization of the external shell of cowpea chlorotic mottle virus by using click chemistry. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 12(24), 4065–9.
- Joeckel, L. T., and Bird, P. I. (2014). Are all granzymes cytotoxic in vivo? *Biological Chemistry*, 395(2), 181–202.
- Kaiser, C. R., Flenniken, M. L., Gillitzer, E., Harmsen, A. L., Harmsen, A. G., Jutila, M. a., and Young, M. J. (2007). Biodistribution studies of protein cage nanoparticles demonstrate broad tissue distribution and rapid clearance in vivo. *International Journal of Nanomedicine*, 2(4), 715–733.
- Konduru, N. V., Tyurina, Y. Y., Feng, W., Basova, L. V., Belikova, N. A., Bayir, H., . . . Kagan, V. E. (2009). Phosphatidylserine Targets Single-Walled Carbon Nanotubes to Professional Phagocytes In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE*, 4(2).
- Van Kan-Davelaar, H. E., Van Hest, J. C. M., Cornelissen, J. J. L. M., and Koay, M. S. T. (2014). Using viruses as nanomedicines. *British Journal of Pharmacology*, 171(17), 4001–4009.
- Lavelle, L., Michel, J. P., and Gingery, M. (2007). The disassembly, reassembly and stability of CCMV protein capsids. *Journal of Virological Methods*, 146(1-2), 311–316.
- Lee, L. A., and Wang, Q. (2006). Adaptations of nanoscale viruses and other protein cages for medical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2(3), 137–149.
- Lockney, D. M., Guenther, R. N., Loo, L., Overton, W., Antonelli, R., Clark, J., and Franzen, S. (2011). The red clover necrotic mosaic virus capsid as a multifunctional cell targeting plant viral nanoparticle. *Bioconjugate Chemistry*, 22(1), 67–73.
- Lorentsen, R. H., Fynbo, C. H., Thøgersen, H. C., Etzerodt, M., and Holtet, T. L. (2005). Expression, refolding, and purification of recombinant human granzyme B. *Protein Expression and Purification*, 39(1), 18–26.

- Ludwig, C., and Wagner, R. (2007). Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(6), 537–545.
- Mateu, M. G. (2010). Virus engineering: Functionalization and stabilization. *Protein Engineering, Design and Selection*, 24(1-2), 53–63.
- Molino, N. M., and Wang, S. W. (2014). Caged protein nanoparticles for drug delivery. *Current Opinion in Biotechnology*, 28, 75–82.
- Murphy, M. E. (2013). The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, 34 (6), 1181-1188.
- Paul, W. E. (2013). *Fundamental immunology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins.
- Rao, A Duggal, R Lahser, F and Hall, T. (1994). Analysis of RNA replication in plant virus. *Methods in molecular genetics*, 4, p216-236.
- Rees, P. (2013). Uptake and toxicology of nanoparticles. *Frontiers of Nanoscience*, 1(5), 123-138.
- Rousalova, I., and Krepela, E. (2010). Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (Review). *International Journal of Oncology*, 37(6), 1261–1269.
- Roy, R., Kumar, S., Tripathi, A., Das, M., and Dwivedi, P. D. (2014). Interactive threats of nanoparticles to the biological system. *Immunology Letters*, 158(1-2), 79–87.
- Shi, L., Keefe, D., Durand, E., Feng, H., Shi, L., Keefe, D., and Lieberman, J. (2005). Granzyme B Binds to Target Cells Mostly by Charge and Must Be Added at the Same Time as Perforin to Trigger Apoptosis. *The Journal of Immunology*, 174(9), 5456–5461.
- Singh, P., Prasuhn, D., Yeh, R. M., Destito, G., Rae, C. S., Osborn, K., and Manchester, M. (2007). Bio-distribution, toxicity and pathology of cowpea mosaic virus nanoparticles in vivo. *Journal of Controlled Release*, 120(1-2), 41–50.
- Speir, J. a, Munshi, S., Wang, G., Baker, T. S., and Johnson, J. E. (1995). Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure (London, England : 1993)*, 15;3(1), 63–78.
- Stanley, S. (2014). Biological nanoparticles and their influence on organisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 28, 69–74.
- Steinmetz, N., and Manchester, M. (2011). *Viral Nanoparticles: Tools for Materials Science and Biomedicine*. First edition. Singapore: Pan Stanford Publishing Pte. Ltd. ISBN: 9789814267458

- Van Kan-Davelaar, H. E., Van Hest, J. C. M., Cornelissen, J. J. L. M., and Koay, M. S. T. (2014). Using viruses as nanomedicines. *British Journal of Pharmacology*, *171*(17), 4001–4009.
- Wang, Q., Lin, T., Tang, L., Johnson, J. E., and Finn, M. G. (2002). Icosahedral virus particles as addressable nanoscale building blocks. *Angewandte Chemie - International Edition*, *41*(3), 459–462.
- Wen, A. M., Rambhia, P. H., French, R. H., and Steinmetz, N. F. (2013). Design rules for nanomedical engineering: From physical virology to the applications of virus-based materials in medicine. *Journal of Biological Physics*, *39*(2), 301–325.
- Wu, Z., Chen, K., Yildiz, I., Dirksen, A., Fischer, R., Dawson, P. E., and Steinmetz, N. F. (2012). Development of viral nanoparticles for efficient intracellular delivery. *Nanoscale*, *4*(11), 3567.
- Wu, Y., Yang, H., and Shin, H. J. (2013). Viruses as self-assembled nanocontainers for encapsulation of functional cargoes. *Korean Journal of Chemical Engineering*, *30*(7), 1359–1367.
- Wu, Y., Yang, H., and Shin, H. J. (2014). Encapsulation and crystallization of Prussian blue nanoparticles by cowpea chlorotic mottle virus capsids. *Biotechnology Letters*, *36*(19), 515–521.
- Yildiz, I., Shukla, S., and Steinmetz, N. F. (2011). Applications of viral nanoparticles in medicine. *Current Opinion in Biotechnology*, *22*(6), 901–908.
- Zeng, Q., Wen, H., Wen, Q., Chen, X., Wang, Y., Xuan, W., and Wan, S. (2013). Cucumber mosaic virus as drug delivery vehicle for doxorubicin. *Biomaterials*, *34*(19), 4632–4642.
- Zochowska, M., Piguet, A.-C., Jemielity, J., Kowalska, J., Szolajska, E., Dufour, J.-F., and Chroboczek, J. (2015). Virus-like particle-mediated intracellular delivery of ARNm cap analog with in vivo activity against hepatocellular carcinoma. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *11*(1), 67-76.

Anexo

A1. Soluciones y amortiguadores

Amortiguador de desensamblaje - Aforar a 1 L con agua destilada.

Reactivo	Concentración (mM)
CaCl	500
Tris-HCl, pH 7.5	50
EDTA, pH 8	1
DTT	1
PMSF	0.5

Amortiguador de ensamble - Aforar a 1 L con agua destilada.

Reactivo	Concentración (mM)
NaCl	50
Tris-HCl, pH 7.2	50
KCl	1
MgCl	1

Amortiguador de proteína – Aforar a 1 L con agua destilada.

Reactivo	Concentración (mM)
NaCl	1000
Tris-HCl, pH 7.2	20
EDTA	1
DTT	1
PMSF	1

Amortiguador de extracción – Aforar a 1L con agua destilada.

Reactivo	Concentración (mM)
Acetato de sodio	500
Acetato de magnesio	80
Ácido acético glacial	a pH 4.5

Amortiguador de suspensión – Aforar a 1L con agua destilada.

El amortiguador de suspensión es 1/10 amortiguador de extracción. Para prepararlo solamente tomar 100 mL de amortiguador de extracción y aforar a 1 L con agua destilada.

Medio Luria-Bertani – Aforar a 1 L con agua destilada.

Reactivo	Cantidad
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

* Para preparar agar LB solo añadir agar a una concentración final de 1.5%

A2. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que nos permite analizar células individuales en suspensión. Los equipos para realizarla cuentan con tres componentes principales: un sistema de fluidos, un sistema óptico y un sistema electrónico. Un ejemplo común de su uso es el análisis de una muestra de sangre periférica. Al pasar por el aparato, cada célula del tejido sanguíneo es analizada principalmente en cuanto a su tamaño y su complejidad interna. La siguiente figura muestra los componentes generales de un citómetro de flujo.

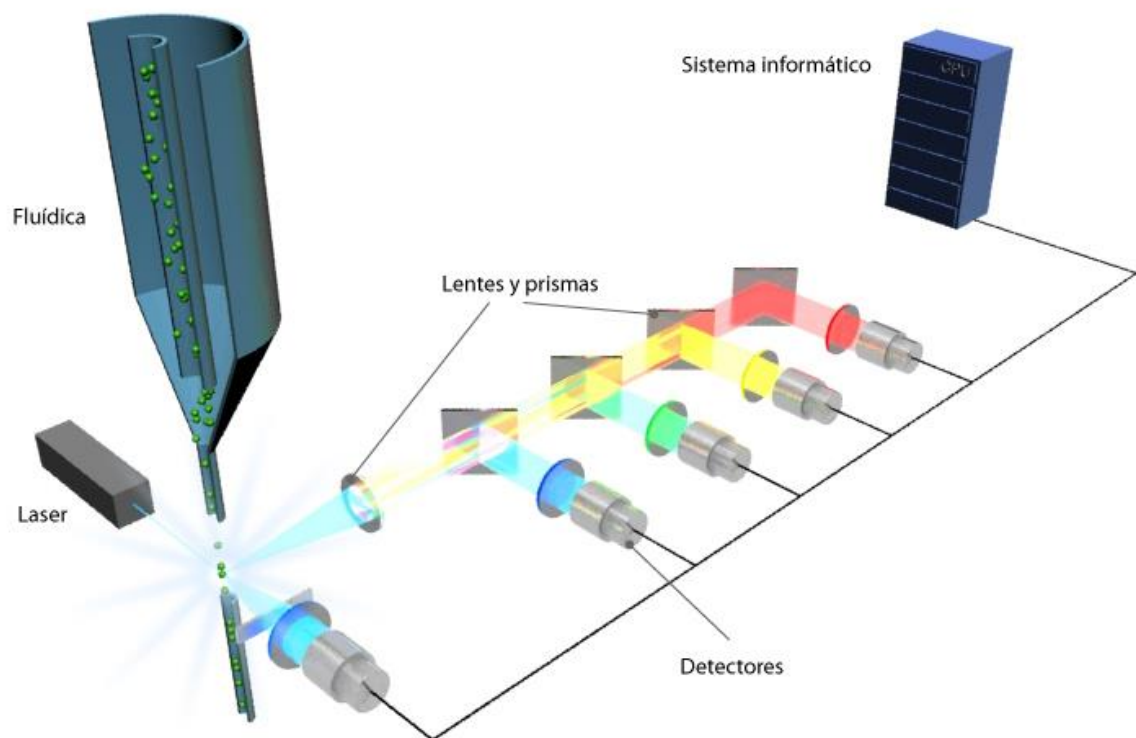


Figura 17. Componentes generales de un citómetro de flujo. Las células son dirigidas, mediante el sistema de fluidos, a una celda de interrogación para su análisis. Al pasar por el láser se determina tamaño, complejidad interna y cualquier otro marcaje utilizado por el usuario. Los lentes y prismas dirigen la luz a sus respectivos detectores que relevan la información al sistema informático.

La variable de “forward scatter” o de dispersión delantera determina el tamaño de la célula según la dispersión de luz detectada. La variable de “side scatter” o dispersión lateral detecta la complejidad interna de las células. El detector de la dispersión lateral normalmente se ubica en un ángulo de 90 grados con respecto a la luz del láser incidente. Entre mayor sea la complejidad interna, mayor la dispersión de luz en ángulo. Para determinar la presencia de otras moléculas se emplean anticuerpos y moléculas fluorescentes, aspecto que resulta relevante para la

utilización de esta técnica ya que, mediante un citómetro de flujo, se puede detectar prácticamente cualquier molécula para la que exista un anticuerpo acoplado a un fluorocromo.

Si retomamos el ejemplo del análisis de una muestra sanguínea, con el citómetro de flujo se pueden distinguir, basados en su tamaño y complejidad interna, diferentes grupos celulares. Encontramos eritrocitos, granulocitos, linfocitos, y monocitos por mencionar algunos tipos celulares. La citometría incluso nos permite diferenciar, gracias al marcaje con anticuerpos específicos, entre linfocitos como los linfocitos B y linfocitos T, o entre granulocitos como los neutrófilos, eosinófilos o basófilos. La capacidad del citómetro de excitar moléculas, que al ser irradiadas con longitudes de onda en rangos específicos emiten luz (fluoróforos o cromóforos) nos permite el uso de anticuerpos unidos a estas moléculas fluorescentes. La alta afinidad y especificidad de los anticuerpos es utilizada para marcar moléculas únicas en cada tipo celular como el CD19 de los linfocitos B o el CD3 de los linfocitos T. Así, al pasar las células marcadas con nuestro complejo anticuerpo-fluoróforo por el citómetro, darán una señal de un color para las CD19 (linfocitos B) y otra de diferente color para las CD3 (linfocitos T). Un ejemplo de la información que proporciona el citómetro de flujo se muestra a continuación.

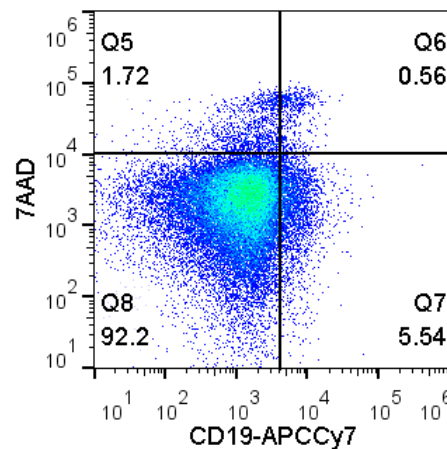


Figura 18. Análisis de células marcadas con anticuerpos anti-CD19 y 7AAD. El 7-aminoactinomicina-D (7AAD) es una molécula de alta afinidad por al ADN incapaz de pasar por la membrana celular de una célula funcional. Las células marcadas con 7AAD son células muertas. Las células marcadas como CD19 son linfocitos B. El cuadrante nos permite determinar qué células son positivas tanto para el eje de las “y” (7AAD) como para el eje de las “x” (CD19). Todas las células en los cuadrantes “Q5” y “Q6” son positivas para el 7AAD pero sólo las del cuadrante “Q6” son positivas para el CD19. Todas las células de los cuadrantes “Q6” y “Q7” son positivas para el CD19 pero solo las del cuadrante “Q6” lo son para el 7AAD. Las células del cuadrante “Q8” son negativas para ambos marcadores.

La citometría de flujo es una técnica con infinidad de aplicaciones que nos permite distinguir entre una mezcla heterogénea, diferentes partículas (células) dentro de una misma muestra. Al utilizar la citometría incluso podemos detectar la presencia de moléculas dentro y fuera de las células empleando el procedimiento y los marcadores apropiados. Aplicar combinaciones de marcadores de manera correcta permite análisis multivariados que nos permite identificar qué célula dentro de la muestra expresa alguna molécula particular y en qué proporción (Adan *et al.*, 2016).

A3. Efecto del CCMV y su CP sobre otras células mononucleares.

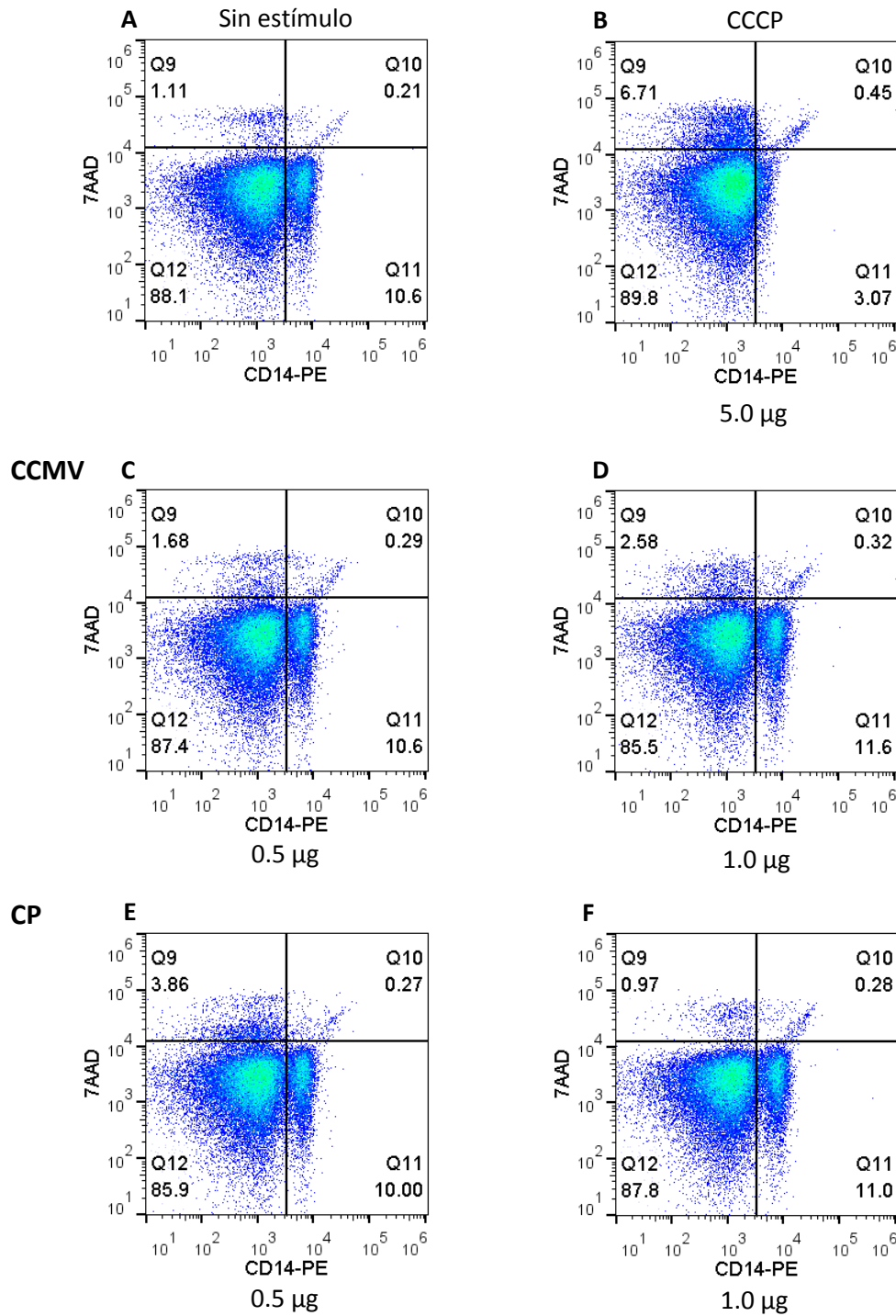


Figura 19. Viabilidad de PBMCs incubadas con CCMV y CP. Porcentaje de monocitos (CD14⁺) teñido con 7AAD después de ser incubados por 24 horas con: 0.5 µg y 1.0 µg de CCMV (C y D) y CP (E y F). 7AAD: 7-aminoactinomicina D, CCCP: Carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona.

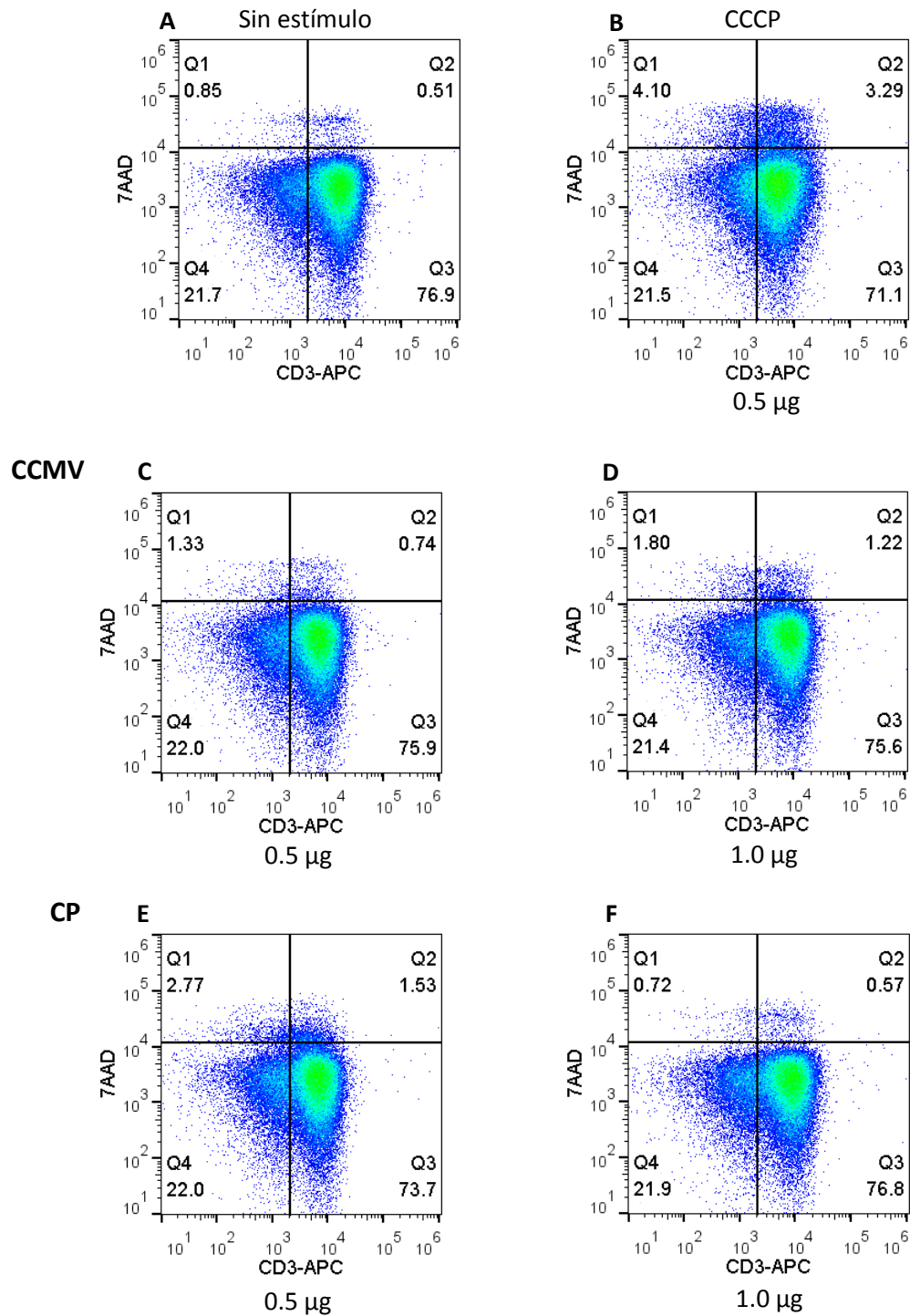


Figura 20. Viabilidad de PBMCs incubadas con CCCMV y CP. Porcentaje de linfocitos T (CD3⁺) teñido con 7AAD después de ser incubados por 24 horas con: 0.5 µg y 1.0 µg de CCMV (C y D) y CP (E y F). 7AAD: 7-aminoactinomicina D, CCCP: Carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona.

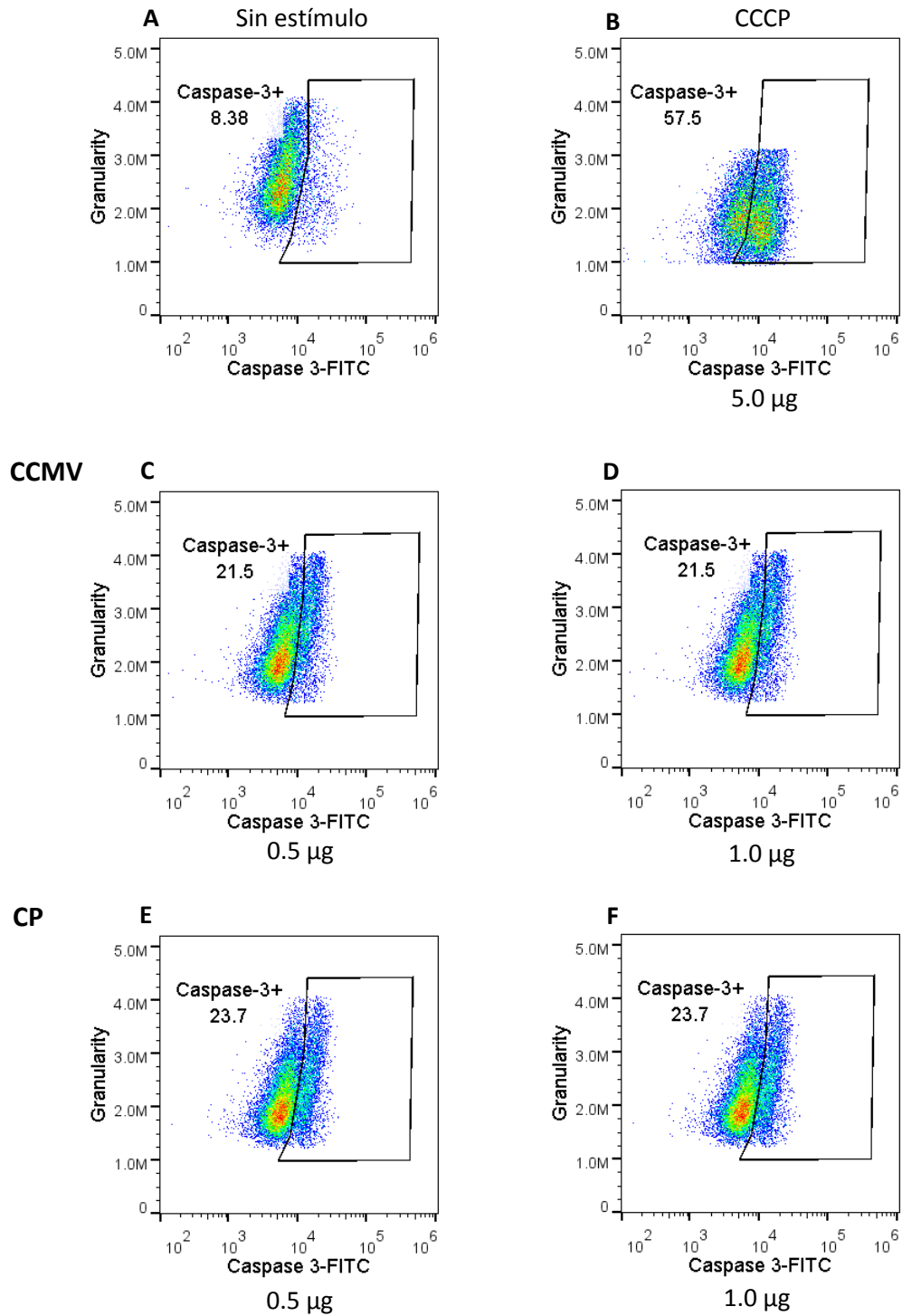


Figura 21. Apoptosis en PBMCs incubadas con CCCMV y CP. Porcentaje de monocitos (CD14⁺) marcados con anti-human active caspase-3, 24 horas post-incubación con: 0.5 μ g y 1.0 μ g de CCMV (C y D) y CP (E y F). CCCP: Carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona.