

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



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Producción de bionanorreactores mitodirigidos con actividad
timidina fosforilasa para el potencial tratamiento del síndrome
de encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial
(MNGIE)**

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

Presenta:

Angélica Hernández González

Ensenada, Baja California, México
2021

Tesis defendida por
Angélica Hernández González

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Director de tesis

Dra. Kanchan Chahuan

Dr. Óscar González Davis

Dra. Carolina Álvarez Delgado

Dra. Patricia Juárez Camacho



Dr. Juan Manuel Romo Herrera
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Angélica Hernández González © 2021
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 **Angélica Hernández González** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestra en Ciencias en Nanociencias.

Producción de bionanorreactores mitodirigidos con actividad timidina fosforilasa para el potencial tratamiento del síndrome de encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE)

Resumen aprobado por:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Director de tesis

En el presente trabajo se produjeron nanorreactores enzimáticos conteniendo a la enzima timidina fosforilasa (TP) en partículas tipo virus (VLPs) derivadas del virus del mosaico del bromo (BMV). La enzima fue funcionalizada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) con el doble propósito de mejorar su carga superficial y monitorear la localización mitocondrial (mitodirección) de las cápsides por microscopía confocal.

La encapsidación enzimática se realizó mediante una reacción de autoensamble en diálisis utilizando la proporción molar 3.6:1 de enzima modificada (TP-FITC) por proteína de cápside (CP). Los nanorreactores fueron purificados por ultracentrifugación y caracterizados mediante espectroscopía de dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se sintetizó el compuesto bromuro de (2-carboxietil)trifenilfosfonio (2CETPP) para la funcionalización de los nanorreactores con el fin de dirigirlos a mitocondrias en cultivos celulares de hepatocitos murinos AML-12. El compuesto sólido resultante fue purificado y caracterizado mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), cromatografía líquida de alta resolución (LC-MS) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). Finalmente, se llevó a cabo un ensayo de mitodirección *in vitro* utilizando 1.3×10^7 nanorreactores (TP_{FITC}-BMV-TPP) por célula. Las mitocondrias fueron marcadas con Mito-ID Red y la co-localización de las señales de FITC y Mito-ID fue observada a través de microscopía confocal determinando el porcentaje de correlación comparado con nanorreactores sin funcionalizar.

Palabras clave: Nanorreactores, partículas tipo virus, timidina fosforilasa, MNGIE.

Abstract of the thesis presented by **Angélica Hernández González** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanosciences.

Mitochondria-targeted bionanoreactors containing thymidine phosphorylase activity for the potential treatment of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome (MNGIE).

Abstract approved by:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Thesis Director

The focus of this work was the production of enzymatic nanoreactors containing the enzyme thymidine phosphorylase (TP) inside virus-like particles (VLPs) derived from the brome mosaic virus (BMV). We report the enzymatic functionalization using fluorescein isothiocyanate (FITC) with a dual purpose: improve the negative surface charge of TP, and monitoring the mitochondrial localization (mitodirection) of the capsids by confocal microscopy. Enzyme encapsidation was carried out by a self-assembly reaction in dialysis using the 3.6: 1 molar ratio of functionalized enzyme (TP_{FITC}) per capsid protein (CP) respectively.

Once assembled, nanoreactors were purified by ultracentrifugation and characterized by dynamic light scattering spectroscopy (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). We describe the synthesis of (2-carboxyethyl) triphenylphosphonium bromide (2CETPP) to functionalize nanoreactors and direct them to mitochondria. The resulting solid compound was purified and analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), high-performance liquid chromatography (LC-MS), and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR).

Finally, an *in vitro* mitochondrial targeting assay was carried out using the murine hepatocytes AML-12 cell line with 1.3×10^7 nanoreactors (TP_{FITC}-BMV-TPP) per cell. Mitochondria were marked with Mito-ID Red and co-localization of the FITC and Mito-ID signals was observed through confocal microscopy, obtaining a high correlation percentage when compared with the non-functionalized nanoreactors.

Keywords: Nanoreactors, virus-like particles, thymidine phosphorylase, MNGIE.

Dedicatoria

A la niña llena de curiosidad que fui y a las personas que me alentaron a cuestionar desde entonces, especialmente a mis padres, Silvia y Miguel Ángel, y a mi hermana, Jessica.

Agradecimientos

Esta tesis es el resultado de mi formación hasta el momento, en la que han contribuido más instituciones y personas de las que aquí se mencionan, con las que les estoy profundamente agradecida.

Me gustaría comenzar agradeciendo a **mis padres y a mi hermana**, por todo el impulso, por creer en mí y por su inagotable amor, gracias infinitas. Esto no hubiera sido posible sin ustedes.

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCACyT)** por otorgarme la beca para realizar mis estudios de maestría y financiar el proyecto Nano-vehículos biocatalíticos para usos médicos (IFC-1).

Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)** y al **Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN)** de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por las instalaciones, los equipos y los cursos impartidos para que este proyecto pudiera llevarse a cabo.

A mi director de tesis, el **Dr. Rafael Vázquez Duhalt** por la confianza desde el inicio y, por no escatimar en el apoyo para la culminación de este proyecto y en mi crecimiento como profesional. Gracias por su tiempo y por el gusto de trabajar con usted. Me llevo como inspiración su liderazgo científico lleno de sentido humano.

A mis sinodales la **Dra. Kanchan Chauhan**, el **Dr. Óscar González**, la **Dra. Carolina Álvarez** y la **Dra. Patricia Juárez** por su entera disposición para escuchar con atención mis dudas y explicaciones en el laboratorio. Así como por las observaciones, críticas y aportaciones experimentales que moldearon este proyecto.

A la **Dra. Ma. Verónica Villagrana**, la **Dra. Ana Hernández** y el **Dr. Andrés Zárate**, por compartir sus reactivos, su extenso conocimiento en técnicas y por constantemente buscar formas para apoyarme personal y profesionalmente. Gracias en especial por su amistad, consejos y paciencia.

A la técnico **M.A. Itandehui Betanzo**, por las charlas, consejos y su disposición incondicional para apoyarme con equipos y reactivos.

A los técnicos **Francisco Ruíz** de la UNaC del CNyN y el **Dr. Diego Delgado** del LNMA del CICESE por la caracterización microscópica y enseñanzas en técnicas de microscopía.

A **David Laín**, mi novio y mejor amigo, por las visitas, el apoyo constante y el amor que implicó estar conmigo a la distancia. Gracias por compartir este viaje conmigo desde el día cero.

A mis compañeros de maestría y amigos incondicionales: **Nereida, Laura, Jonathan, Alicia, Alan, Miryam, Joaquín, Erick, Gustavo, Paloma y César** por todas las pláticas, películas, cafés, risas y momentos de catársis, dentro y fuera del salón de clase. Los quiero mucho y me los llevo en el corazón.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
 Capítulo 1. Introducción	 1
1.1 Antecedentes.....	4
1.1.1 Encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial.....	4
1.1.2 Etiología molecular.....	4
1.1.3 Tratamientos.....	8
1.1.3.1 Terapia de reemplazo enzimático.....	8
1.1.3.2 Nanorreactores, propiedades y aplicaciones enzimáticas.....	9
1.1.3.3 Partículas tipo virus.....	10
1.1.3.4 Virus del mosaico del bromo.....	10
1.1.4 Mitodirección.....	11
1.2 Justificación.....	12
1.3 Hipótesis.....	12
1.4 Objetivos.....	13
1.4.1 Objetivo general	13
1.4.2 Objetivos específicos.....	13
 Capítulo 2. Metodología	 14
2.1 Producción de partículas tipo virus (VLPs).....	14
2.1.1 Expresión del virus BMV.....	14
2.1.2 Extracción de viriones.....	14
2.1.3 Purificación de partículas virales.....	15
2.1.4 Caracterización de las cápsides virales.....	16
2.1.5 Desensamble y recuperación de proteína de cápside (CP-BMV).....	16

2.2 Caracterización y funcionalización de la enzima timidina fosforilasa.....	17
2.2.1 Funcionalización de la enzima con isotiocianato de fluoresceína (FITC).....	17
2.2.2 Análisis por espectroscopía de dispersión dinámica de luz.....	17
2.2.3 Cinética enzimática.....	18
2.3 Obtención, caracterización y funcionalización de nanorreactores (TP _{FITC} -BMV).....	18
2.3.1 Ensamble de nanorreactores (TP _{FITC} -BMV)	18
2.3.2 Purificación de los nanorreactores	18
2.3.3 Caracterización de los nanorreactores por dispersión dinámica de luz y microscopía electrónica de transmisión.....	19
2.3.4 Cuantificación de nanorreactores por densitometría.....	19
2.4 Síntesis y caracterización del derivado de trifenilfosfonio.....	20
2.4.1 Síntesis del (2-carboxietil) bromuro de trifenilfosfonio (2CETPP)	20
2.4.2 Caracterización por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.....	20
2.4.3 Caracterización por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas...	20
2.4.4 Caracterización por resonancia magnética nuclear.....	20
2.5 Funcionalización de los nanorreactores con trifenilfosfonio (TP _{FITC} -BMV-TPP).....	21
2.5.1 Caracterización de la carga y tamaño de los nanorreactores funcionalizados.....	21
2.5.2 Ensayo de mitodirección en cultivo celular.....	21
Capítulo 3. Resultados	23
3.1 Diámetro hidrodinámico y carga de la enzima.....	23
3.1.1 Timidina fosforilasa.....	23
3.1.2 Timidina fosforilasa funcionalizada con FITC.....	24
3.2 Parámetros cinéticos de la enzima.....	25
3.3 Nanorreactores enzimáticos (TP _{FITC} -BMV).....	26
3.4 Nanorreactores enzimáticos (TP _{FITC} -BMV) purificados.....	26
3.4.1 Microscopía electrónica de transmisión de los nanorreactores (TP _{FITC} -BMV).....	27
3.5 Análisis densitométrico en gel de poliacrilamida	28
3.6 Caracterización del compuesto (2-carboxietil) bromuro de trifenilfosfonio.....	30
3.6.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.....	30
3.6.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.....	32
3.6.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.....	33
3.7 Funcionalización de los nanorreactores.....	35

3.8 Ensayo de mitodirección de nanorreactores.....	35
Capítulo 4 . Discusión.....	38
Capítulo 5 . Conclusiones.....	43
Literatura citada.....	45
Anexos.....	54

Lista de figuras

Figura		Página
1	Estructura de la timidina fosforilasa	5
2	Reacción catalizada por la timidina fosforilasa.....	6
3	Vías de síntesis de nucleótidos: <i>de novo</i> y recuperación.....	7
4	Patrón de infección BMV	14
5	Colchón de sacarosa.....	15
6	Tamaño de la enzima timidina fosforilasa	23
7	Potencial Z de la enzima timidina fosforilasa.....	23
8	Tamaño de la enzima timidina fosforilasa funcionalizada (TP _{FITC}).....	24
9	Potencial Z de la enzima timidina fosforilasa funcionalizada (TP _{FITC}).....	24
10	Cinética de la enzima timidina fosforilasa.....	25
11	Tamaño de los nanorreactores.....	26
12	Tamaño de los nanorreactores purificados.....	27
13	Micrografía electrónica de transmisión de los nanorreactores.....	27
14	Densitometría de la enzima TP.....	28
15	Densitometría de la proteína de cápside del BMV.....	28
16	Cuantificación de la enzima TP.....	29
17	Cuantificación de la proteína de cápside del BMV.....	29
18	Reacción de síntesis 2CETPP.....	30
19	Espectro infrarrojo del compuesto 2CETPP	31
20	Espectro de RMN del compuesto 2CETPP.....	32
21	Masa molecular del compuesto 2CETPP.....	34
22	Espectro de masas del compuesto 2CETPP.....	34
23	Carga superficial de los nanorreactores funcionalizados.....	35

24	Micrografías de las células AML-12 en ensayo de co-localización.....	36
25	Análisis de correlación FITC-Mito-ID.....	37
26	Inhibición de la actividad enzimática.....	42
27	Micrografía electrónica del virus BMV nativo	54
28	Sobrenadante concentrado de la purificación de VLPs.....	54
29	Resultados de reacción de ensamble no exitosa.....	55

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Densitometría de la proteína de cápside (CP) y la enzima timidina fosforilasa (TP).....	19
2	Parámetros cinéticos de la enzima timidina fosforilasa (K_M y k_{cat}).....	25
3	Señales en el infrarrojo del (2-carboxietil) bromuro de trifenilfosfonio.....	31

Capítulo 1. Introducción

En la actualidad, a partir del desarrollo de tecnologías que engloban a las áreas de bioquímica, biología molecular y genética, se encuentran reportados miles de mecanismos celulares asociados a diversas patologías que van desde la autoinmunidad hasta las infecciones causadas por parásitos.

Los avances en el conocimiento de la estructura e interacción de las principales biomoléculas, que comprenden a los ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas y lípidos, han permitido realizar diversas aproximaciones genéticas y metabólicas para dilucidar el origen de un gran número de padecimientos, considerando a dichas moléculas como engranajes cuya ausencia o fallo puede estar directamente vinculado con un estado de desequilibrio a nivel sistémico y potencialmente derivar en alguna enfermedad.

A pesar de que no todas las enfermedades pueden relacionarse con un sólo factor, como es el caso del cáncer o la diabetes (Bansal y Silakari, 2014), la capacidad de encontrar esas alteraciones a nivel molecular ha impactado de forma significativa al área de la fabricación de medicamentos, haciéndolos cada vez más seguros, eficaces y selectivos.

Si bien los ácidos nucleicos están catalogados como las macromoléculas diana para tratamientos innovadores como la terapia génica (Gonçalves y Paiva, 2017), las proteínas son en realidad el grupo más diverso a nivel biológico y, por tanto, el que lleva a cabo de forma directa, una gran variedad de funciones que regulan la homeóstasis del cuerpo (Grandi y Bantscheff, 2019). Es por ello que muchos tratamientos están orientados a subsanar la falta o deficiencia de estas moléculas (Crunkhorn, 2013; Gorzelany y De Souza, 2013).

Entre las funciones más críticas que desempeñan las proteínas, destaca la catálisis de la mayoría de las reacciones presentes en los seres vivos, acción que es efectuada gracias a un grupo denominado enzimas (Cooper, 2000). Las enzimas son moléculas orgánicas que se encargan de acelerar la velocidad de una o más reacciones mediante la disminución de la energía de activación (Robinson, 2015).

A nivel terapéutico, las enzimas cumplen un papel fundamental en la búsqueda de dianas moleculares y desarrollo de fármacos, debido a su gran afinidad y especificidad por sustratos en el organismo. A su vez, el conocimiento de los productos y la tasa de conversión de sustratos permiten tener un mayor control sobre las reacciones promovidas, haciendo posible un diseño de fármacos más selectivos (Vellard, 2003).

Gracias a la biotecnología, los procesos de descubrimiento, producción y el mantenimiento de enzimas en la industria se han visto notablemente beneficiados desde hace aproximadamente 60 años (Vellard, 2003; Lobedanz et al., 2016). Como ejemplo de ello, se tiene la implementación de un tratamiento conocido como **terapia de reemplazo enzimático (TRE)** que consiste en la administración exógena de una enzima que es deficiente o está ausente en el organismo. Este concepto fue inicialmente sugerido por el doctor Christian de Duve en 1964, para la atención de enfermedades de almacenamiento lisosómico (Desnick y Schuchman, 2012).

No obstante, fue hasta noviembre de 1987 que la primera enzima recombinante fue aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), denominada alteplasa, bajo el nombre comercial Activase® (U.S. FDA, 2020), indicada para el tratamiento de ataques cardíacos (Xu, 2020). A partir de dicho evento, numerosas enzimas han sido producidas mediante tecnología de ADN recombinante en diversos sistemas biológicos con el fin de ampliar el rango de padecimientos a tratar. Entre muchos ejemplos, destaca la aprobación de Adagen® en 1990, una adenosina desaminasa pegilada (pegademasa) obtenida de bovino utilizada para el tratamiento de la inmunodeficiencia combinada severa (SCID, por sus siglas en inglés), la cual se convertiría en la primera aplicación exitosa de TRE para una enfermedad hereditaria (AMGEN, s.f.).

Posteriormente, las dificultades relacionadas al costo, tiempo de vida media de la pegademasa en el organismo (3-6 días) y, la subsecuente necesidad de aplicar frecuentes inyecciones intramusculares para asegurar los niveles apropiados de actividad enzimática, llevaron a investigadores como Bax et al. (2000) a cuestionar el uso del polietilenglicol (PEG) y proponer un sistema basado en eritrocitos como acarreadores moleculares de enzimas.

Contrario a la simplicidad que supone la administración exógena de una enzima que es deficiente en el organismo, existen diversos factores como la seguridad y la selectividad del sistema implementado que, como para cualquier otro fármaco, deben ser considerados al desarrollar terapias enzimáticas. Como ejemplo de ello se tiene el uso de la glucosilceramidasa para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher. Debido a que la glucosilceramidasa descrita en 1974 se acumulaba en hepatocitos y no en macrófagos, fue necesario realizar la desglicosilación secuencial de las cadenas de oligosacáridos de dicha enzima (Barton et al., 1991). Esta modificación dio lugar a la aprobación de la alglucerasa como medicamento en 1991, bajo el nombre de Ceredase® (Vellard, 2003), generando así la primera terapia dirigida de reemplazo enzimático.

A su vez, uno de los grandes retos de la farmacología es mejorar la farmacodinamia y aumentar la vida media de fármacos en el organismo, con el fin de reducir las reacciones secundarias derivadas de las altas concentraciones de medicamentos en el cuerpo y, los costos asociados con su aplicación recurrente. Tomando en cuenta las necesidades antes descritas, surge la nanomedicina como una alternativa para el diseño de fármacos dirigidos, con el objetivo de mejorar su estabilidad y biodistribución (Boisseau y Loubaton, 2011) y así disminuir las dosis suministradas a los pacientes. La encapsulación de enzimas y otros compuestos bioactivos en estructuras nano y micrométricas como liposomas, polímeros sintéticos o eritrocitos, ha representado un avance significativo para el desarrollo de fármacos dirigidos en las últimas décadas. Entre ellos, destaca un grupo de acarreadores moleculares basados en ingeniería viral denominado “partículas tipo virus” (VLPs, por sus siglas en inglés), formadas a partir de cápsides virales sin capacidad replicativa que se ensamblan de manera espontánea partiendo de proteínas estructurales (Hema et al., 2018).

Estas nanoestructuras son expresadas en sus hospederos naturales por medio de infecciones comunes o en sistemas de expresión heterólogos; gracias a su morfología, su capacidad de autoensamblaje y la posibilidad de modificar la fisicoquímica de su superficie, han sido consideradas como plataformas prometedoras para el desarrollo de vacunas (Fietze et al., 2016), acarreadores moleculares (Rohovie et al., 2017) y nanorreactores (Koyani et al., 2017).

Los nanorreactores son estructuras nanométricas destinadas a confinar y proporcionar las condiciones necesarias para llevar a cabo una reacción. Entre las ventajas del uso de VLPs respecto a la terapia proporcionada mediante enzimas en su forma “libre” se consideran: el mejoramiento de la actividad catalítica, la protección contra la degradación enzimática y la resistencia a condiciones adversas del medio (Patterson et al., 2012).

Debido a que el padecimiento abordado en este trabajo puede ser tratado administrando la enzima timidina fosforilasa (TP) exógena, en este trabajo se propuso el diseño de nanorreactores a partir de cápsides del virus del mosaico del bromo (BMV, Bromovirus, Bromoviridae). Con la finalidad de proteger a la enzima y generar, a largo plazo, una terapia más selectiva que contrarreste el desarrollo de la enfermedad conocida como encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial

La encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial es una enfermedad autosómica recesiva que fue descrita por primera vez en 1976 por Okamura et al. (1976) en un paciente de 22 años de edad. Desde entonces se le ha definido como un padecimiento ultra raro con una prevalencia de 1-9 personas en 1 millón, de acuerdo con estimaciones europeas (Orphanet, 2021). Cuyo cuadro clínico consiste típicamente en manifestaciones gastrointestinales y neurológicas, tales como caquexia, neuropatía periférica, oftalmoplejía, leucopatía, dismotilidad gastrointestinal y ptosis, entre otras (Hirano et al., 1994; Scarpelli et al., 2012).

A través de estudios histopatológicos en biopsias de tejido muscular proveniente de diversos pacientes, este padecimiento fue asociado con irregularidades estructurales en las mitocondrias. Aunado a esto, la deficiencia de actividad de la citocromo c oxidasa y otras enzimas de la cadena respiratoria sugerían un daño funcional confirmado posteriormente mediante análisis genómicos, estableciendo que el deterioro parcial y las múltiples deleciones del material genético mitocondrial, eran consistentes con la alteración de un mecanismo que regula la integridad del ADN mitocondrial (Papadimitriou et al., 1998).

Sin embargo, fue hasta finales de los años 90 cuando, a través del mapeo genómico de diversas familias y el estudio de las mutaciones en los posibles fragmentos responsables de esta enfermedad, fue dilucidada la causa molecular (Hirano et al., 1998) que relaciona la disminución en la producción de la enzima timidina fosforilasa (2.4.2.4) con mutaciones en el gen nuclear *TYMP* en el locus 22q13.32-qter (Nishino et al., 1999).

1.1.2 Etiología molecular

La enzima citoplasmática timidina fosforilasa (TP) (**Fig. 1**) es una pentosiltransferasa, compuesta por dos subunidades homodiméricas cuyo peso molecular oscila alrededor de los 110 kDa en mamíferos y 90 kDa en *E. coli* (Pugmire et al., 1998). En el organismo humano está presente en diversos tejidos, incluidos el tracto gastrointestinal, el sistema nervioso central y periférico, el bazo, el hígado, la vejiga, los leucocitos

y las plaquetas (Pacitti, 2018). Su función ha sido reportada como esencial para la regulación del metabolismo de desoxinucleótidos (Shaw et al., 1988).

La TP cataliza la fosforilación de los nucleósidos de desoxitimidina (dTd) y desoxiuridina (dUd) para la formación de timina y uracilo, respectivamente. Estos productos son utilizados en reacciones posteriores, particularmente para la formación de ADN nuclear y mitocondrial (Boschetti et al., 2014) (**Fig. 2**), a través de dos rutas conocidas como vía de síntesis *de novo* y vía de recuperación (Hubert y Sutton, 2017). De manera específica, la timidina fosforilasa juega un papel fundamental en la ruta metabólica de recuperación de nucleósidos y en el reciclaje de bases de pirimidina regulando su disponibilidad para la biosíntesis de ADN (Pacitti, 2018)

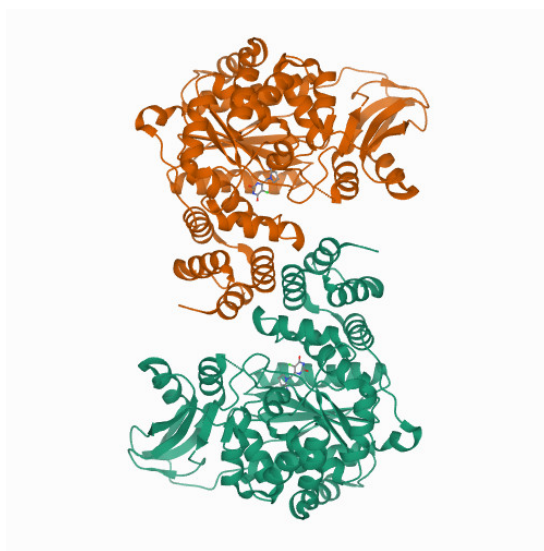


Figura 1. Estructura de la timidina fosforilasa. Representación tridimensional de la enzima timidina fosforilasa humana en estado dimérico. Obtenida de PDB databank, código: 1UOU.

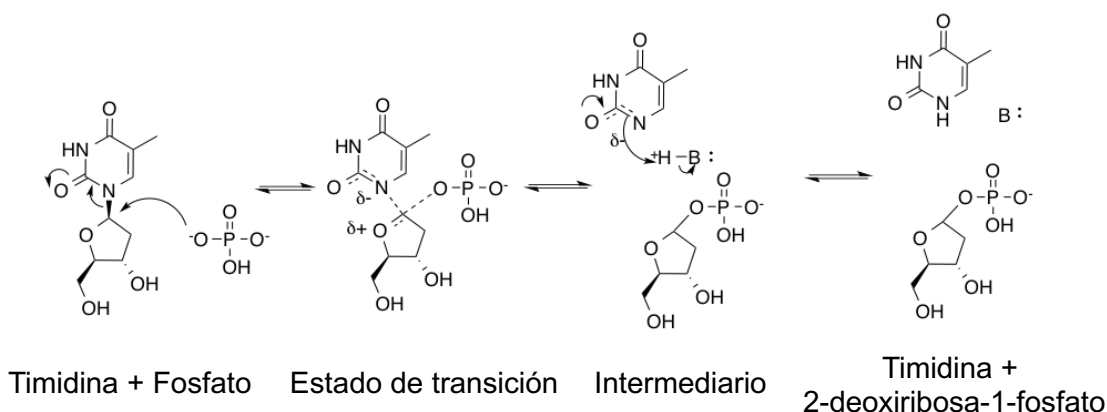
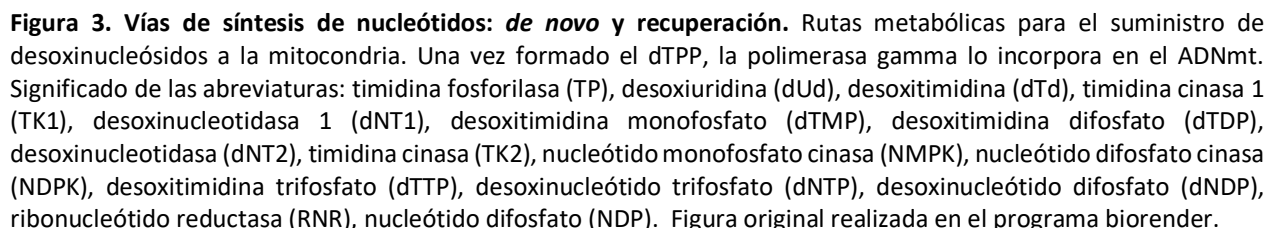


Figura 2. Reacción catalizada por la timidina fosforilasa. Diagrama de la catálisis enzimática mediada por timidina fosforilasa para la degradación de la timidina. Figura modificada del sitio BRENDA. Código de la enzima: EC 2.4.2.4.

Una deficiencia en la actividad enzimática (<5% de la actividad normal de un individuo) da como resultado concentraciones elevadas de timidina y desoxiuridina en tejidos y fluidos corporales (Pacitti, 2018) que en consecuencia generan un desequilibrio en el conjunto de desoxirribonucleósidos dentro de la célula, lo que conduce a una replicación deteriorada del ADN. No obstante, el ADN mitocondrial (ADNmt) resulta más sensible a una disminución enzimática que el ADN nuclear (ADNn), debido a que su síntesis depende prioritariamente de la vía de recuperación, a la carencia de sistemas de reparación eficientes de ADN en las mitocondrias humanas y a la independencia en la regulación que este organelo presenta para el mantenimiento de nucleósidos dentro del mismo (Nishigaki et al., 2003).

Típicamente, en una célula en fase proliferativa, la fuente principal de dinucleótidos difosfatados (dNTPs) para la mitocondria es la vía *de novo* citosólica (**Fig. 3**). Sin embargo, mientras esta ruta metabólica está regulada negativamente en células quiescentes dado que el núcleo ya no requiere de dNTPs para replicar su ADN, el ADNmt continúa replicándose incluso en células en fase G₀ o post-mitótica (Pacitti, 2018). Por lo anterior, se requiere de un suministro constante para llevar a cabo dicho proceso, que se obtiene primordialmente a través de la vía de recuperación. Cuando la TP se encuentra deficiente, los desoxinucleósidos son transportados a la matriz mitocondrial aumentando concentración de los mismos. Esto regula positivamente la actividad de la timidina cinasa 2 (TK2) expresada de manera constitutiva, generando una gran cantidad de nucleótidos monofosfatados de pirimidinas, lo que se cree que produce el desbalance de desoxinucleótidos en la mitocondria (Hirano et al., 2004). Este desbalance conduce a la generación de errores por parte de la ADN polimerasa γ , dando como resultado la mutación del ADN



A pesar de que la mutación del gen *TYMP* ocurre en el núcleo, se propone que el padecimiento se manifiesta cuando el ADNmt sufre mutaciones secundarias derivadas de niveles de acumulación tóxicos de dTd y dUd. Estas mutaciones son acumulativas y tienen un umbral de aproximadamente 80-90% del total de mitocondrias afectadas en el individuo (Nishigaki et al., 2003). Por lo que los síntomas de esta enfermedad, si bien es hereditaria, se desarrollan posteriormente a los primeros años de vida, típicamente entre los 26 y 58 años (Nishino et al., 2000), o inclusive antes si la acumulación sobrepasa el umbral de toxicidad asintomática (Taanman et al., 2009). Al mismo tiempo, es importante destacar que a pesar de que la TP no se expresa en todos los tejidos, es expresada en plaquetas y leucocitos circulantes, por lo que su actividad contribuye considerablemente en la degradación del exceso de nucleósidos dTd y dUrd que se secretan al torrente sanguíneo (Lara et al., 2007).

1.1.3 Tratamientos

Debido a que esta enfermedad está asociada con el desbalance de nucleósidos en el organismo, las terapias desarrolladas hasta ahora consisten en la disminución de los niveles tóxicos de estos metabolitos, particularmente mediante la restauración de la actividad enzimática de la TP (Yadak et al., 2017).

A partir de la propuesta de Spinazzola et al. (2002) de implementar la hemodiálisis para eliminar el exceso de nucleósidos, diversas terapias han sido evaluadas, tales como la diálisis peritoneal (Yavuz et al., 2007), transfusión de plaquetas (Lara et al., 2006), trasplante ortópico de hígado (Boschetti et al., 2014; Kripps et al., 2020), trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (Hirano et al., 2006; Halter et al., 2015), entre otras.

1.1.3.1 Terapia de reemplazo enzimático

Dado que se han observado complicaciones importantes como incompatibilidad (Pacitti, 2018), efectos adversos por intervenciones y falta de actividad sostenida o restauración de la misma (Yadak et al., 2017) al implementar terapias basadas en diálisis, transfusiones o trasplantes, las investigaciones actuales se han redirigido al restablecimiento de la actividad enzimática en el organismo mediante la administración exógena de la timidina fosforilasa (Concolino et al., 2018).

Uno de los mayores retos que enfrenta el uso de la TRE es la degradación que sufre la enzima por proteasas celulares, por lo que algunos autores han propuesto su encapsulación en sistemas micro y nanométricos. Además de prolongar la vida media de la enzima, se busca que estos sistemas sean capaces de minimizar la respuesta inmunológica del organismo; entre estos destacan principalmente: los polimerosomas y los eritrocitos autólogos. Este último tratamiento actualmente se encuentra en investigaciones clínicas para su aprobación por la FDA (ClinicalTrials.gov, 2019), sin embargo, ya ha sido reconocido por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, por sus siglas en inglés) como medicamento huérfano (EMA, 2011). No obstante, dicho sistema tiene como limitantes la restricción de la actividad enzimática al compartimento vascular y un tiempo de vida útil de aproximadamente 30 minutos (Bax, 2020). Además, al ser células obtenidas de aislados de pacientes, se requiere de una estandarización rigurosa de las condiciones de aislamiento, conjugación enzimática y dosis suministrada, a la par que un estado favorable del individuo

para la obtención de eritrocitos, utilizando métricas como un recuento de glóbulos rojos mayor a 3.0×10^9 por mL (ClinicalTrials.gov, 2019).

En los últimos años, se ha propuesto también la implementación de terapia génica mediante vectores virales, particularmente derivados de lentivirus (LV) y virus adenoasociados (AAV), los cuales promueven la expresión del gen *TYMP* humano en células hepáticas para el restablecimiento de la actividad enzimática (Yadak et al., 2017). La principal limitación de esta terapia recae en la respuesta inmune de los humanos hacia las cápsides de AAV y al tratarse de modificaciones genéticas, existe la posibilidad de obtener altos niveles de variabilidad en la expresión enzimática de cada paciente. Por lo anterior, la dosis utilizada representa un papel fundamental para evitar la sobreexpresión de la TP, la cual ha sido relacionada previamente con diversos tipos de cáncer tales como hepático, colorrectal, gastrointestinal (Ikeguchi et al., 2001; Nakayama et al., 2005; Mitselou et al., 2012), entre otros.

1.1.3.2 Nanorreactores, propiedades y aplicaciones enzimáticas

Los nanorreactores, al igual que los acarreadores moleculares para entrega dirigida, se orientan hacia la maximización del efecto terapéutico de un compuesto bioactivo con relación a la dosis administrada, ya que al tener la capacidad de reconocer e internalizarse en tejidos diana, se busca disminuir la cantidad de fármaco para alcanzar el mismo o un mayor efecto (González, 2020). Entre las características que permiten que los nanorreactores sean excelentes candidatos para ser implementados en terapias destaca su alto grado de estabilidad, comprobado anteriormente tanto para polímeros naturales como sintéticos, demostrando mantenerse activos inclusive en condiciones variables de pH y temperatura (Rae et al., 2005; Prakash et al., 2011).

De manera particular, en materia de tratamientos para pacientes con MNGIE, De Vocht y et al. (2009) han desarrollado polimerosomas a base de polidimetilsiloxano y 2-polimetiloxazolina (PMOXA-PDMS-PMOXA) para la encapsulación de TP, adicionando canales proteicos bacterianos a la pared del arreglo polimérico para la internalización de sustrato al nanorreactor (Nardin et al., 2001). Los resultados obtenidos sugieren una baja respuesta inmunológica, no obstante, la eficiencia de encapsulación de la enzima no fue tan favorable alcanzando aproximadamente el 10%.

1.1.3.3 Partículas tipo virus

Las partículas tipo virus son estructuras poliméricas, típicamente de entre 20-100 nm, formadas a partir de la proteína de cápside de diversos virus, que poseen la capacidad de autoensamblarse y se caracterizan por la ausencia de material genético para replicarse (Buonaguro et al., 2011). Debido a sus propiedades morfológicas, su alta biocompatibilidad y la relativa facilidad con la que pueden ser funcionalizadas para su dirección tejido-específica resultan de gran interés para el área médica (Chauhan et al., 2018; Aljabali et al., 2018).

La ingeniería de VLPs se ha implementado con diversos objetivos en el campo de la biomedicina; la creación de vacunas (Bright et al., 2007), la entrega dirigida de fármacos (Yang et al., 2007), el mejoramiento de técnicas de imagenología (Allen et al., 2005) y el desarrollo de nanorreactores enzimáticos (Patterson et al., 2012; Koyani et al., 2017). Además, la diversidad de formas estructurales que exhiben los virus en la naturaleza representa una ventaja para adaptar diferentes modelos en función a las propiedades de tamaño y carga superficial de las moléculas a encapsidar. Entre las especies virales más estudiadas hasta ahora para la generación de partículas tipo virus se encuentran: el virus del mosaico del tabaco (TMV; Género: *Tobamovirus*), virus del moteado clorótico del caupí (CCMV; Género: *Bromovirus*), el virus del mosaico del caupí (CPMV; Género: *Comovirus*), el virus del mosaico del bromo (BMV; Género: *Bromovirus*), el bacteriófago P22 (P22; Género: *P22likevirus*), el bacteriófago MS2 (MS2; Género: *Levivirus*), el virus del papiloma humano (HPV; Género: *Alphapapillomavirus*), y el bacteriófago Q β (Q β ; Género: *Allolevivirus*) (Mateu, 2013; Schwarz et al., 2017).

1.1.3.4 Virus del mosaico del bromo

El virus del mosaico del bromo es un virus de ARN de sentido positivo, que infecta típicamente a gramíneas (He et al., 2021). El BMV posee una estructura icosaédrica cuyo diámetro es de alrededor de 28 nm (T=3), teniendo la capacidad de formar cápsides de 19 nm (T=1) en dependencia del número de subunidades que la conforman; 180 ó 60 monómeros de proteínas de cápside, respectivamente (Dedeo et al., 2011).

1.1.4 Mitodirección

Las mitocondrias, comúnmente conocidas por ser la fuente energética celular por excelencia, son organelos encargados de muchas funciones primordiales entre las que destacan: la fosforilación oxidativa, el metabolismo central del carbono y la biosíntesis de intermediarios para el crecimiento celular (Murphy y Hartley, 2018). Adicionalmente a su importancia metabólica y energética, las mitocondrias participan como actuadores en puntos de control que pueden promover procesos proliferativos o de muerte celular. Es por ello que se han convertido en blancos terapéuticos para un gran número de padecimientos como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, metabólicas, cardiovasculares, entre otras (Wang et al., 2018; Lin et al., 2017).

Si bien el desarrollo de terapias capaces de restaurar las funciones mitocondriales ha sido catalogado como altamente significativo y necesario (Zielonka et al., 2017), en la actualidad no existen medicamentos aprobados por la FDA e indicados para aliviar los síntomas o disminuir la progresión de enfermedades mitocondriales (Weissig, 2020).

Por otro lado, debido al potencial negativo de la membrana interna de la mitocondria, las estrategias para mitodirigir compuestos se basan en el principio de acumulación de especies catiónicas, especialmente lipofílicas, en la matriz mitocondrial (Murphy y Hartley, 2018). En este contexto, destacan los cationes de trifenílfosfonio (TPP), rodamina, cationes de cianina y péptidos catiónicos (Zielonka et al., 2017). De éstos, el TPP es el catión más ampliamente estudiado (Heller et al., 2012; Smith et al., 2012) cuyo uso inicialmente consistía en ser aplicado como sonda para dilucidar el mecanismo de acoplamiento entre el potencial de membrana mitocondrial y la fosforilación oxidativa (Lieberman et al., 1969). Hasta que la propuesta de Murphy (1997) al final de los años 90s, posicionó a esta molécula como un andamiaje para la entrega dirigida y acumulación de compuestos bioactivos hacia la mitocondria (Madar et al., 2006; Wang et al., 2017; Logan y Murphy, 2017).

La internalización selectiva del TPP ocurre de forma gradual primero hacia el citosol y después dentro de la mitocondria, gracias a que ambas poseen una carga negativa en el interior. El potencial de la membrana plasmática es de alrededor de 30-60 mV y el de la mitocondrial oscila entre 150-180 mV, por lo que se estima que los compuestos catiónicos se acumulen de 5 a 10 veces en el citoplasma y de 100 a 500 veces en la matriz mitocondrial, en comparación con el medio extracelular (Smith et al., 2003; Zielonka et al., 2017).

Si bien la carga de la molécula a internalizar es fundamental, su hidrofobicidad influirá significativamente en el estado de equilibrio de la reacción. De manera que entre más hidrofóbico sea el compuesto, su internalización podría ser más rápida (Ross et al., 2008).

De acuerdo con la información disponible hasta ahora respecto a terapias para el tratamiento de MNGIE, la propuesta de nanorreactores enzimáticos con actividad timidina fosforilasa para la reducción de los niveles tóxicos de desoxinucleótidos en la mitocondria supone una opción de tratamiento viable y potencialmente extrapolable a otros padecimientos que requieren de la mitodirección de compuestos lábiles cuya estabilidad busca ser mejorada.

1.2 Justificación

La mitodirección de nanorreactores explorada en este proyecto, no sólo implica la oportunidad de desarrollar una terapia menos invasiva para los pacientes con MNGIE, sino también representa la posibilidad de que este sistema sea utilizado como plataforma en el tratamiento de otros padecimientos cuyo blanco molecular sean las mitocondrias.

1.3 Hipótesis

Los nanorreactores basados en cápsides del virus del mosaico del bromo (BMV), conteniendo a la enzima timidina fosforilasa podrán ser dirigidos específicamente hacia la mitocondria mediante su funcionalización con TPP para la generación de una plataforma de entrega dirigida.

1.4 Objetivos.

1.4.1 Objetivo general

Diseñar y producir nanorreactores basados en cápsides del virus del mosaico del bromo (BMV) conteniendo timidina fosforilasa en su interior y funcionalizados con trifenilfosfonio en la superficie externa para ser dirigidos de forma específica a la mitocondria.

1.4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la actividad enzimática de la timidina fosforilasa (aproximación por enzima libre).
- Producir y ensamblar nanorreactores BMV-TP.
- Caracterizar la morfología de los nanorreactores.
- Funcionalizar los nanorreactores con trifenilfosfonio para mitodirigirlos.
- Evaluar la capacidad de internalización de los nanorreactores en cultivos celulares.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Producción de partículas tipo virus (VLPs)

2.1.1 Expresión del virus BMV

Para la obtención del virus se llevó a cabo la infección de plantas de la especie *Hordeum vulgare* (cebada, por su nombre común). Dos semanas posteriores a la siembra de las semillas, una vez que alcanzaron una longitud de alrededor de 5 a 10 cm, se realizó una erosión suave a lo largo de las hojas con una malla metálica. Las lesiones resultantes fueron inoculadas con 20 μ L de una disolución a 0.1 mg/mL de virus en solución amortiguadora de suspensión (50 mM acetato de sodio, 8 mM acetato de magnesio, pH 4.5). Las plantas fueron cultivadas en condiciones controladas en invernadero por 3 semanas hasta que presentaron un patrón de clorosis, caracterizado por la aparición de manchas amarillas que corresponde al signo predominante de la infección viral por BMV (**Fig. 4**). Una vez cosechadas las hojas se almacenaron a -20°C hasta la extracción del virus.



Figura 4. Patrón de infección BMV. Aparición de manchas amarillas que se extienden a lo largo de la hoja desde el sitio de infección.

2.1.2 Extracción de viriones

La lisis celular se realizó de forma mecánica utilizando una procesadora de alimentos. Se trituraron 80 g de hojas mezcladas con solución amortiguadora de extracción (500 mM acetato de sodio, 80 mM acetato de magnesio, pH 4.5) hasta que el macerado adquirió una consistencia pastosa. Después, el extracto fue filtrado a través de una gasa, descartando la materia fibrosa.

El filtrado resultante se mezcló en una proporción 1:1 con diclorometano y posteriormente la mezcla fue centrifugada a $8,568 \times g$ durante 40 minutos a 4°C en una centrífuga Beckman JXN-26 utilizando un rotor JA-14 (Beckman Coulter, Inc.). Una vez que se obtuvieron dos fases, el sobrenadante de color amarillo fue recuperado y centrifugado durante 25 minutos adicionales. Posteriormente, esta fase fue colocada en agitación durante 12 horas a 4°C ligeramente cubierta con aluminio para eliminar los restos de diclorometano por evaporación.

Como primer paso en el aislamiento de las partículas virales, el lisado fue repartido en tubos de policarbonato con 25 mL cada uno. Utilizando una pipeta Pasteur, se colocó al fondo de cada tubo 10 mL de una solución de sacarosa al 10% (p/v) como se muestra en la **Figura 5**. Los tubos con el colchón de sacarosa fueron centrifugados a $126,730 \times g$ durante 2 horas a 4°C en un rotor SW 32Ti utilizando una centrífuga Beckman XPN-100 (Beckman Coulter, Inc.). El botón formado fue recuperado y resuspendido en 150 μL de solución amortiguadora de suspensión por tubo. La suspensión final fue almacenada a 4°C hasta su purificación.

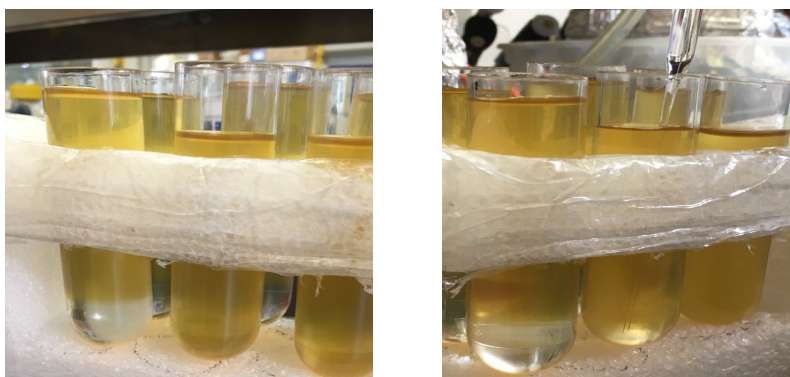


Figura 5. Colchón de sacarosa. Adición de sacarosa 10% (p/v) por debajo del lisado formando colchones de sacarosa.

2.1.3 Purificación de partículas virales

En función a su densidad, se llevó a cabo la purificación de los virus mediante ultracentrifugación de la suspensión a través de un gradiente de sacarosa. Para la formación del gradiente se preparó una solución de sacarosa al 25% (p/v) diluida en solución amortiguadora de suspensión de virus. Se añadieron 25 mL en tubos de policarbonato y se colocaron a -80°C durante una hora y transcurrido ese tiempo fueron descongelados a temperatura ambiente. El proceso de congelamiento se repitió al menos dos veces inmediatamente antes de la centrifugación.

La suspensión viral fue colocada cuidadosamente sobre el gradiente y centrifugada a $126,730 \times g$ durante 2 horas a 4°C en un rotor SW 32Ti. Los tubos fueron observados en un cuarto oscuro e irradiados con luz blanca para poder recuperar la banda azul formada en la parte media. A la fracción colectada se le añadió solución amortiguadora de virus en una proporción 1:4 y fue centrifugada una vez más a $126,730 \times g$ durante 3 horas a 4°C en un rotor SW 32Ti, con la finalidad de eliminar el exceso de sacarosa. Posteriormente, se recuperó el botón y se resuspendió en $200 \mu\text{L}$ de solución amortiguadora de suspensión por tubo. La concentración y pureza de las muestras fueron calculadas mediante el cociente entre la absorbancia a 280 nm y 260 nm, correspondiente a proteínas y ácidos nucleicos, respectivamente.

2.1.4 Caracterización de las cápsides virales

Para poder comparar la morfología de los nanorreactores con el virus nativo, se realizó una caracterización de los viriones aislados a través de dispersión dinámica de luz en un equipo NanoSZ de Malvern para conocer su diámetro hidrodinámico. A su vez se obtuvo una micrografía electrónica de transmisión para determinar la morfología y el tamaño de estos (**Anexo 1**) colocando una muestra de $7 \mu\text{L}$ de nanopartículas a una concentración de 0.2 mg/mL sobre una rejilla de cobre cubierta con Formvar (TedPella, USA). Las muestras se mantuvieron durante 2 min y se removió el líquido remanente utilizando papel filtro Whatman. Finalmente, se agregó un volumen de $7 \mu\text{L}$ de acetato de uranilo al 4% sobre la preparación y se mantuvo durante 1 min adicional y se removió el exceso de contrastante con papel filtro Whatman. Las muestras se analizaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2010 operado a 100 kV. Las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el software ImageJ (NIH).

2.1.5 Desensamble y recuperación de proteína de cápside (CP-BMV)

Las suspensiones obtenidas de la purificación fueron sometidas a un proceso de diálisis a través de una membrana de 14 kDa durante 24 horas en agitación a 4°C , contra una solución amortiguadora de desensamble (500 mM NaCl , 1 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) pH 8.0, 50 mM Tris-HCl a pH 7.5). La diálisis, la proteína contenida en la membrana se centrifugó a $60,211 \times g$ durante 8.5 horas a 4°C en un rotor 90Ti, y el sobrenadante fue recuperado en alícuotas de $500 \mu\text{L}$. La concentración y pureza de

las muestras fueron determinadas mediante espectrofotometría obteniendo su absorbancia a 280 y 260 nm tomando un radio (280/260) mayor a 1.5 como indicador de una pureza aceptable.

Para el almacenamiento de la proteína se realizó una segunda diálisis en membrana de 14 kDa contra solución amortiguadora de proteínas (1 M NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.2,) durante 12 horas a 4°C. Después de ese tiempo se esterilizó la proteína mediante un filtro de celulosa de 0.22 µm para jeringa y el filtrado fue almacenado a 4°C hasta su utilización.

2.2 Caracterización y funcionalización de la enzima timidina fosforilasa

2.2.1 Funcionalización de la enzima con isotiocianato de fluoresceína (FITC)

Para aumentar la carga negativa y observar la internalización de los nanorreactores en mitocondrias, la enzima se funcionalizó con isotiocianato de fluoresceína (FITC) previamente a la encapsidación. La reacción se llevó a cabo en 50 mM MES pH 6.5, añadiendo 4.5 µg de FITC a 50 µL de TP (20.35 µg / µL) durante 2 horas a temperatura ambiente. El número de grupos amino libres se estimó con base en la cantidad de residuos superficiales con aminos primarios. Las muestras se purificaron mediante diálisis en una membrana de 14 kDa frente a 1 L de solución amortiguadora de ensamble (50 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.2) durante 20 horas a 4°C.

2.2.2 Análisis por espectroscopía de dispersión dinámica de luz

Se evaluó el diámetro hidrodinámico la enzima timidina fosforilasa en solución con la finalidad de obtener el tamaño aproximado y estimar teóricamente la cantidad de enzima que podría contenerse en las cápsides de BMV. Al mismo tiempo se obtuvo el potencial Z para estimar la carga de la enzima en las soluciones de ensamble del virus.

2.2.3 Cinética enzimática

Para determinar la constante de afinidad (K_M) y la constante de actividad catalítica (k_{cat}) de la timidina fosforilasa, se realizó una cinética de la enzima en su estado libre, siguiendo el protocolo de Krenitsky et al. (1979) modificando el volumen de reacción a 1 mL y manteniendo la proporción 1:100 de enzima respecto al volumen total de reacción.

2.3 Obtención, caracterización y funcionalización de nanorreactores (TP_{FITC}-BMV)

2.3.1 Ensamble de nanorreactores (TP_{FITC}-BMV)

Los ensambles se realizaron mediante dos diálisis en serie en condiciones de oscuridad a 4°C, utilizando membranas de 14 kDa. La primera diálisis se realizó durante 24 horas contra solución amortiguadora de ensamble para promover las interacciones electrostáticas entre la enzima y las proteínas de la cápside. Finalmente, la membrana fue trasladada a un vaso de precipitado con solución amortiguadora de suspensión durante 16 horas, en esta etapa se favorecen las interacciones entre las proteínas de cápside para compactar la estructura icosaédrica.

2.3.2 Purificación de los nanorreactores

Los nanorreactores fueron purificados mediante ultracentrifugación para separar los remanentes de enzima libre y proteína de cápside utilizados en la reacción de ensamble. Se añadieron 8 mL de solución de sacarosa al 25% (p/v) en tubos de policarbonato y se colocaron a -80°C durante una hora y transcurrido ese tiempo fueron descongelados a temperatura ambiente. El proceso de congelamiento se repitió al menos dos veces inmediatamente antes de la centrifugación. Se colocó cuidadosamente el volumen total de la reacción de ensamble sobre el gradiente de sacarosa y los tubos se centrifugaron a 60,211 x g durante 2.5 horas a 4°C en un rotor 90Ti. Posteriormente se cubrieron con Parafilm® y fueron almacenados durante 16 horas a 4°C. Finalmente se centrifugaron a 147,000 x g durante 2.3 horas y se descartó el sobrenadante. El botón obtenido fue resuspendido en 100 µL de solución amortiguadora de suspensión de virus y se almacenó a 4°C.

2.3.3 Caracterización de los nanorreactores por dispersión dinámica de luz y microscopía electrónica de transmisión

Se realizó la caracterización de los nanorreactores mediante dispersión dinámica de luz y microscopía electrónica de transmisión (TEM) como se menciona en el apartado **2.1.4**.

2.3.4 Cuantificación de nanorreactores por densitometría

Para confirmar la encapsidación enzimática así como para cuantificar la cantidad de enzima contenida en las cápsides, se realizó un ensayo de electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (15%) con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Las muestras fueron comparadas con la movilidad electroforética de la proteína de cápside (CP) así como de la enzima libre (TP) y con ello se obtuvo una estimación de la cantidad de cada elemento en la muestra de nanorreactores mediante un análisis de densitometría efectuado en el programa ImageJ. Las cantidades utilizadas en cada gel se describen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Densitometría de la proteína de cápside (CP) y la enzima timidina fosforilasa (TP).

<i>Gel 1</i>		<i>Gel 2</i>	
<i>Carril</i>	Muestra	<i>Carril</i>	Muestra
1	CP control	1	Marcador de peso molecular
2	Marcador de peso molecular	2	CP 0.7 µg
3	TP 0.5 µg	3	CP 1.4 µg
4	TP 1 µg	4	CP 2.8 µg
5	TP 2 µg	5	CP 5.6 µg
6	TP 4 µg	6	CP 11.2 µg
7	TP 8 µg	7	-
8	VLPs purificadas ≈2 µl	8	VLPs purificadas 20 µl
9	VLPs purificadas ≈28 µl	9	Sobrenadante 10 µl
10	-	10	Sobrenadante 20 µl

2.4 Síntesis y caracterización del derivado de trifenilfosfonio

2.4.1 Síntesis del (2-carboxietil) bromuro de trifenilfosfonio (2CETPP)

El compuesto derivado de trifenilfosfonio se sintetizó mezclando 500 mg de ácido 3-bromopropiónico con 1.1 moles de exceso de trifenilfosfina en acetonitrilo anhidro a 75°C en un sistema de reflujo durante 24 horas. Posteriormente la mitad del volumen de acetonitrilo fue eliminado por evaporación a 40°C y 142 mbar. Se añadieron 70 mL de éter etílico manteniendo la solución blanca resultante a 4°C durante toda la noche y el solvente restante fue eliminado por evaporación, recuperando del matraz un polvo de color blanco. La reacción fue monitoreada mediante cromatografía en capa fina (gel de sílice 60 F254, 20 x 20 cm).

2.4.2 Caracterización por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Se caracterizó el compuesto (2-carboxietil) bromuro de trifenilfosfonio de acuerdo a la vibración de sus enlaces realizando un ensayo de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) utilizando un espectrómetro Brucker Alpha II.

2.4.3 Caracterización por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Para conocer la masa del derivado de trifenilfosfonio se realizó un ensayo de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en un sistema Agilent serie TOF 6200/serie 6500 del CICESE. La muestra fue inyectada de forma directa a una concentración de 0.1 mg/mL, utilizando 0.1% de ácido fórmico como solvente.

2.4.4 Caracterización por resonancia magnética nuclear

Se realizó un análisis de resonancia magnética nuclear en un equipo Bruker AVANCE III del Instituto de Química de la UNAM, con la finalidad de determinar la identidad del compuesto mediante la resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C y ^{31}P . La muestra se disolvió en CDCl_3 (Sigma Aldrich, Lote MKCJ3462). La

adquisición de RMN de ^1H se realizó con 80 escaneos y 1 segundo de tiempo de relajación, la de ^{13}C con 6400 escaneos y 1 segundo de tiempo de relajación y para la de ^{31}P se llevaron a cabo 800 escaneos y 3 segundos como tiempo de relajación.

2.5 Funcionalización de los nanorreactores con trifenilfosfonio ($\text{TP}_{\text{FITC}}\text{-BMV-TPP}$)

Los grupos amino sobre la superficie de los nanorreactores fueron deprotonados mediante diálisis contra una solución amortiguadora 50 mM MES, pH 6.5 durante 24 horas a 4°C. La funcionalización se realizó mediante una reacción de entrecruzamiento utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS). Para la reacción se calculó un exceso de 300 x moles de TPP y 350 x moles de EDC y NHS, respecto a los moles de cápside formados. Inicialmente, se mezclaron el TPP, EDC y NHS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después se agregó el volumen de nanorreactores, dejándolos reaccionar durante 3 horas. Con el fin de eliminar los restos de TPP, EDC y NHS excedentes de la muestra, la reacción se dializó contra solución amortiguadora 50 mM MES pH 6.5 por 16 horas.

2.5.1 Caracterización de la carga y tamaño de los nanorreactores funcionalizados

Los nanorreactores funcionalizados con TPP se caracterizaron mediante dispersión dinámica de luz para observar cambios en su diámetro hidrodinámico. A su vez, se determinó el cambio en la carga superficial obteniendo su potencial Z.

2.5.2 Ensayo de mitodirección en cultivo celular

Se realizó un cultivo celular para evaluar la mitodirección de los nanorreactores funcionalizados utilizando como modelo la línea celular de hepatocitos murinos AML-12 (ATCC CRL-2254).

Se sembraron 100,000 células en cajas Petri de 35 mm con fondo de vidrio y se dejaron crecer a 37°C durante 24 horas en medio HAM-F12 suplementado con ITS (insulina-transferrina y selenito sódico) y 10% de suero fetal bovino. Posteriormente se retiró el suero fetal bovino del medio y el cultivo se incubó durante 12 horas adicionales. Al alcanzar la confluencia del 80% se cambió el medio y se adicionaron los nanorreactores a una concentración de 1.3×10^7 viriones por célula, dejándolos interactuar con las células durante 12 horas.

El marcaje de las mitocondrias se realizó utilizando el manual para células fijadas del kit de detección Mito-ID Red (Cat. No. ENZ-51007-500) del proveedor Enzo Lab Sciences. Para la fijación se utilizó glutaraldehído al 2.5% con un tiempo de incubación de 30 minutos, en oscuridad. Para la permeabilización de las células se realizaron 3 lavados con PBS Tritón X-100 y se añadieron 500 μ l de la dilución 0.001% Mito-ID en solución amortiguadora de ensayo, incubando durante 20 minutos a 37°C.

Finalmente la muestra se lavó con PBS y fue evaluada mediante microscopía confocal en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del CICESE para determinar la co-localización de las señales de FITC y Mito-ID, correspondientes a los nanorreactores y las mitocondrias, respectivamente. La excitación de FITC se llevó a cabo con un filtro de 480-495 nm, obteniendo su emisión en el rango de 505-525 nm. El Mito-ID fue excitado con un filtro de 560-660 nm, obteniendo la señal de emisión en un rango de 655-755 nm. El coeficiente de Pearson se obtuvo al realizar el análisis de correlación con el programa ImageJ.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Diámetro hidrodinámico y carga de la enzima

3.1.1 Timidina fosforilasa

La enzima timidina fosforilasa exhibe un diámetro hidrodinámico de 7.04 nm con una desviación estándar de ± 1.07 nm cuando es dispersada en solución amortiguadora 10 mM fosfato de potasio, pH 7.0 a 25 °C (**Fig. 6**). La carga superficial de la enzima en las mismas condiciones de pH y fuerza iónica fue de -14.7 mV con una desviación estándar de ± 7.9 mV (**Fig. 7**).

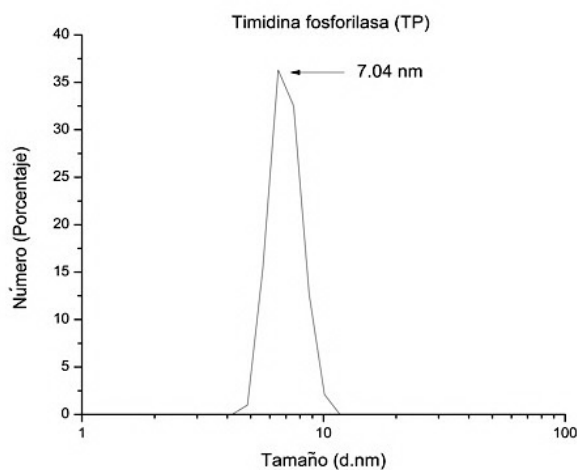


Figura 6. Tamaño de la enzima timidina fosforilasa. Diámetro hidrodinámico de la timidina fosforilasa.

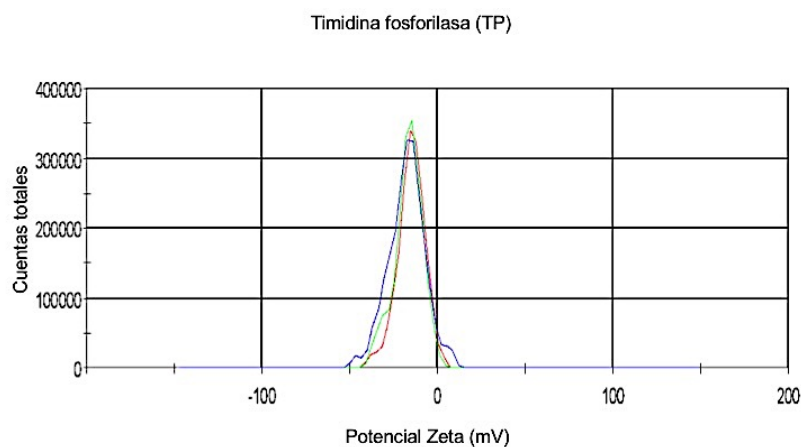


Figura 7. Potencial Z de la enzima timidina fosforilasa. Carga superficial de la enzima timidina fosforilasa.

3.1.2 Timidina fosforilasa funcionalizada con FITC

Después de funcionalizar la enzima TP con FITC, el tamaño obtenido fue de 7.33 nm con una desviación estándar de ± 1.45 nm (**Fig. 8**). Así mismo, la carga superficial aumentó en sentido negativo a -22 mV con una desviación estándar de ± 6.8 mV (**Fig. 9**)

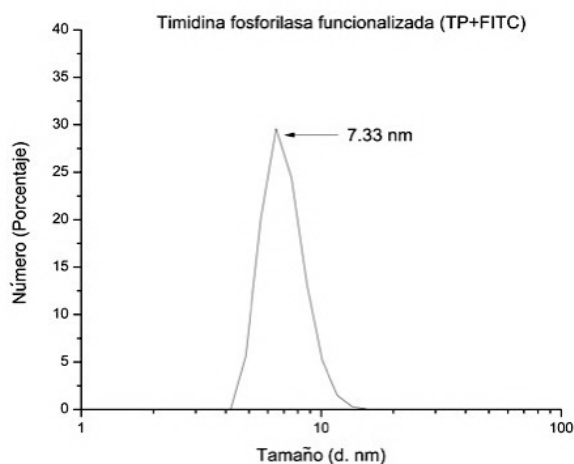


Figura 8. Tamaño de la enzima timidina fosforilasa funcionalizada (TP_{FITC}). Diámetro hidrodinámico de timidina fosforilasa funcionalizada con FITC.

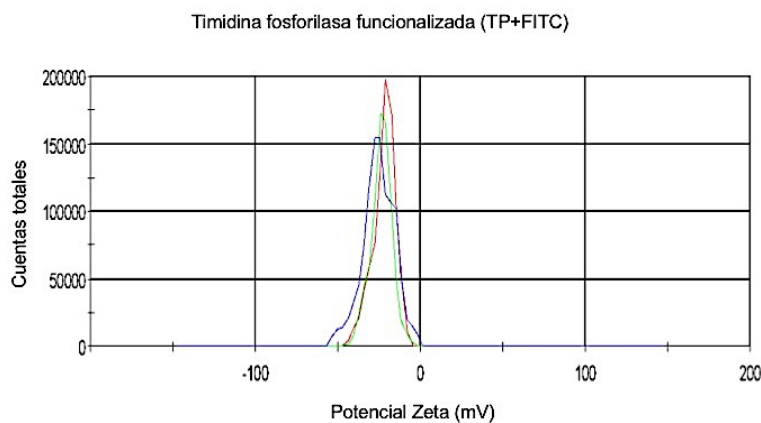


Figura 9. Potencial Z de la enzima funcionalizada (TP_{FITC}). Carga superficial de la timidina fosforilasa funcionalizada con FITC.

3.2 Parámetros cinéticos de la enzima

En la **Figura 10** se muestra la cinética de la enzima timidina fosforilasa a 25°C, pH 7.4 y a distintas concentraciones de timidina como sustrato.

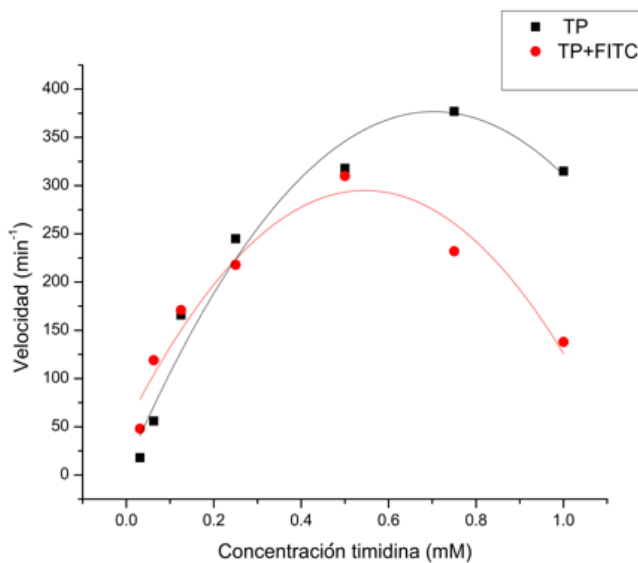


Figura 10. Cinética de la enzima timidina fosforilasa. Comparación de la cinética de la enzima TP antes (negro) y después (rojo) de funcionalizarla con FITC.

Debido a que la cinética presenta un comportamiento representativo de inhibición por sustrato, los parámetros cinéticos descritos en la **Tabla 2**, fueron obtenidos omitiendo la sección decreciente del gráfico en la **Figura 10** y ajustados a una cinética de Michaelis-Menten.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la enzima timidina fosforilasa (K_M y k_{cat})

<i>Muestra</i>	k_{cat}	K_M	<i>Coefficiente de correlación</i>
<i>Enzima TP</i>	538 min ⁻¹	0.32	0.993
<i>Enzima TP+FITC</i>	415 min ⁻¹	0.19	0.990

3.3 Nanorreactores enzimáticos (TP_{FITC}-BMV)

El ensamble de las cápsides virales se confirmó mediante la obtención del diámetro hidrodinámico por dispersión dinámica de luz. En la muestra se aprecian dos poblaciones: la primera de 7.86 nm con abundancia del 18% correspondiente a la forma libre de las proteínas CP y TP; y la segunda de aproximadamente 22 nm de diámetro con el 82% de abundancia en número (**Fig. 11**).

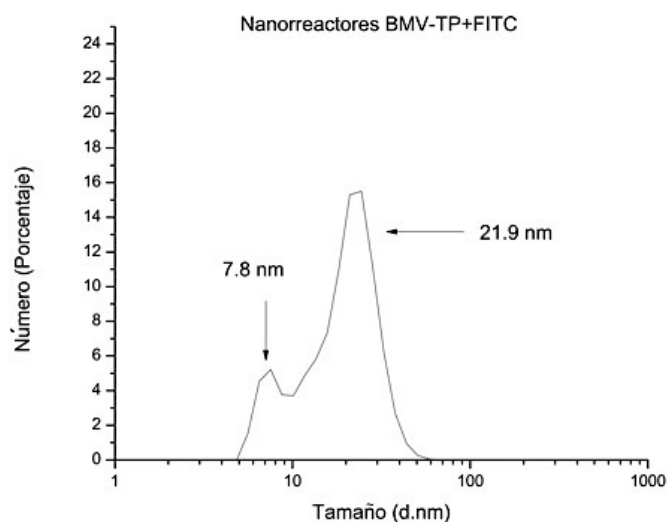


Figura 11. Tamaño de los nanorreactores. Distribución de tamaño de partículas proteicas en la muestra de ensamble en solución amortiguadora de suspensión de virus pH 4.5

3.4 Nanorreactores enzimáticos (TP_{FITC}-BMV) purificados

Los nanorreactores purificados presentan una distribución de tamaño bimodal alrededor de los 17 nm (64.5 %) y 35 nm (35.5 %) de diámetro, como se muestra en la **Figura 12**.

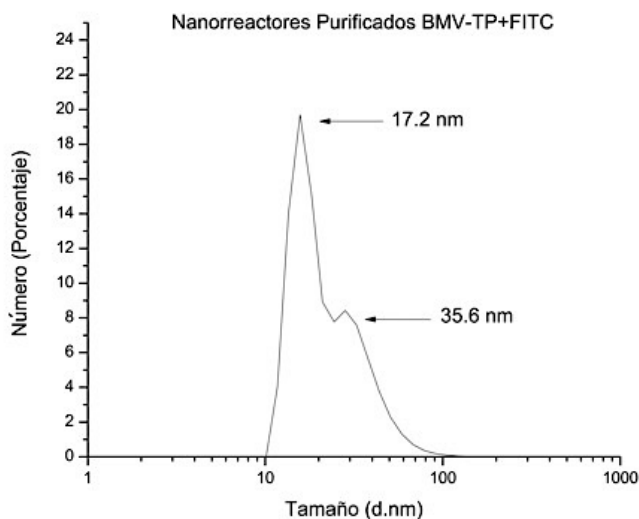


Figura 12. Tamaño de los nanorreactores purificados. Distribución de tamaño de partículas proteicas en la muestra de ensamble en solución amortiguadora de suspensión de virus pH 4.5.

3.4.1 Microscopía electrónica de transmisión de los nanorreactores (TP_{FITC}-BMV)

Los nanorreactores obtenidos presentan una morfología cuasi-esférica con un diámetro promedio de 29 nm de diámetro. En la **Figura 13** es posible observar que la electrodensidad de la muestra se distribuye principalmente en el centro de las partículas.

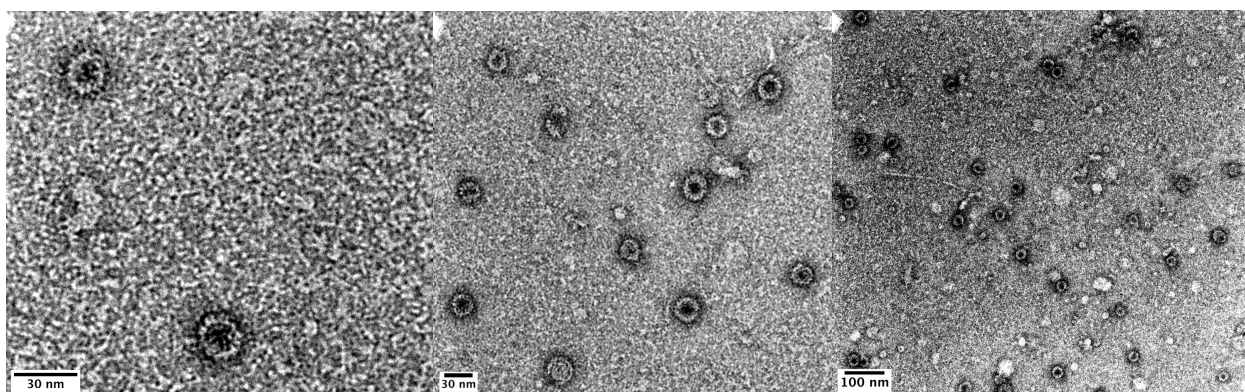


Figura 13. Micrografía electrónica de transmisión de los nanorreactores. Distribución de tamaño de partículas proteicas en la muestra de ensamble en solución amortiguadora de suspensión de virus pH 4.5

3.5 Análisis densitométrico en gel de poliacrilamida

Para determinar la cantidad de proteína de CP y TP contenida en las cápsides purificadas se llevó a cabo un ensayo de densitometría en gel de poliacrilamida al 15% (**Figs.14 y 15**).

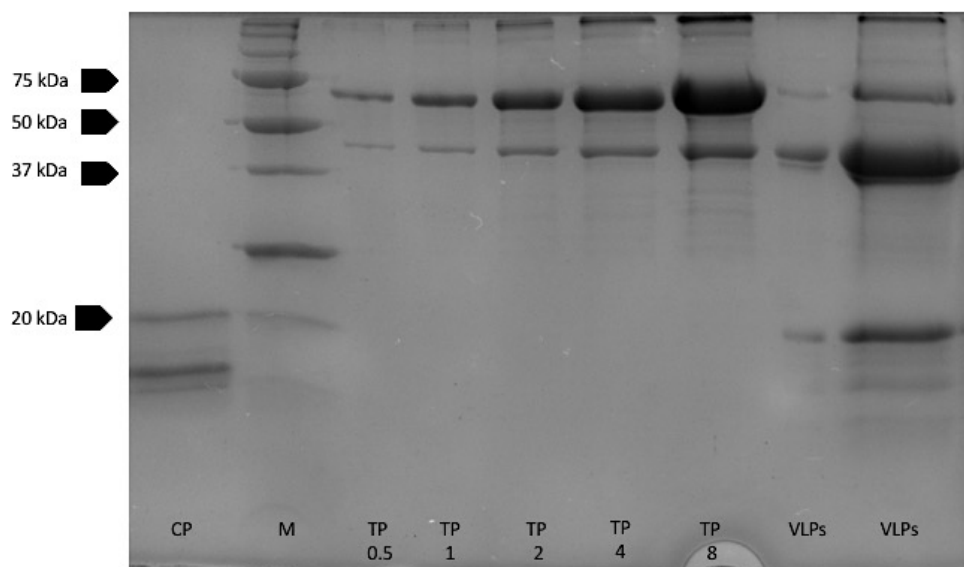


Figura 14. Densitometría de la enzima TP. Carril 1: Control de proteína de cápside, carril 2: marcador de peso molecular, carriles 3-7: Timidina fosforilasa (0.5, 1, 2, 4, 8 ug), carriles 8 y 9: nanorreactores purificados.

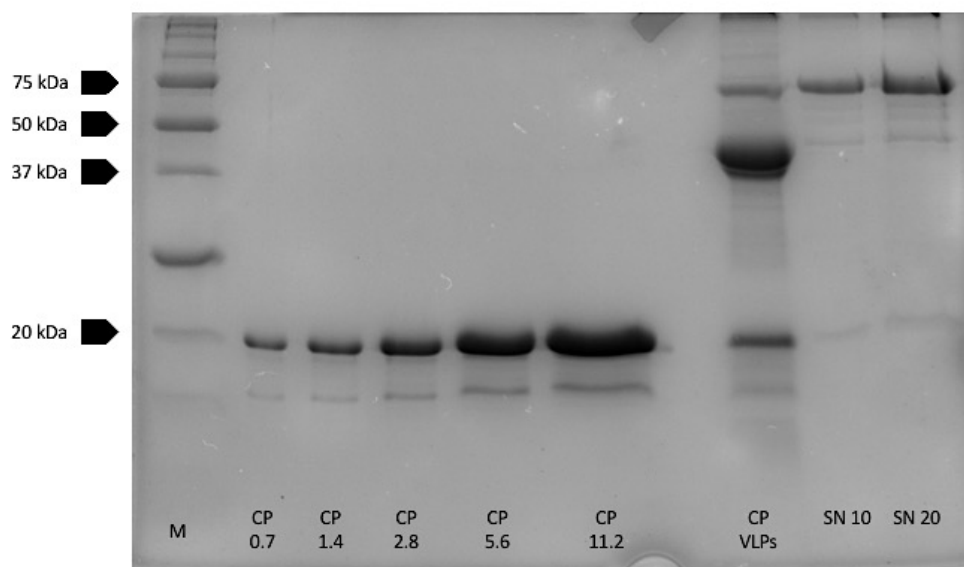


Figura 15. Densitometría de la proteína de cápside del BMV . Carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2-6: proteína de cápside del BMV (0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8 µg), carril 7: vacío, carril 8: nanorreactores purificados, carriles 9 y 10: sobrenadante de la purificación de nanorreactores.

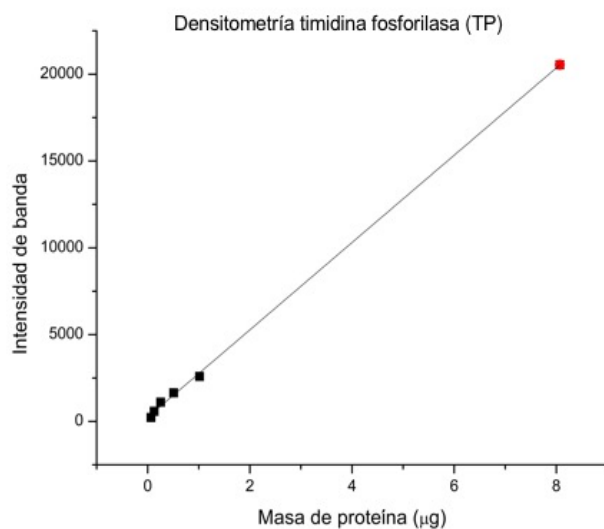


Figura 16. Cuantificación de la enzima TP. Regresión lineal obtenida a partir de la intensidad de bandas del gel de poliácridamida para la TP. El punto rojo corresponde a la masa del monómero de enzima en la muestra de ensamble TP-BMV.

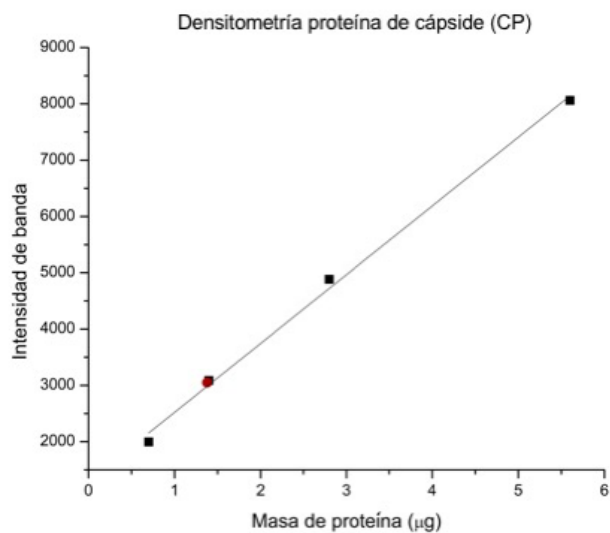


Figura 17. Cuantificación de la proteína de cápside del BMV. Regresión lineal obtenida a partir de la intensidad de bandas del gel de poliácridamida para la CP. El punto rojo corresponde a la masa de proteína de cápside correspondiente a la muestra de ensamble TP-BMV.

3.6 Caracterización del compuesto (2-carboxietil) bromuro de trifenilfosfonio

3.6.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

La síntesis fue realizada mediante la sustitución nucleofílica del bromo en el ácido 3-bromopropiónico por el fósforo del trifenilfosfano (**Fig. 18**).

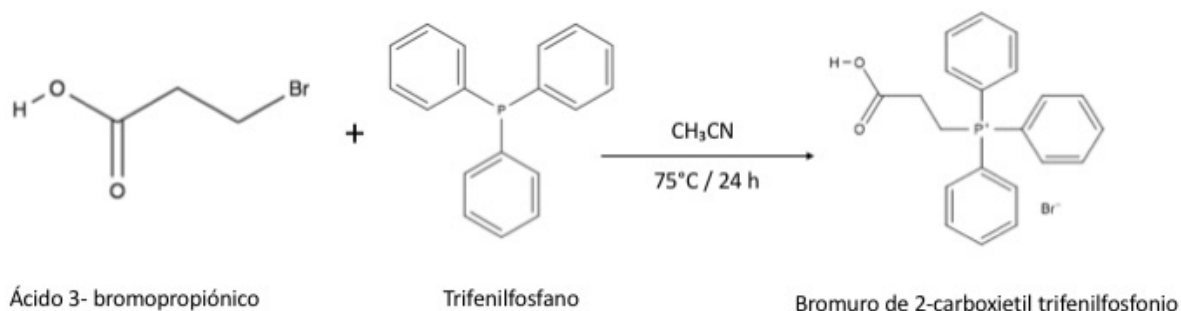


Figura 18. Reacción de síntesis 2CETPP. Esquema de la síntesis del derivado de trifenilfosfonio a partir de sus precursores: ácido 3-bromopropiónico y trifenilfosfano.

El espectro del compuesto fue comparado con el de sus precursores para la determinación de los enlaces en la muestra (**Fig. 19**). Se observa la desaparición de la señal alrededor de 635 cm^{-1} correspondiente al enlace C-Br presente en el ácido bromopropiónico (BPA), mientras que se mantienen las señales correspondientes al enlace C=C de las estructuras cíclicas del trifenilfosfano y las correspondientes al grupo carboxilo aportadas por el ácido bromopropiónico (**Tabla 3**).

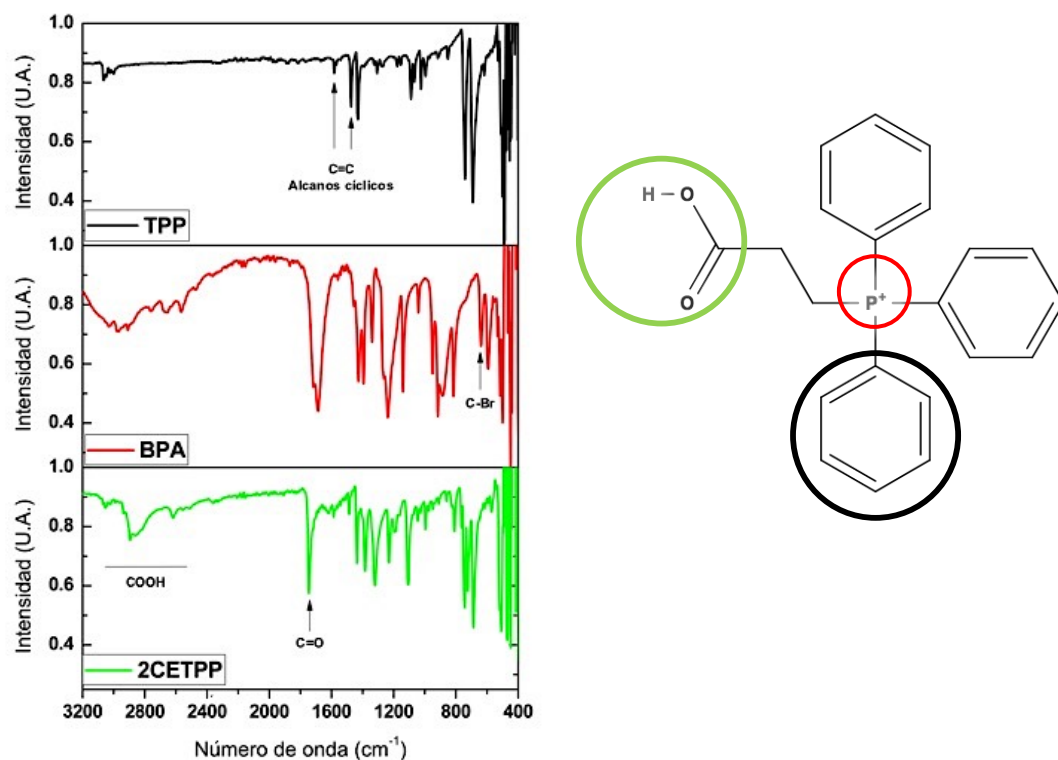


Figura 19. Espectro infrarrojo del compuesto 2CETPP. Comparación de los espectros del 2CETPP con sus precursores: trifenilfosfina (TPP) y ácido bromopropionico (BPA). A la derecha se muestra la estructura del 2CETPP indicando los enlaces descritos en los espectros.

Tabla 3. Señales en el infrarrojo del (2-carboxietil) bromuro de trifenilfosfonio.

Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional	Referencia
688	-	(Bundy, 1976)
722	Flexión C-H	(PubChem, 2021, Bundy, 1976)
744	Flexión C-H	(PubChem, 2021, Bundy, 1976)
1107	-	(Bundy, 1976)
1230	C-H	(Bundy, 1976)
1322	C-H	(Bundy, 1976)
1384	Flexión C-H	(Bundy, 1976)
1435	Flexión OH (COOH)	(PubChem, 2021, Bundy, 1976)
1485	-	(Bundy, 1976)
1580-1584	C=C (Alcano cíclico)	(Bundy, 1976)
1620	Estiramiento C=C	(Bundy, 1976)
1745	Estiramiento C=O (COOH)	(PubChem, 2021; Bundy, 1976)
2542-2559	Estiramiento OH (COOH)	(Bundy, 1976)

2610-2627	Estiramiento OH (COOH)	(Bundy, 1976)
2893	Estiramiento OH (COOH)	(Bundy, 1976)
3052	-	-

3.6.2 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

El compuesto sintetizado 2CETPP fue analizado por espectroscopía de resonancia magnética nuclear donde la RMN ^1H mostró la presencia de protones aromáticos de TPP (7.6-7.8 ppm) así como los protones metilo (3.0 y 3.7 ppm) y carboxílico (8.92 ppm) del ácido 2-propiónico. Los picos de carbono correspondientes también se observaron en la RMN ^{13}C y se etiquetaron en la **Figura 20**. Mientras que la RMN ^{31}P mostró el pico de fósforo confirmando la síntesis exitosa de 2CETPP.

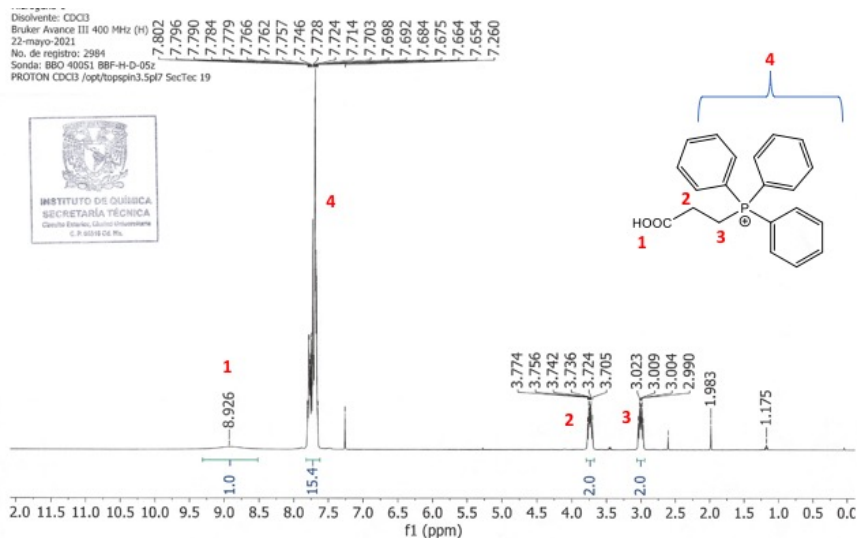


Figura 20. Espectro de RMN del compuesto 2CETPP. Señales de resonancia obtenidas de los núcleos magnéticos de ^1H , ^{13}C y ^{31}P

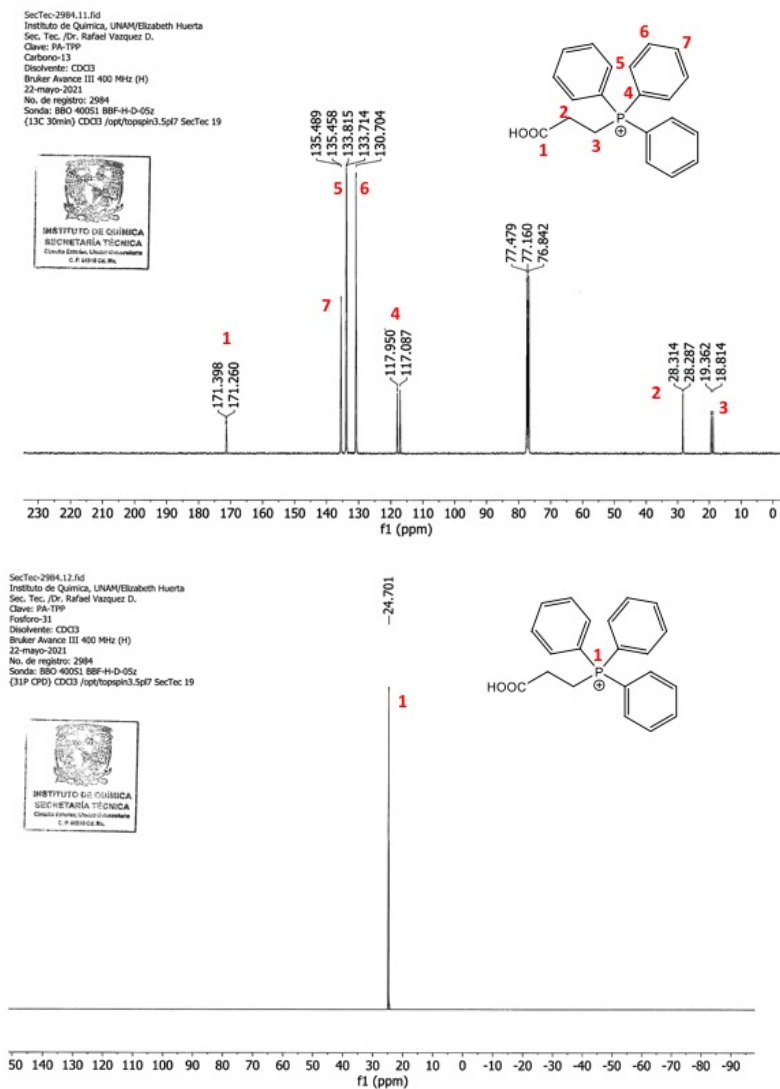


Figura 20. Espectro de RMN del compuesto 2CETPP (continuación). Señales de resonancia obtenidas de los núcleos magnéticos de ^1H , ^{13}C y ^{31}P

3.6.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

De acuerdo con la fórmula química del compuesto sintetizado ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{PBr}$) su peso molecular teórico es de 415.26 g/mol (**Fig. 21a**). A partir de esa premisa, se realizó la fragmentación y análisis por espectrometría de masas de la molécula, obteniendo una señal de alta intensidad (1.2e^7) a 335.1190 m/z (exactitud de masa <2 ppm). Esta señal corresponde al ion representado en la **Figura 21b** como resultado de la disociación del enlace iónico entre el fósforo y el bromo en condiciones de acidificación.

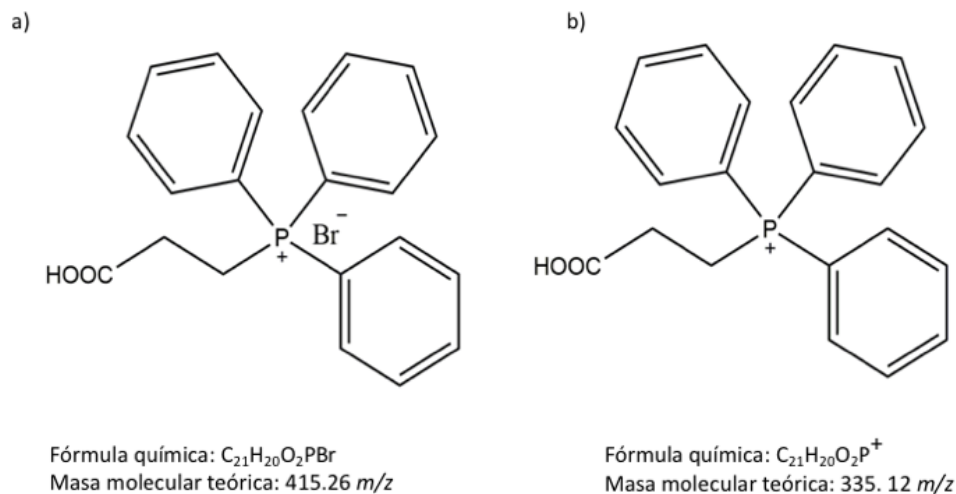


Figura 21. Masa molecular del compuesto 2CETPP. a) Estructura del bromuro de trifenilfosfonio, fórmula química y masa esperada. b) Estructura del ion $C_{21}H_{20}O_2P^+$ obtenido tras la ionización del compuesto y la masa molecular teórica calculada.

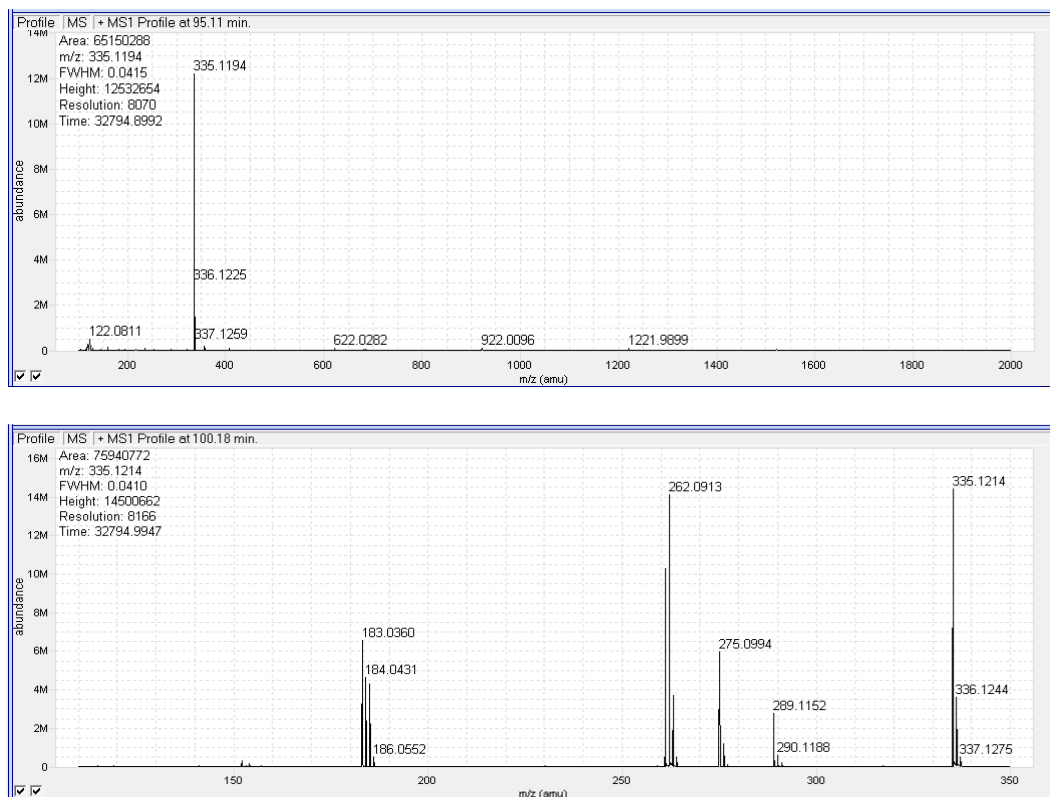


Figura 22. Espectro de masas del compuesto 2CETPP. Patrón de fragmentación correspondiente al catión $C_{21}H_{20}O_2P^+$.

3.7 Funcionalización de los nanorreactores

La funcionalización de los nanorreactores fue confirmada mediante el cambio en el potencial Z (**Fig. 23**). La carga superficial de los nanorreactores sin funcionalizar fue de -8.24 mV en solución amortiguadora MES a pH 6.5, mientras que las VLPs funcionalizadas presentan un potencial Z de -3.99 mV en las mismas condiciones.

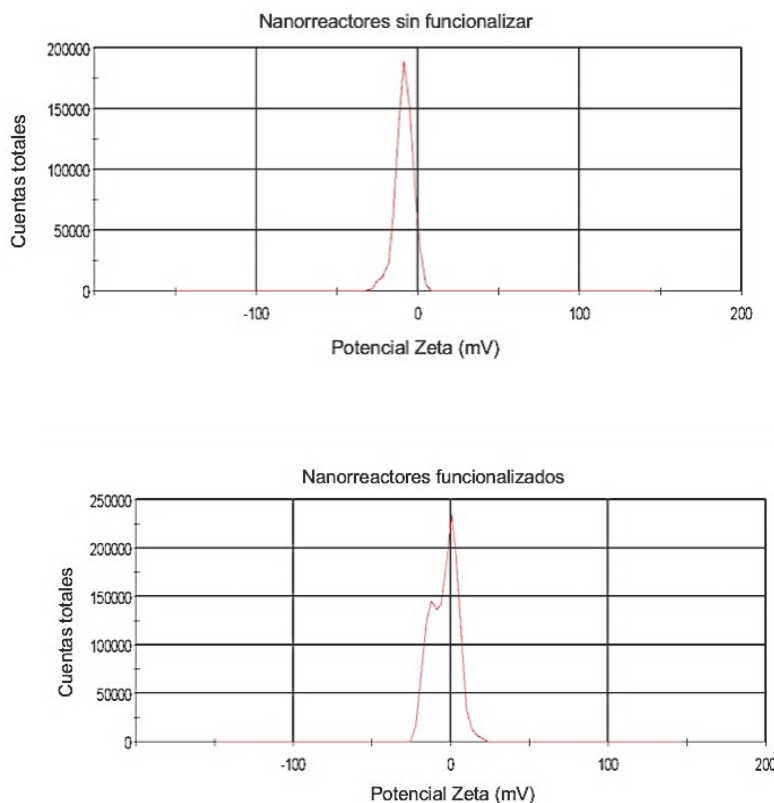


Figura 23. Carga superficial de los nanorreactores funcionalizados. Desplazamiento del potencial Z en muestra de nanorreactores funcionalizados y sin funcionalizar.

3.8 Ensayo de mitodirección de nanorreactores

En la **Figura 24**, se muestran las microscopías obtenidas a partir del ensayo de co-localización. La primera serie (24a, 24b y 24c) corresponde a las células incubadas con nanorreactores mitodirigidos (TP_{FITC}-BMV-TPP). La segunda serie (24d, 24e y 24f) muestra la intensidad obtenida en la muestra de nanorreactores sin funcionalizar (no mitodirigidos).

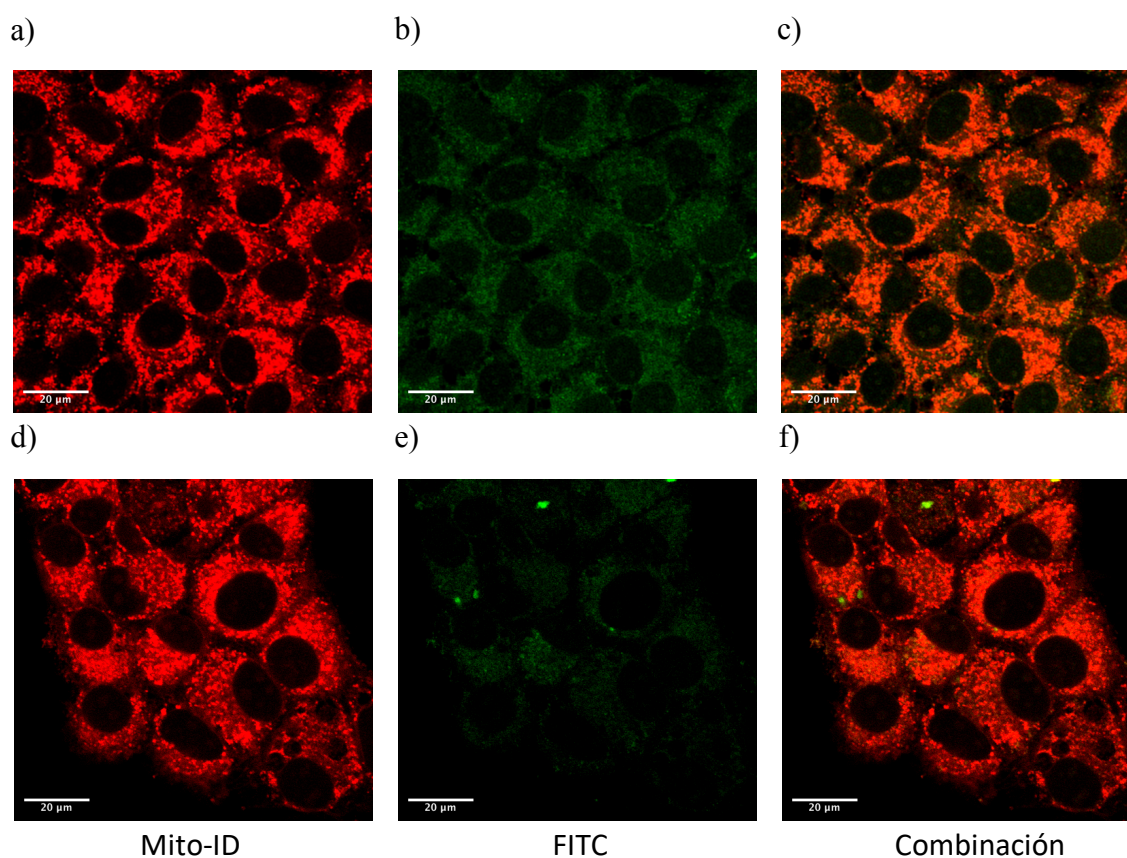


Figura 24. Micrografías de las células AML-12 en ensayo de co-localización. Muestra de células incubadas con nanorreactores funcionalizados con TPP (a,b y c). Muestra de células incubada con nanorreactores sin funcionalizar (d,e y f).

El análisis de co-localización fue realizado a partir de la combinación de los canales de Mito-ID y FITC. En el caso de la muestra funcionalizada con TPP se obtuvo una correlación de $74 \pm 5\%$ (**Figs. 25a y 25b**). En la muestra de nanorreactores sin funcionalizar el porcentaje de co-localización fue de $52 \pm 6\%$ (**Figs. 25c y 25d**).

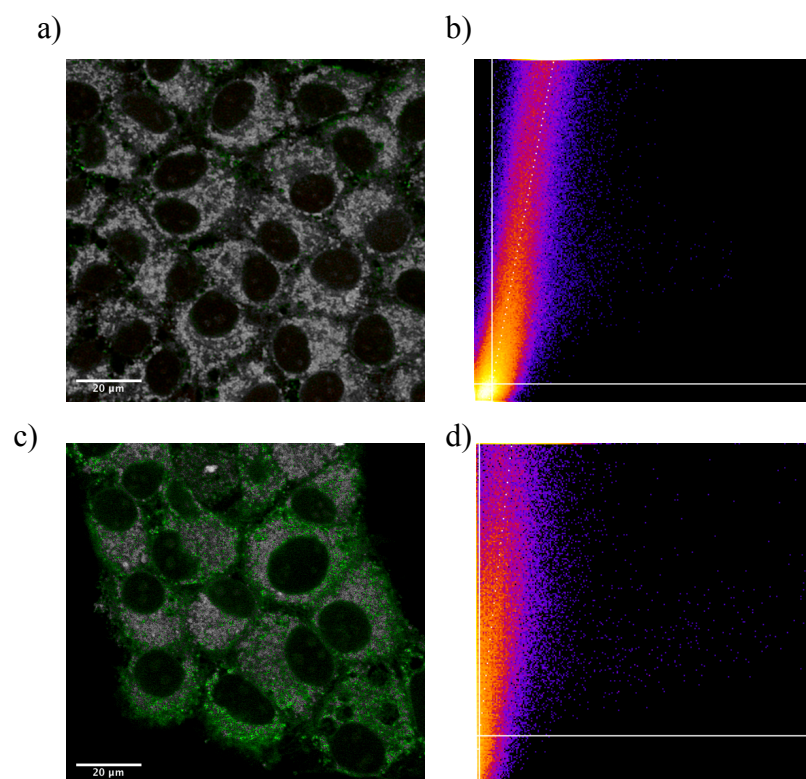


Figura 25. Análisis de correlación FITC-Mito-ID. Co-localización por pixel y mapa de correlación: funcionalizada (a y b) y sin funcionalizar (c y d). El color verde de la imagen de co-localización por pixel representa las zonas sin co-localización. El color gris corresponde a las zonas con co-localización.

Capítulo 4. Discusión

El ensamble de las cápsides virales del BMV se lleva a cabo de manera predominante por interacciones electrostáticas entre la proteína de cápside y el ARN del virus (Lin y Beal, 2012). Se ha reportado que el ácido ribonucleico de naturaleza aniónica interactúa con el amino terminal de la proteína de cápside que está orientado hacia adentro de la estructura icosaédrica (Ni et al., 2012). En el caso de las partículas tipo virus, la molécula a encapsidar funge como centro de nucleación para la formación de estas estructuras y por ello que resulta fundamental que posea una carga superficial suficientemente negativa para interactuar con la proteína de cápside (Šiber et al., 2010).

La carga superficial de la TP comercial utilizada en el presente proyecto fue de alrededor de -14 mV en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.0. Sin embargo, los ensayos preliminares de encapsidación no resultaron exitosos hasta que se realizó la funcionalización de la proteína con FITC, cambiando la carga superficial a -22 mV. Por otro lado, el tamaño de la enzima no se vio significativamente modificado, manteniéndose en aproximadamente 7.3 nm de diámetro hidrodinámico (**Fig. 8**).

Actualmente no existe un consenso acerca de la carga negativa y tamaño de proteínas necesarios para promover el autoensamblaje por interacciones electrostáticas, no obstante, se tiene reportada la estimación de un número de cargas negativas superficiales de 32,000 para el ARN nativo y 20 positivas para los dímeros de proteína de cápside (Garmann et al., 2014), así como el potencial Z de diversas nanopartículas metálicas ensambladas cuya carga es igual o mayor a -22 mV (Durán et al., 2020). Respecto a encapsidación de enzimas, se ha reportado que una carga de -17 mV a pH neutro (Olivares, 2020) o enzimas con puntos isoeléctricos por debajo de pH 4.0 resultan suficientes para el ensamble de nanorreactores (Gama, 2021). No obstante, es necesario un análisis a profundidad de la influencia del tamaño y la carga superficial de una mayor diversidad de enzimas para esclarecer su contribución en la reacción de encapsidación.

En la **Figura 14**, se observa que además del monómero de la enzima de 45 kDa, la preparación comercial exhibe una impureza de aproximadamente 70 kDa que ha sido reportada anteriormente por Finnis et al. (1993) para el mismo proveedor. Adicionalmente se aprecia que la intensidad de la impureza es mayor a la del monómero de TP, excepto en la preparación de ensambles purificados. Este resultado se complementa con el obtenido para el sobrenadante de la purificación, en el cual la banda de la impureza es más intensa que la correspondiente a la enzima (**Anexo 2**). Esto indica que el proceso de encapsidación incrementa la pureza de la enzima dentro de las cápsides con respecto a la pureza de la enzima de origen.

Por otro lado, se establece la posibilidad de modificar la carga superficial de las enzimas funcionalizándolas con moléculas pequeñas que enmascaren las cargas positivas de las mismas. Se plantea que la conjugación de proteínas con FITC resulta un método eficiente debido a la alta reactividad del grupo isotiocianato en presencia de grupos amino para la formación de tioureas (Breen et al., 2016). No obstante, esto dependerá de la pureza y concentración en la que se encuentra la enzima. Además, debe tomarse en cuenta que la modificación de las enzimas puede afectar su capacidad catalítica, como se observa en la disminución la actividad catalítica (k_{cat}) de la TP tras su funcionalización con FITC (**Tabla 2**), sin llegar a reducirla sustancialmente. A la par de la disminución de la velocidad, la funcionalización de la enzima exhibe una mejora en la afinidad por la timidina como sustrato; lo anterior podría asociarse a cambios de la polaridad de la superficie alrededor del sitio catalítico de la enzima (**Tabla 2**). Sin embargo, se requieren pruebas estructurales de la enzima modificada para su determinación.

A su vez, la enzima TP exhibe una curva típica de inhibición por sustrato a una concentración ≥ 0.55 M de timidina. Tomando en cuenta que en pacientes con MNGIE los niveles de timidina en plasma van de 3.9 a 17.7 $\mu\text{mol/L}$, se espera que la enzima no presente inhibición por sustrato a tales concentraciones.

Por otro lado, la reacción de ensamble se realizó usando una proporción de 3.6 moles de monómero de timidina por mol de proteína de cápside, misma que fue escalable hasta un volumen total de reacción de 1.5 mL manteniendo la proporción molar.

Mediante la modificación de la solución amortiguadora de proteínas en la cual se lleva a cabo la reacción de ensamble, se observó que al eliminar el EDTA en la primera etapa, la enzima no era encapsidada por la CP, obteniendo un diámetro hidrodinámico de alrededor de 7 nm (enzima y CP libres). Adicionalmente se registró una señal de aproximadamente 28 nm de diámetro en una proporción menor a 10% en volumen, no detectada en número (**Anexo 3**). Al realizar el análisis de la muestra por TEM se confirmó la ausencia de ensamblajes (**Anexo 3**) y se establece que la señal obtenida de 28 nm podría corresponder a la formación de cápsides vacías, de acuerdo con lo reportado en literatura para el ensamble de cápsides a pH menores que 5.0 y fuerza iónica entre 0.1 y 0.2 M (Lavelle et al., 2007).

Dada la diferencia significativa entre el peso molecular de las VLPs con la enzima y la CP en su estado libre, es posible utilizar la ultracentrifugación como método de purificación, al igual que para el virus nativo. Tras purificar, las poblaciones mayormente representadas corresponden a estructuras icosaédricas de un tamaño aproximado de 18 y 35 nm de diámetro (**Fig. 12**). Esto asociado a la capacidad que tiene la proteína

de cápside del BMV de formar estructuras T=1 y T=3 de tamaños similares a los obtenidos (Dedeo et al., 2011).

A partir de la cuantificación de proteína de cápside contenida en 15 µL de VLPs purificadas (**Fig. 15**) se obtuvieron 4.9 µg de CP total. Considerando el peso molecular de una subunidad de proteína de cápside como 20.3 kDa y un total de 180 subunidades por cápside viral, la cantidad de cápsides formadas se obtuvo a partir de la ecuación 1:

$$\text{Moles de VLPs} = \frac{4.91 \times 10^{-6} \text{ g de proteína de cápside}}{20,300 \text{ Da} \times 180 \text{ subunidades de CP}} \quad (1)$$

$$\text{Moles de VLPs} = 1.34 \times 10^{-12}$$

En cuanto a la determinación de enzima contenida en los nanorreactores en el ensayo de densitometría, se plantea que la presencia de FITC es capaz de aumentar la señal del colorante azul de Coomassie en los geles, ya que, en ausencia de la enzima, el isotiocianato de fluoresceína exhibe señal tornando azul la solución. Es por ello que para conocer la cantidad de enzima TP_{FITC} encapsulada, se requiere buscar otro método de cuantificación.

Como resultado de la síntesis del 2CETPP se obtuvieron 628 mg del compuesto, lo que representa el 46.3% de rendimiento de la reacción y con base en las tres caracterizaciones mostradas anteriormente (FTIR, RMN y LC-MS), se confirma la identidad e integridad de la molécula.

Adicionalmente, se obtuvo la funcionalización de las cápsides con un exceso de 300 x moles del derivado de trifenilfosfonio 2CETPP sintetizado en este proyecto. Esta funcionalización dió como resultado el cambio en la carga superficial de los nanorreactores. El desplazamiento de 4 unidades de la señal hacia el sentido positivo se relaciona con la naturaleza catiónica del compuesto, sin embargo, la contribución de la carga positiva es relativamente baja en comparación con lo reportado en literatura para otras partículas funcionalizadas con el mismo compuesto (Wei et al., 2015). Lo anterior puede deberse a la diferencia de sitios de unión presentes en la superficie de ambas partículas, ya que en el caso de los nanorreactores no se requiere de un proceso de aminación previo a la conjugación con trifenilfosfonio, sino que se aprovechan las cadenas laterales de los aminoácidos positivos (lisina, arginina y glutamina) en la superficie de las cápsides. Por su parte, el diámetro hidrodinámico de los nanorreactores no presentó un cambio significativo.

Con respecto al ensayo de mitodirección, en la **Figura 24** se contrastan las imágenes de las células obtenidas por medio de microscopía confocal. Para la muestra incubada con nanorreactores funcionalizados (i.e., mitodirigidos), se observa una señal mayor de colocalización en la combinación de los canales de FITC y Mito-ID (**Fig 24c**) en comparación con la muestra de nanorreactores sin funcionalizar (**Fig 24f**).

Cuantitativamente, el cultivo incubado con nanorreactores sin trifenilfosfonio arroja un porcentaje de correlación del $52 \pm 6\%$, mientras que el tratado con nanorreactores mitodirigidos fue de $74 \pm 5\%$, obteniendo un mapa de correlación con una pendiente más definida (**Fig. 25**). No obstante la cercanía con el eje de Mito-ID se debe a la diferencia de intensidad que prevalece en este canal respecto al de FITC. Esto podría modificarse añadiendo una cantidad mayor de FITC a la muestra, sin embargo, tomando en cuenta que los nanorreactores se internalizarán en las células mediante el potencial de membrana de las mitocondrias, se propone que el mejoramiento de la intensidad de FITC estará limitado a la saturación de nanorreactores funcionalizados dentro de la mitocondria.

Finalmente, se observó un fenómeno de inactivación de la timidina fosforilasa contenida en los nanorreactores que fue evaluada en función del pH al que la enzima es sometida durante el proceso de ensamble. Durante la primera etapa en solución amortiguadora de ensamble a pH 7.2, la enzima aún presenta actividad, no así después de la etapa de acidificación en solución amortiguadora de suspensión a pH 4.5.

Para establecer la relación entre el pH y la función de la enzima, se realizaron pruebas de actividad en la solución amortiguadora usada en el paso de acidificación a pH 4.5, 5.0 y 6.0, utilizando enzima libre sin funcionalizar, para descartar cambios en la actividad debido a la adición de FITC o la encapsidación.

En la **Figura 26** se muestra la comparación de la pendiente obtenida en las tres condiciones de pH. En la muestra a pH 4.5 se aprecia un aplanamiento de la pendiente que describe el consumo de la timidina como sustrato, lo que indica la ausencia de actividad TP. Esta muestra fue dializada durante 24 horas contra solución amortiguadora a pH 5.0 y 6.0 con el fin de reestablecer la actividad enzimática mediante el incremento del pH. Sin embargo, no se observó el reestablecimiento de la misma en un monitoreo realizado cada 24 horas durante 5 días.

De acuerdo con reportes sobre la actividad enzimática de la TP a diferentes pHs, la disminución drástica de la actividad ocurre por debajo de pH 5.0, perdiendo su actividad casi por completo a pH 4.5 (Oh y el

Kouni, 2019) y sin establecer su reversibilidad. En contraste con la amplia caracterización de su inhibición por sustratos, la inhibición irreversible provocada por la acidificación de la enzima carece de reportes al momento de la publicación de este trabajo.

El pH en la etapa de acidificación resulta importante debido a que brinda estabilidad a las cápsides al promover la interacción entre los dímeros de CP, lo cual resulta crucial para su estabilidad. Se ha reportado que la etapa de acidificación puede realizarse a un pH mayor a 4.5, por tanto en perspectiva a este proyecto se propone la modificación de las relaciones molares entre TP y CP para ensamblar la enzima a un pH mayor, tal que provea la acidez necesaria para mantener la estabilidad de los ensamblajes y sea lo suficientemente cercano al pH óptimo de la enzima. Al mismo tiempo, se establece la posibilidad de modificar la fuerza iónica de la solución de acidificación o la adición de iones magnesio a soluciones cercanas a la neutralidad, con el objetivo de disminuir el riesgo de desensamblaje debido al incremento en el pH.

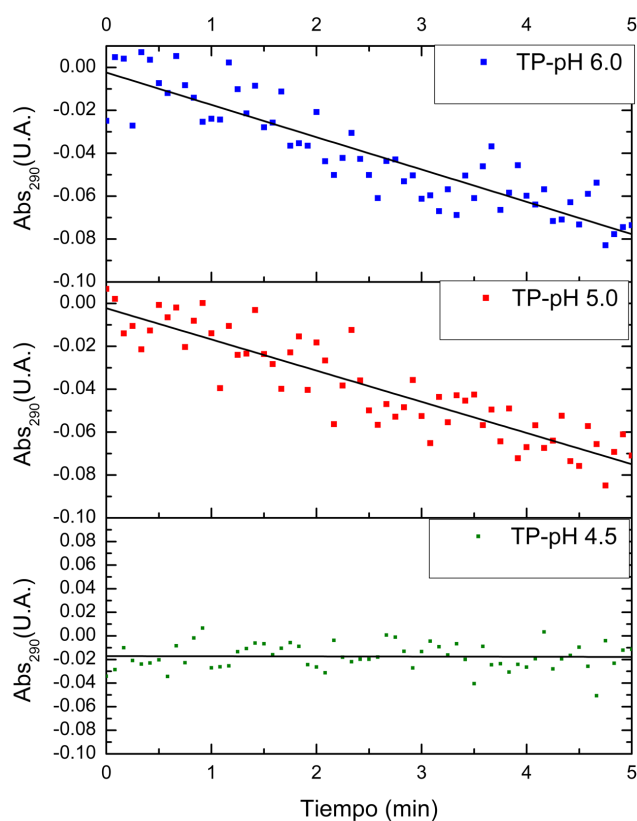


Figura 26. Inhibición de la actividad enzimática. Prueba de actividad de la enzima comercial en estado libre (20 U) a diferentes pH ácidos. La pendiente negativa indica la degradación de la timidina como sustrato.

Capítulo 5. Conclusiones

Este trabajo se enfocó en la encapsidación de la enzima TP dentro de VLPs para ser dirigidas de manera específica hacia mitocondrias. Para ello, se empleó un método de autoensamble de la CP del BMV basado en interacciones electrostáticas complementarias. Para promover la interacción entre la enzima y las proteínas de la cápside, la TP fue funcionalizada con FITC como estrategia para aumentar su carga negativa. Obteniendo el desplazamiento de su potencial Z en 7 unidades en sentido negativo, sin modificar significativamente su tamaño.

Por otro lado, se establece que la unión de FITC a la enzima modifica sus parámetros cinéticos, disminuyendo el número de recambio (k_{cat}) y aumentando aparentemente la afinidad de la enzima por la timidina como sustrato (K_M). Como resultado del incremento en la carga negativa, se formaron estructuras fluorescentes, cuasi-esféricas, similares en tamaño al virus nativo (alrededor de 28 nm), que contuvieron a la enzima en su interior. La caracterización de las cápsides formadas se llevó a cabo por medio de TEM y espectroscopía de dispersión dinámica de luz.

Para mitodirigir los nanorreactores hacia las mitocondrias se realizó la síntesis del compuesto (2-carboxietil) bromuro de trifenilfosfonio (2CETPP) utilizando como precursores trifenilfosfeno y ácido 3-bromopropiónico, obteniendo como producto el reactivo en su estado sólido con un rendimiento de la reacción del 46.3%. La identidad del 2CETPP se confirmó por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, espectroscopía de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

La superficie de los nanorreactores fue funcionalizada con trifenilfosfonio y la unión fue caracterizada mediante la diferencia en el potencial Z de nanorreactores funcionalizados y sin funcionalizar, dando como resultado un desplazamiento de la carga superficial de 4 unidades en sentido positivo.

Finalmente, la internalización hacia las mitocondrias fue observada en un ensayo de co-localización marcando con Mito-ID Red las mitocondrias de hepatocitos murinos de la línea AML-12 y correlacionando la señal con la del marcador FITC unido a la enzima dentro de las cápsides. En comparación al control sin funcionalizar ($52 \pm 6\%$), la señal de co-localización fue mayor en la muestra de nanorreactores mitodirigidos con TPP ($74 \pm 5\%$). Se concluye que la encapsidación de la enzima TP en cápsides del BMV para su mitodirección brinda la posibilidad de desarrollar un tratamiento para MNGIE más específico a los descritos en la literatura hasta el momento.

Al mismo tiempo, la dirección de partículas tipo virus en este trabajo representa una plataforma para evaluar la entrega dirigida de otros compuestos terapéuticos hacia la mitocondria.

Literatura citada

- Allen, M., Bulte, J., Liepold, L., Basu, G., Zywicke, H., Frank, Douglas, T. 2005. Paramagnetic viral nanoparticles as potential high-relaxivity magnetic resonance contrast agents. *Magnetic Resonance in Medicine*, 54(4), 807–812. <https://doi.org/10.1002/mrm.20614>
- Aljabali, A., Berardi, A., Evans, D. 2018. Nature's nanoparticles: using viruses as nanomedicines and for bioimaging. *Fundamentals of Nanoparticles*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-51255-8.00002-1>
- AMGEN. s.f. Timeline of Medical Biotechnology. Amgen Inc. Consultado el 20 de Julio del 2021. <https://www.biotechnology.amgen.com/timeline.html>
- Bansal, Y., Silakari, O. 2014. *Multifunctional compounds: Smart molecules for multifactorial diseases*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 76, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.01.060>
- Barton, N., Brady, R., Dambrosia, J., Di Bisceglie, A., Doppelt, S., Hill, S., Mankin, H., Murray, G., Parker, R., Argoff, C. 1991. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency--macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *The New England journal of medicine*, 324(21), 1464–1470. <https://doi.org/10.1056/NEJM199105233242104>
- Bax B. 2020. Erythrocytes as Carriers of Therapeutic Enzymes. *Pharmaceutics*, 12(5), 435. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050435>
- Bax, B., Bain, M., Fairbanks, L., Webster, A., Chalmers, R. 2000. In vitro and in vivo studies with human carrier erythrocytes loaded with polyethylene glycol-conjugated and native adenosine deaminase. *British Journal of Haematology*, 109(3), 549–554. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.02059.x>
- Boisseau, P., Loubaton, B. 2011. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Physique*, 12(7), 620–636. <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2011.06.001>
- Boschetti, E., D'Alessandro, R., Bianco, F., Carelli, V., Cenacchi, G., Pinna, A. D. 2014. Liver as a source for thymidine phosphorylase replacement in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *PLoS ONE* 9:e96692. doi: 10.1371/journal.pone.0096692
- Breen, C., Raverdeau, M., Voorheis, H. 2016. Development of a quantitative fluorescence-based ligand-binding assay. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep25769
- Bright, R., Carter, D., Daniluk, S., Toapanta, F., Ahmad, A., Gavrilov, V., Ross, T. 2007. Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. *Vaccine*, 25(19), 3871–3878. doi:10.1016/j.vaccine.2007.01.106.
- Bundy, G. 1976. United States Patent. Phenyl-substituted prostaglandin-f type analogs, (3987087), 53.

- Buonaguro, L., Tagliamonte, M., Tornosello, M., Buonaguro, F. 2011. Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases and cancer. *Expert Review of Vaccines*, 10(11), 1569–1583. <https://doi.org/10.1586/erv.11.135>
- Chauhan, K., Hernandez-Meza, J., Rodríguez-Hernández, A., Juárez-Moreno, K., Sengar, P., Vazquez-Duhalt, R. 2018. Multifunctionalized biocatalytic P22 nanoreactor for combinatory treatment of ER+ breast cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0345-2>
- ClinicalTrials.gov. Nirmalanathan (MBBS): National Library of Medicine (US). 7 de marzo del 2019- . Identifier NCT03866954, Trial of Erythrocyte Encapsulated Thymidine Phosphorylase In Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy (TEETPIM); Actualizado al 5 de noviembre del 2019, Consultado el 24 de junio del 2020 en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03866954>
- Cooper, G. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9921/>
- Concolino, D., Deodato, F., Parini, R. 2018. Enzyme replacement therapy: efficacy and limitations. *Italian Journal of Pediatrics*, 44(S2). doi:10.1186/s13052-018-0562-1
- Crunkhorn, S. 2013. Regulatory watch: Enhanced chance of success for protein replacement therapies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(6), 414. <https://doi.org/10.1038/nrd4027>
- Dedeo, M., Finley, D., Francis, M. 2011. Viral Capsids as Self-Assembling Templates for New Materials. *Molecular Assembly in Natural and Engineered Systems*, 353–392. doi:10.1016/b978-0-12-415906-8.00002-9.
- Desnick, R., Schuchman, E. 2012. *Enzyme Replacement Therapy for Lysosomal Diseases: Lessons from 20 Years of Experience and Remaining Challenges. Annual Review of Genomics and Human Genetics* (Vol. 13). <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090711-163739>
- De Vocht, C., Ranquin, A., Willaert, R., Van Ginderachter, J. A., Vanhaecke, T., Rogiers, V., et al. 2009. Assessment of stability, toxicity and immunogenicity of new polymeric nanoreactors for use in enzyme replacement therapy of MNGIE. *J. Control. Release* 137, 246–254. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.03.020
- Durán-Meza, A., Escamilla-Ruiz, M., Segovia-González, X., Villagrana-Escareño, M., Vega-Acosta, J., Ruiz-García, J. 2020. Encapsulation of Different Plasmonic Gold Nanoparticles by the CCMV CP. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(11), 2628. <https://doi.org/10.3390/molecules25112628>.
- European Medicines Agency. 2020. Public summary of opinion on orphan designation. Recombinant thymidine phosphorylase encapsulated in autologous erythrocytes for the treatment of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) due to thymidine phosphorylase deficiency. Consultado el 22 de mayo del 2020 en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/orphan-designation/eu/3/11/856-public-summary-positive-opinion-orphan-designation-recombinant-thymidine-phosphorylase_en.pdf

- Fang J. Y. 2006. Nano- or submicron-sized liposomes as carriers for drug delivery. *Chang Gung medical journal*, 29(4), 358–362.
- Finnis, C., Dodsworth, N., Pollitt, C., Carr, G., Sleep, D. 1993. Thymidine phosphorylase activity of platelet-derived endothelial cell growth factor is responsible for endothelial cell mitogenicity. *European Journal of Biochemistry*, 212(1), 201–210. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17651.x.
- Frietze, K., Peabody, D., Chackerian, B. 2016. Engineering virus-like particles as vaccine platforms. *Current opinion in virology*, 18, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.03.001>
- Gama, P., Cadena-Nava, R. D., Juarez-Moreno, K., Pérez-Robles, J., Vazquez-Duhalt, R. 2021. Virus-Based Nanoreactors with GALT Activity for Classic Galactosemia Therapy. *ChemMedChem*, 16(9), 1438–1445. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000999>.
- Garmann, R., Comas-Garcia, M., Koay, M., Cornelissen, J., Knobler, C., Gelbart, W. 2014. Role of electrostatics in the assembly pathway of a single-stranded RNA virus. *Journal of virology*, 88(18), 10472–10479. <https://doi.org/10.1128/JVI.01044-14>.
- Grandi, P., Bantscheff, M. 2019. Advanced proteomics approaches to unravel protein homeostasis. *Drug Discovery Today: Technologies*, 31, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2019.02.001>
- Gonçalves, G., Paiva, R. 2017. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, 15(3), 369–375. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082017RB4024>
- González, O. 2020. Diseño de nanorreactores con actividad citocromo P450 activados con glucosa oxidasa. (Tesis doctoral). Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, México.
- Gorzelay, J., De Souza, M. 2013. Protein replacement therapies for rare diseases: A breeze for regulatory approval? *Science Translational Medicine*, 5(178), 1–4. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005007>
- Halter J., Michael W, Schüpbach M. 2015. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *Brain*. 2015;138 (10):2847-2858. doi:10.1093/brain/awv226
- He, G., Zhang, Z., Sathanantham, P., Diaz, A., Wang, X. 2021. Brome Mosaic Virus (Bromoviridae). *Encyclopedia of Virology*, 252–259. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21294-6>
- Heller, A., Brockhoff, G., Goepferich, A. 2012. Targeting drugs to mitochondria. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 82(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.05.014>
- Hema, M., Vishnu Vardhan, G., Savithri, H., Murthy, R. 2018. *Emerging trends in the development of plant virus-based nanoparticles and their biomedical applications. Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00006-4>

- Hirano, M., Martí, R., Casali, C., Tadesse, S., Uldrick, T., Fine, B., Escolar, D., Valentino, M., Nishino, I., Hesdorffer, C., Schwartz, J., Hawks, R., Martone, D., Cairo, M., DiMauro, S., Stanzani, M., Garvin, J., Savage, D. 2006. Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. *Neurology*, 67(8), 1458–1460. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000240853.97716.24>
- Hirano, M., Nishigaki, Y., Martí, R. 2004. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a disease of two genomes. *Neurologist* 10, 8–17. doi: 10.1097/01.nrl.0000106919.06469.04
- Hirano, M., Garcia-de-Yebenes, J., Jones, A., Nishino, I., DiMauro, S., Carlo, J. 1998. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome maps to chromosome 22q13.32-qter. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 526–533. doi: 10.1086/301979
- Hirano, M., Silvestri, G., Blake, D., Lombes, A., Minetti, C., Bonilla, E. 1994. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): clinical, biochemical, and genetic features of an autosomal recessive mitochondrial disorder. *Neurology* 44, 721–727. doi: 10.1212/WNL.44.4.721
- Hubert, L., Sutton, V. 2017. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. Biomarkers in Inborn Errors of Metabolism. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802896-4.00009-2>
- Ikeguchi, M., Sakatani, T., Ueda, T., Hirooka, Y., Kaibara, N. 2001. Thymidine phosphorylase activity in liver tissue and its correlation with multifocal occurrence of hepatocellular carcinomas. *In Vivo* 15, 265–270
- Koyani, R., Pérez-Robles, J., Cadena-Nava, R., 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>
- Krenitsky, T., Bushby, S. 1979 United States Patent 4,178,212, 1-8, Burroughs Wellcome Co., Research Triangle Park, NC.
- Kripps, K., Nakayuenyongsuk, W., Shayota, B., Berquist, W., Gomez-Ospina, N., Esquivel, C., Larson, A. 2020. Successful liver transplantation in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *Molecular Genetics and Metabolism*, 130(1), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.03.001>
- Lara, M., Valentino, M., Torres-Torronteras, J., Hirano, M., Martí, R. 2007. Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy (MNGIE): biochemical features and therapeutic approaches. *Biosci. Rep.* 27, 151–163. doi: 10.1007/s10540-007-9043-2
- Lara, M., Weiss, B., Illa, I., Madoz, P., Massuet, L., Andreu, A. 2006. Infusion of platelets transiently reduces nucleoside overload in MNGIE. *Neurology* 67, 1461–1463. doi: 10.1212/01.wnl.0000239824.95411.52
- Lavelle, L., Michel, J., Gingery, M. 2007. The disassembly, reassembly and stability of CCMV protein capsids. *Journal of Virological Methods*, 146(1–2), 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.07.020>

- Liberman, E., Topaly, V., Tsofina, L., Jasaitis, A., Skulachev, V. 1969. Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria. *Nature*, 222(5198), 1076–1078. <https://doi.org/10.1038/2221076a0>
- Lin, H., Van Der Schoot, P., Zandi, R. 2012. Impact of charge variation on the encapsulation of nanoparticles by virus coat proteins. *Physical Biology*, 9(6). <https://doi.org/10.1088/1478-3975/9/6/066004>
- Lin, M., Beal, M. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), 787–795. <https://doi.org/10.1038/nature05292>
- Lobedanz, S., Damhus, T., Borchert, T., Hansen, T., Lund, H., Lai, W. Kirk, O. 2016. Enzymes in Industrial Biotechnology. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. <https://doi.org/10.1002/0471238961.0914042114090512.a01.pub3>
- Logan, A., Murphy, M. 2017. Using chemical biology to assess and modulate mitochondria: progress and challenges. *Interface focus*, 7(2), 20160151. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2016.0151>
- Madar, I., Ravert, H., Du, Y., Hilton, J., Volokh, L., Dannals, R., Frost, J., Hare, J. 2006. Characterization of uptake of the new PET imaging compound 18F-fluorobenzyl triphenyl phosphonium in dog myocardium. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 47(8), 1359–1366.
- Mateu, M. 2013. Assembly, stability and dynamics of virus capsids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 531(1-2), 65–79. doi:10.1016/j.abb.2012.10.015
- Mitselou, A., Ioachim, E., Skoufi, U., Tsironis, C., Tsimogiannis, K., Skoufi, C. 2012. Predictive role of thymidine phosphorylase expression in patients with colorectal cancer and its association with angiogenesis-related proteins and extracellular matrix components. *In Vivo* 26, 1057–1067
- Murphy, M., Hartley, R. 2018. Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(12), 865–886. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.174>
- Murphy, M. 1997. Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria. *Trends in Biotechnology*, 15(8), 326–330. doi:10.1016/s0167-7799(97)01068-8
- Nakayama, Y., Inoue, Y., Nagashima, N., Katsuki, T., Matsumoto, K., Kadowaki, K., 2005. Expression levels of thymidine phosphorylase (TP) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in patients with gastrointestinal cancer. *Anticancer Res.* 25, 3755–3761
- Nardin, C., Widmer, J., Winterhalter, M., Meier, W. 2001. Amphiphilic block copolymer nanocontainers as bioreactors. *The European Physical Journal E*, 4(4), 403–410. doi:10.1007/s101890170095
- Ni, P., Wang, Z., Ma, X., Das, N. C., Sokol, P., Chiu, W., Dragnea, B., Hagan, M., Kao, C. 2012. An examination of the electrostatic interactions between the N-terminal tail of the Brome Mosaic Virus coat protein and encapsidated RNAs. *Journal of molecular biology*, 419(5), 284–300. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.03.023>

- Nishino, I., Spinazzola, A., Papadimitriou, A., Hammans, S., Steiner, I., Hahn, C. 2000. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: an autosomal recessive disorder due to thymidine phosphorylase mutations. *Ann. Neurol.* 47, 792–800. doi: 10.1002/1531-8249(200006)47:6<792::AID-ANA12>3.0.CO;2-Y
- Nishino, I., Spinazzola, A., Hirano, M. 1999. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 283, 689–692. doi: 10.1126/science.283.5402.689
- Nishigaki, Y., Marti, R., Copeland, W., Hirano, M. 2003. Site-specific somatic mitochondrial DNA point mutations in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *J. Clin. Invest.* 111, 1913–1921. doi: 10.1172/JCI17828
- Oh, T., el Kouni, M. 2019. Kinetics mechanism and regulation of native human hepatic thymidine phosphorylase. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 110, 122–129. doi:10.1016/j.biocel.2019.03.004
- Okamura, K., Santa, T., Nagae, K., and Omae, T. 1976. Congenital oculoskeletal myopathy with abnormal muscle and liver mitochondria. *J. Neurol. Sci.* 27, 79–91. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(76\)90236-7](https://doi.org/10.1016/0022-510X(76)90236-7)
- Olivares-Medina, C. 2020. Nanobiorreactores con actividad β -glucocerebrosidasa para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 56 pp.
- Orphanet. 2009. Encefalomiopatía neurogastrointestinal mitochondrial. Consultado el 1 de noviembre del 2021 en: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=ES&Expert=298
- Pacitti, D. 2018. The Development of an in Vitro Cerebral Organoid Model for Investigating the Pathomolecular Mechanisms Associated with the Central Nervous System of Patients with Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalomyopathy (MNGIE): A Proof of Concept Study. Doctoral Ph.D. thesis, St.
- Prakash, J., Yeneti, W., Kumar, N. 2011. Self-Assembling Polymers as Polymersomes for Drug Delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 17(1), 65–79. <https://doi.org/10.2174/138161211795049822>
- Papadimitriou, A., Comi, G., Hadjigeorgiou, G., Bordoni, A., Sciacco, M., Napoli, L. 1998. Partial depletion and multiple deletions of muscle mtDNA in familial MNGIE syndrome. *Neurology* 51, 1086–1092. doi: 10.1212/WNL.51.4.1086
- Patterson, D., Prevelige, P., Douglas, T. (2012). Nanoreactors by Programmed Enzyme Encapsulation Inside the Capsid of the Bacteriophage P22. *ACS Nano*, 6(6), 5000–5009. doi:10.1021/nn300545z

- PubChem. 2021. (2-Carboxyethyl) triphenylphosphonium bromide (Compound). Disponible en: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Carboxyethyl_triphenylphosphonium-bromide#section=Structures
- Pugmire, M., Cook, W., Jasanoff, A., Walter, M., Ealick, S. 1998. Structural and theoretical studies suggest domain movement produces an active conformation of thymidine phosphorylase. *Journal of Molecular Biology*, 281(2), 285–299. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1941>
- Rae, C., Wei Khor, I., Wang, Q., Destito, G., Gonzalez, M., Singh, P., Manchester, M. 2005. Systemic trafficking of plant virus nanoparticles in mice via the oral route. *Virology*, 343(2), 224–235
- Robinson, P. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>
- Rohovie, M., Nagasawa, M., Swartz, J. 2017. Virus-like particles: Next-generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery. *Bioengineering & translational medicine*, 2(1), 43–57. <https://doi.org/10.1002/btm2.10049>
- Ross, M., Prime, T., Abakumova, I., James, A., Porteous, C., Smith, R., Murphy, M. 2008. Rapid and extensive uptake and activation of hydrophobic triphenylphosphonium cations within cells. *The Biochemical journal*, 411(3), 633–645. <https://doi.org/10.1042/BJ20080063>
- Scarpelli, M., Russignan, A., Zombor, M., Bereczki, C., Zappini, F., Buono, R. 2012. Poor outcome in a mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy patient with a novel TYMP mutation: the need for early diagnosis. *Case Rep. Neurol.* 4, 248–253. doi: 10.1159/000346260
- Shaw, T., Smillie, R., Miller, A., MacPhee, D. 1988. The role of blood platelets in nucleoside metabolism: regulation of platelet thymidine phosphorylase. *Mutat. Res.* 200, 117–131. doi: 10.1016/0027-5107(88)90075-9
- Šiber, A., Zandi, R., Podgornik, R. 2010. Thermodynamics of nanospheres encapsulated in virus capsids. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 81(5), 1–11. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.81.051919>
- Smith, R., Hartley, R., Cochemé, H., Murphy, M. 2012. Mitochondrial pharmacology. *Trends in pharmacological sciences*, 33(6), 341–352. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.03.010>
- Smith, R., Porteous, C., Gane, A., Murphy, M. 2003. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), 5407–5412. <https://doi.org/10.1073/pnas.0931245100>
- Spinazzola, A., Marti, R., Nishino, I., Andreu, A., Naini, A., Tadesse, S. 2002. Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *J. Biol. Chem.* 277, 4128–4133. doi: 10.1074/jbc.M111028200

- Schwarz, B., Uchida, M., Douglas, T. 2017. Biomedical and Catalytic Opportunities of Virus-Like Particles in Nanotechnology. *Advances in Virus Research* (1ra ed., Vol. 97). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.09.002>
- Taanman, J., Daras, M., Albrecht, J., Davie, C., Mallam, E., Muddle, J. 2009. Characterization of a novel TYMP splice site mutation associated with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *Neuromuscu. Disord.* 19, 151–154. doi: 10.1016/j.nmd.2008. 11.002
- U.S. Food and Drug Administration. 2020. Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=reportsSearch.process&rptName=2&reportSelectMonth=11&reportSelectYear=1987&nav>
- Van Kuilenburg, A., Zoetekouw, L. 2006. Determination of thymidine phosphorylase activity in human blood cells and fibroblasts by a nonradiochemical assay using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 25(9–11), 1261–1264. <https://doi.org/10.1080/15257770600889006>
- Vellard, M. 2003. The enzyme as drug: Application of enzymes as pharmaceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4), 444–450. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00092-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00092-2)
- Vriezema, D., Aragonés, M., Elemans, J., Cornelissen, J., Rowan, A., Nolte, R. 2005. Self- Assembled Nanoreactors. *Chem. Rev.* 105, 1445– 1489
- Wang, W., Georgios, K., Rong, T. 2018. HHS Public Access. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Wang, Z., Guo, W., Kuang, X., Hou, S., Liu, H. 2017. Nanopreparations for mitochondria targeting drug delivery system: Current strategies and future prospective. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(6), 498–508. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.05.006>
- Wei, J., Yu, C., Wang, L., Wang, J., Zhou, Z., Yang, H., Yang, S. 2015. Cytotoxicity of mitochondrial-targeting silica-coated manganese oxide nanoparticles. *Science China Chemistry*, 58(10), 1537–1543. doi:10.1007/s11426-015-5374-1
- Weissig, V. 2020. Drug Development for the Therapy of Mitochondrial Diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 26(1), 40–57. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.09.002>
- Xu, J. 2020. Regulation of Cancer Immune Checkpoints. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-3266-5>
- Yadak, R., Smitt, P., Van Gisbergen, M., Van Til, N., De Co, I. 2017. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy caused by thymidine phosphorylase enzyme deficiency: From pathogenesis to emerging therapeutic options. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(February). <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00031>

- Yang, Z., Wang, X., Diao, H., Zhang, J., Li, H., Sun, H., Guo, Z. 2007. Encapsulation of platinum anticancer drugs by apoferritin. *Chemical Communications*, (33), 3453. doi:10.1039/b705326f
- Yavuz, H., Ozel, A., Christensen, M., Christensen, E., Schwartz, M., Elmaci, M. 2007. Treatment of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy with dialysis. *Arch. Neurol.* 64, 435–438. doi: 10.1001/archneur.64.3.435
- Zielonka, J., Joseph, J., Sikora, A., Hardy, M., Ouari, O., Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B. 2017. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chemical Reviews*, 117(15), 10043–10120. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00042>

Anexos

Anexo 1

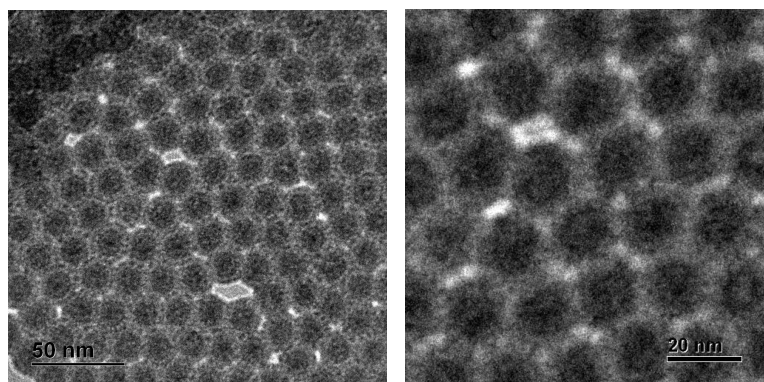


Figura 27. Micrografía electrónica del virus BMV nativo. Carril izquierdo: marcador de peso molecular. Carril derecho: Sobrenadante concentrado a partir de 7 ml de solución de sacarosa.

Anexo 2

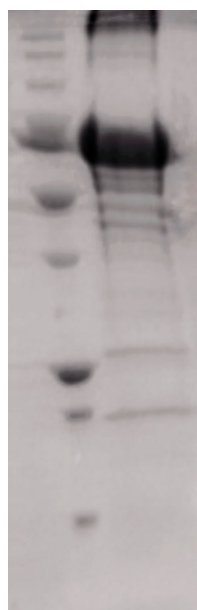


Figura 28. Sobrenadante concentrado de la purificación de VLPs. Carril izquierdo: marcador de peso molecular.
Carril derecho: Sobrenadante concentrado a partir de 7 ml de solución de sacarosa.

Anexo 3

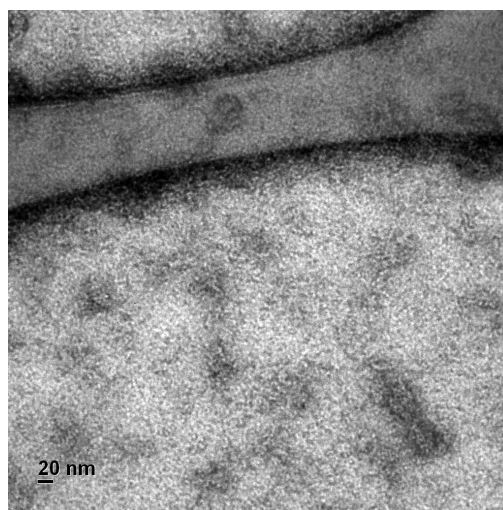
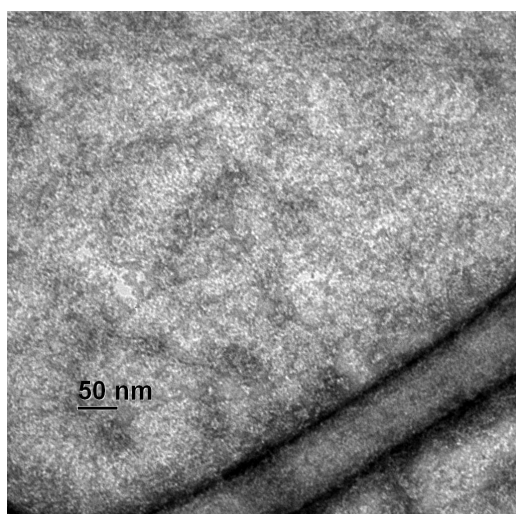
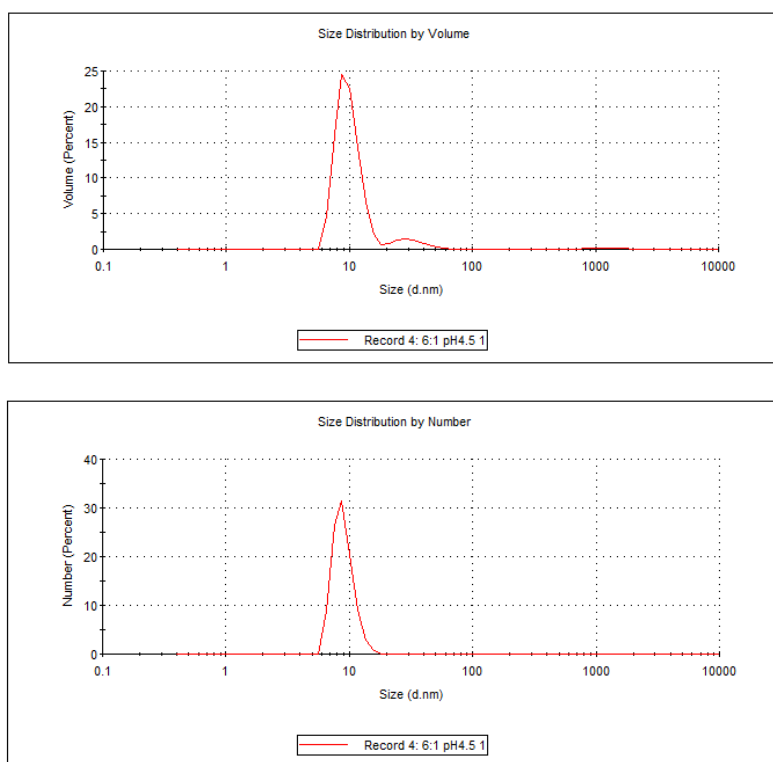


Fig. 29 Resultados de reacción de ensamble no exitosa. Diámetro hidrodinámico de alrededor de 7 nm, con una señal a 28 nm menor al 10% en volumen. Microscopía electrónica de transmisión de la enzima y la proteína de cápside en su estado libre tras reacción de ensamble.