

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

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

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

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



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Nanorreactores enzimáticos para el tratamiento de la
enfermedad de Pompe**

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

Presenta:

Jordán Molina Solís

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Jordán Molina Solís

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Director de tesis

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña

Dra. Ernestina Castro Longoria

Dra. Ivone Giffard Mena

Dr. Rubén Darío Cadena Nava



Dra. Catalina López Bastidas
Coordinadora del Posgrado en Ciencias en Nanociencias

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Jordán Molina Solís** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Nanorreactores enzimáticos para el tratamiento de la enfermedad de Pompe

Resumen aprobado por:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Director de tesis

La enfermedad de Pompe (EP) es un trastorno hereditario caracterizado por la deficiencia de la enzima alfa glucosidasa acida (GAA), que conlleva a la acumulación de glucógeno dentro de los lisosomas y que resulta perjudicial para la salud. La terapia de reemplazo enzimático (TRE) ha sido el principal tratamiento para hacer frente a la EP, sin embargo, su efectividad se ve reducida por la activación del sistema inmune, procesos proteolíticos y la dificultad que presenta la enzima terapéutica para atravesar la barrera hematoencefálica. El objetivo de este trabajo fue diseñar y sintetizar nanorreactores enzimáticos basados en el confinamiento de la enzima GAA en cápsides del virus del mosaico del bromo (BMV), con el fin de buscar posibles terapias para mejorar el tratamiento de la EP. Por lo cual, los nanorreactores con actividad enzimática GAA fueron sintetizados mediante el método de autoensamble de las proteínas de cápside del virus BMV en presencia de la enzima GAA. La proteína de cápside del BMV se obtuvo a partir del desensamble del virión nativo. La cantidad de enzima encapsulada se evaluó por medio de electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. La actividad enzimática de la GAA libre y de la GAA confinada en las cápsides virales fueron estudiadas utilizando el sustrato *p*-nitrofenol α -D-glucósido (pNP-Glc), y por medio del modelo de Michaelis-Menten se determinaron las constantes catalíticas correspondientes. Los resultados indican que el sustrato es menos a fin hacia la enzima libre ($K_M = 0.61 \pm 0.2 \mu\text{M}$), en comparación con la enzima encapsulada ($K_M = 0.11 \pm 0.03 \mu\text{M}$), no obstante, la enzima confinada en las cápsides presenta menor actividad ($k_{\text{cat}} = 124 \pm 24 \text{ s}^{-1}$), en contraste con la enzima libre ($k_{\text{cat}} = 355 \pm 30 \text{ s}^{-1}$). Por otro lado, la microscopía electrónica de transmisión (TEM), muestra que los nanorreactores sintetizados poseen una morfología cuasi-esférica con un diámetro promedio de $26 \pm 3 \text{ nm}$, similares al virión nativo. En conclusión, se han sintetizado de manera exitosa nanorreactores enzimáticos con actividad GAA con la posibilidad de poder ser usados para mejorar el tratamiento de la enfermedad de Pompe.

Palabras clave: Alfa Glucosidasa Acida, Enfermedad de Pompe, Nanorreactores enzimáticos, Terapia de reemplazo enzimático, Virus del mosaico del bromo.

Abstract of the thesis presented by **Jordán Molina Solís** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

Enzymatic nanoreactors for the treatment of Pompe disease

Abstract approved by:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Thesis Director

Pompe disease (PD) is an inherited disorder originated by the deficiency of the enzyme acid alfa-glucosidase (GAA) that induces the glycogen accumulation inside the lysosomes, which is detrimental to health. The enzyme replacement therapy (ERT) has been, so far, the main treatment to contend with the EP, however, its effectivity is reduced by the immune response, enzyme proteolysis and the enzyme difficulty to cross the blood brain barrier. The aim of this work was to design and synthesize enzymatic nanoreactors based on the enzyme confinement inside the virus-like particles from the brome mosaic virus (BMV) in order to search for possible therapies to improve the treatment of PD. The GAA confinement was performed by the self-assembly of the coat proteins of BMV in the presence of GAA. The coat protein from BMV was obtained and purified from the disassemble of native virus. Several mass proportions of GAA and capsid protein were tested in the auto-assembly reaction. The amount of encapsulated enzyme was determined by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. The enzymatic activity of free GAA and GAA confined were studied using the substrate *p*-nitrophenol α -D-glucoside (pNP-Glc, and the corresponding catalytic constants were determined by means of the Michaelis-Menten model. The results showed a higher substrate affinity of the nanoreactors ($K_M = 0.11 \pm 0.03 \mu\text{M}$) than the free enzyme ($K_M = 0.61 \pm 0.2 \mu\text{M}$), nevertheless, the transformation rate was higher with the free enzyme ($k_{\text{cat}} = 355 \pm 30 \text{ s}^{-1}$) than the confined GAA ($k_{\text{cat}} = 124 \pm 24 \text{ s}^{-1}$). On the other hand, the transmission electron microscopy (TEM) showed that the nanoreactors are quasi-spheric shape with a diameter of $26 \pm 3 \text{ nm}$, which is similar to native virus. In conclusion, so far, enzymatic nanoreactors with GAA activity were successfully synthesized with the possibility of being used to improve the treatment of Pompe disease.

Keywords: Acid alfa-glucosidase, Brome mosaic virus, Enzymatic nanoreactors, Enzyme replacement therapy, Pompe disease.

Dedicatoria

El presente trabajo de tesis va dedicado a Dios, quien como guía ha estado siempre presente en el caminar de mi vida, bendiciéndome y dándome fuerzas para continuar con mis metas. Todo este esfuerzo también está dedicado a mi madre querida porque ella me ayudó en las buenas y en las malas y lo sigue haciendo, además de haberme dado la vida, siempre confió en mí y nunca me abandonó.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

Agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (CNyN-UNAM), y a todo el personal académico y administrativo por su atención y apoyo en la realización de este proyecto.

Agradezco a mi asesor, el Dr. Rafael Vázquez Duhalt, por el apoyo incondicional académico y personal que me ha brindado, así como a todo el conocimiento que me ha transmitido.

Agradezco a mi comité de tesis, la Dra. Ana Bertha Castro Ceseña, la Dra. Ernestina Castro Longoria, la Dra. Ivone Giffard Mena y al Dr. Rubén Darío Cadena Nava, por sus asesorías y el tiempo que brindaron a mi persona para mejorar académicamente.

Agradezco a mis grandes amigos, el C.D. Alejandro Utrilla Cabrera, el Dr. Gustavo Sptalyn Velázquez Thomas, el M.C. Jorge Alejandro Ontiveros Robles, y el M.C. Pedro Antonio Gama López, por todo el apoyo incondicional que me han dado para la realización de este trabajo.

Agradezco de manera especial a mi madre, la Sra. María Natividad Solís Gómez, por nunca dejar de creer en mí y por siempre brindarme su amor y cariño incondicional.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas	xi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Desafíos del tratamiento de la enfermedad de Pompe	2
1.2 Nanomedicina y las cápsides virales como nanovehículos	3
1.3 Cápside del BMV	4
1.4 Nanorreactores enzimáticos	6
1.5 Antecedentes	7
1.5.1 La terapia de reemplazo enzimático (TRE) para enfermedades congénitas del metabolismo	7
1.5.2 Nanorreactores basados en virus con actividad enzimática.....	7
1.6 Justificación	9
1.7 Hipótesis.....	10
1.8 Objetivos	10
1.8.1 Objetivo general.....	10
1.8.2 Objetivos específicos.....	10
Capítulo 2. Metodología	11
2.1 Producción de la proteína de cápside (CP) del BMV	11
2.2 Diseño y síntesis de nanorreactores enzimáticos con actividad GAA basadas en cápsides del BMV	15
2.3 Caracterización de los nanorreactores enzimáticos con actividad GAA	17
Capítulo 3. Resultados	19
3.1 Obtención de la proteína de cápside (CP) del BMV	19

3.2	Diseño y síntesis de nanorreactores enzimáticos con actividad GAA basados en cápsides del BMV	21
3.3	Caracterización de los nanorreactores BMV:GAA.....	22
Capítulo 4.	Discusión	27
Capítulo 5.	Conclusiones	30
Literatura citada		31

Lista de figuras

Figura	Página
1. Patología de la enfermedad de Pompe. Los pacientes con Pompe presentan una deficiente actividad de la enzima alfa glucosidasa acida (GAA), que cataliza la degradación de glucógeno a glucosa en el lisosoma. Esta deficiencia conlleva a acumular grandes cantidades de glucógeno, lo que causa una dilatación del organelo. Figura tomada de Carretero Colomer (2007).....	1
2. Representación esquemática de la estructura de una cápside del virus BMV T=3. a) Cuadrante de la sección transversal de una cápside vacía del BMV con radio exterior de 14.2nm. b) Perspectiva del interior de la cápside del BMV, en color azul se indica la densidad de cargas electrostáticas positivas. c) Perspectiva de la superficie exterior de la cápside del BMV, en color rojo se indica una mayor distribución de cargas positivas. Figura tomada de Gama López (2019).....	5
3. Representación esquemática de un nanorreactor enzimático. La enzima (E) confinada en el interior de una cápside viral catalizara la reacción de sustrato (S) a producto (P), a través de, los poros de la cápside.	6
4. Amplificación de viriones nativos de BMV en plantas de cebada. a) Germinación de semillas de cebada. b) Siembra de semillas de cebada germinadas. c) Crecimiento de plantas de cebada a través de un sistema de riego con mangueras. d) Inoculación de hojas de cebada con virus BMV (15 días posteriores a la siembra). e) Almacenamiento de hojas de cebada con signos de clorosis a -20°C.	12
5. Extracción y purificación del BMV a partir de plantas de cebada infectadas. a) Cultivo de plantas de cebada para inoculación con BMV. b) Extracción de BMV por medio del triturado de hojas de cebada infectadas con BMV. c) Centrifugación del macerado con diclorometano y recuperación de la fase acuosa. d) Colchón de sacarosa al 10% para aislar el BMV por centrifugación. d) Purificación del BMV por centrifugación con gradiente de sacarosa (10 a 40%). e) Almacenamiento del BMV en alícuotas de 1.5 ml a una concentración de 2 mg/ml y a una temperatura de -80°C.	14
6. Mecanismo de desensamble del BMV y purificación de su proteína de cápside. La cápside del BMV se desensambla en dímeros de proteína. Las muestras son ultracentrifugadas a 50,000 rpm para aislar los dímeros del ARN.	15

7. Proceso de síntesis de las VLP's del BMV con actividad GAA, por el método de autoensamble. La proteína GAA es rodeada por los dímeros de CP-BMV que conforman la cápside cuando son dializadas en solución amortiguadora de ensamble. Transcurrida las 12 horas, las muestras son dializadas en solución amortiguadora de acidificación para el almacenamiento de las VLP's. 17
8. Cinética enzimática de la GAA. a) Degradación del sustrato p-nitrofenol α -D-glucósido (pNP-Glc) tras ser catalizada por la GAA. b) Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten para determinar los parámetros catalíticos de la GAA..... 18
9. Habilitación del invernadero para el cultivo de plantas de cebada. Para el crecimiento óptimo de la cebada, se utilizó un sistema de riego con mangueras, las cuales, estaban montadas sobre una mesa metálica con capacidad para 75 macetas. 19
10. Plantas de cebada infectadas con el BMV. Las hojas de cebada muestran los síntomas típicos de infección, determinadas por la aparición de un patrón de clorosis. El patrón de clorosis en las hojas de cebada es la aparición de líneas amarillentas a lo largo de la lámina foliar. 20
11. Purificación del BMV por gradiente de sacarosa. Después de la centrifugación, al incidir luz blanca por debajo del tubo que contiene el gradiente y la muestra de extracción, una intensa banda azul a mitad de esta se hace notar, correspondiente a la presencia de BVM. Lo anterior es debido al efecto Rayleigh reportado en en el trabajo de Dragnea et al. (2003)..... 20
12. Mapa electrostático de la enzima GAA. Se ilustra de color rojo las cargas negativas y de color azul las cargas positivas. 21
13. Distribución de tamaño hidrodinámico de la enzima GAA. La distribución de tamaños de la muestra de GAA fue homogénea y de tamaño promedio igual a 7 ± 2 nm..... 22
14. Distribución de tamaños hidrodinámicos de las VLP's BMV-GAA. No se hacen notar los picos correspondientes a la enzima y CP libre, por lo que se determina la efectividad del método de purificación..... 23
15. Electroforesis en gel desnaturante de poliacrilamida de las VLP's BMV-GAA, procesadas en el software ImageJ. Carril 1, corresponde al marcador de peso molecular (Bio-Rad 20-250KDa). Carril 2, 3 y 4, corresponden a las muestras de autoensamble 1:2, 1:10 y 1:20 (VLP-BMV: GAA), respectivamente. Carriles 6, 7 y 8 corresponden a enzima GAA, proteína de cápside del BMV y virión BMV como testigos..... 23

16. Comparativa de velocidad de reacción catalítica de la enzima GAA libre y de una VLP BMV:GAA. a) Cambios de absorbancia (400 nm) en función del tiempo para la GAA libre. b) Cambios de absorbancia en función de longitud de onda para la GAA libre. c) Cambios de absorbancia (400 nm) en función del tiempo para la VLP BMV:GAA (1:10). d) Cambios de absorbancia en función de longitud de onda para la VLP BMV:GAA (1:10). Se usó 0.45 μ M de sustrato p-nitrofenol α -D-glucósido (pNP-Glc) que, al ser catalizada por la GAA, se genera un compuesto fenólico detectable a 400 nm. 24
17. Caracterización estructural de las VLP's BMV-GAA. a) Micrografías de las VLP's BMV-GAA (1:2), de tamaño promedio 25 \pm 3 nm. b) Histograma de distribución de tamaños de las VLP's BMV-GAA (1:2). c) Micrografías de las VLP's BMV-GAA (1:10), de tamaño promedio 26 \pm 3 nm. d) Histograma de distribución de tamaños de las VLP's BMV-GAA (1:10). e) Histograma de distribución de tamaños de las VLP's BMV-GAA (1:2), de tamaño 25 \pm 3 nm. f) Micrografías de las VLP's BMV-GAA (1:20), de tamaño promedio 26 \pm 2 nm. d) Histograma de distribución de tamaños de las VLP's BMV-GAA (1:20). 26

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Investigaciones recientes sobre partículas tipo virus (VLP's) con actividad enzimática.	8
Tabla 2. Estimación densitométrica del gel de electroforesis correspondiente a las VLP's BMV:GAA producidas.	24
Tabla 3. Resultados del ensayo de cinética enzimática de las VLP's BMV:GAA en contraste con la enzima GAA libre.	25

Capítulo 1. Introducción

La enfermedad de Pompe (EP), también conocida como enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (GSD II) o deficiencia de maltasa ácida (AMD), es un trastorno congénito, de progresión lenta y mortal que se basa en la deficiencia de la enzima alfa glucosidasa ácida (GAA), la cual se encarga de catalizar la conversión de glucógeno a glucosa en los lisosomas celulares de todo el cuerpo (Kok et al., 2022; Stevens, 2022). Aquellos que padezcan EP, presentaran manifestaciones clínicas tales como: distrofias musculares, disfunciones respiratorias, disfunciones cardíacas, hepatomegalias, cardiomegalias, entre otras (Unnisa et al., 2022; van Capelle et al., 2008).

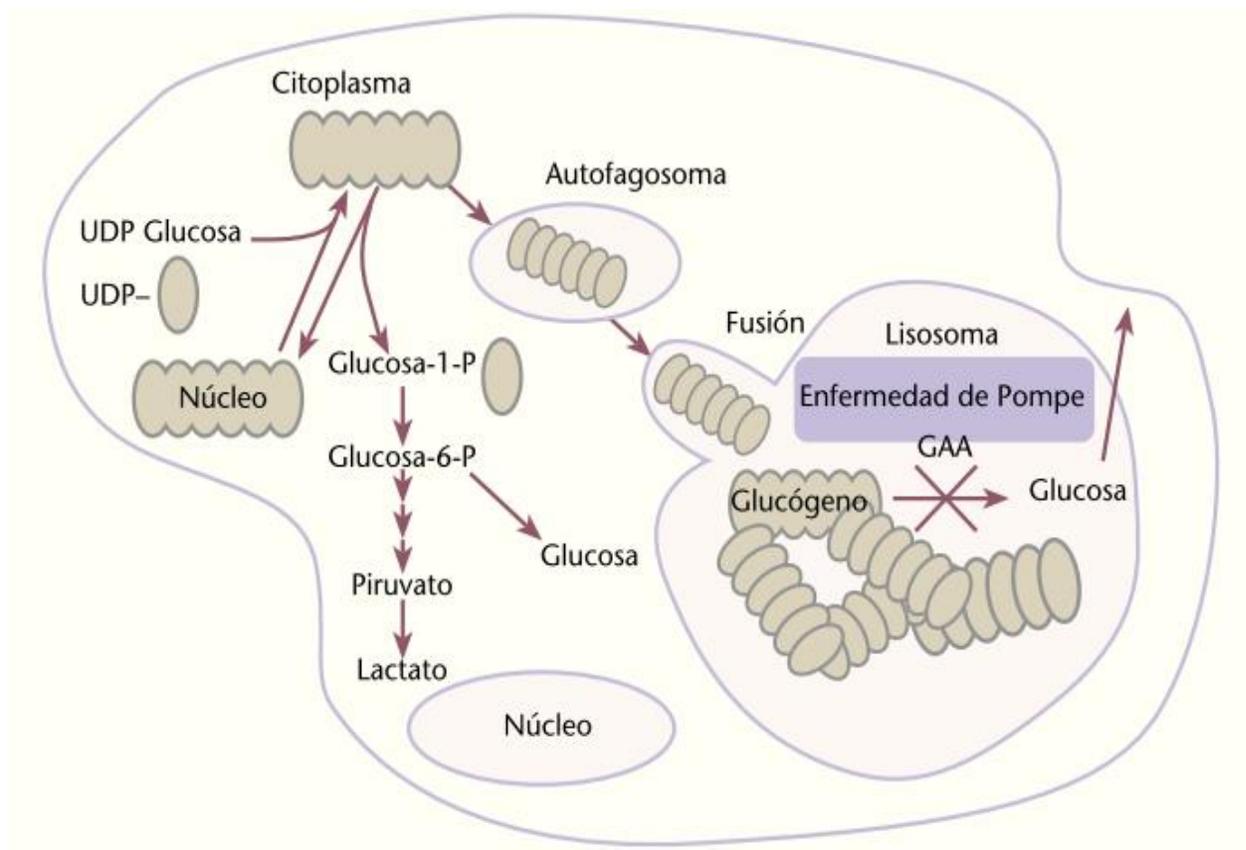


Figura 1. Patología de la enfermedad de Pompe. Los pacientes con Pompe presentan una deficiente actividad de la enzima alfa glucosidasa ácida (GAA), que cataliza la degradación de glucógeno a glucosa en el lisosoma. Esta deficiencia conlleva a acumular grandes cantidades de glucógeno, lo que causa una dilatación del organelo. Figura tomada de Carretero Colomer (2007).

El principal problema con la EP, radica en la efectividad de su tratamiento convencional, la cual es conocida como terapia de reemplazo enzimático (TRE). La TRE comprende el suministro de enzimas exógenas

terapéuticas por vía sistémica. En el caso de la EP, el tratamiento se realiza con la GAA, el cual fue aprobado por la “Food and Drug Administration” (FDA), en el año 2008 (Lim et al., 2019). Desde entonces, ha sido el principal tratamiento para combatir la EP, cuyos inconvenientes se relacionan con la activación del sistema inmune, la degradación de la enzima por proteólisis y las dificultades de la enzima para atravesar la barrera hematoencefálica del cerebro (Cagin et al., 2020; Lim et al., 2019; Puzzo et al., 2017; Ronzitti et al., 2019); dando lugar a la necesidad de buscar y desarrollar alternativas que puedan vencer estos obstáculos.

1.1 Desafíos del tratamiento de la enfermedad de Pompe

Existen problemas en relación con la efectividad del tratamiento de la EP que se ve principalmente influenciada por la síntesis de anticuerpos contra la proteína de GAA administrada y, por la ineficacia de la enzima terapéutica para el direccionamiento muscular (Desai et al., 2019; Fernández-Simón et al., 2019; Pena et al., 2019). Los pacientes que reciben TRE suelen mostrar signos y síntomas de rechazo inmunológico, principalmente en tres sistemas: el de la piel (urticaria, sarpullido, eritema, y prurito), el cardiovascular (palidez, hipertensión o hipotensión) y el respiratorio (tos, taquipnea y disminución de la saturación) (Pascual Pascual et al., 2016). Diferentes estudios han considerado determinantes los siguientes factores en la efectividad de la TRE: Inicio de intervención, tipo de fibra muscular en el que se suministra la enzima y dosificación del tratamiento (Chien et al., 2013).

Las personas con mutaciones que impiden la producción natural de GAA, muestran un estado de material inmunológico con reactividad cruzada (CRIM) negativo, por lo que al inicio de la TRE se presenta una respuesta inmunológica que bloquea casi totalmente el efecto de la enzima suministrada. En cambio, la mitad de los pacientes con IOPD y todos aquellos con LOPD tienden a presentar CRIM positivo, es decir, la producción de proteína mutante endógena les permite tolerar mejor la forma sintética de la enzima terapéutica.

El uso de inmunomoduladores, la prolongación del tiempo de ejecución del tratamiento y la dosificación focalizada han sido las estrategias tradicionales para hacer frente a los obstáculos presentes en la TRE (Bond et al., 2019; Lim et al., 2019), no obstante, esto conlleva a aumentar los costos económicos y duración de la terapia, así como también, seguir comprometiendo la seguridad de los pacientes (Kohler et al., 2018).

1.2 Nanomedicina y las cápsides virales como nanovehículos

La nanociencia, ha hecho posible el diseño y creación de sistemas que han permitido aprovechar las propiedades de los materiales en la nanoescala (Bayda et al., 2020; Li et al., 2022). Los dendrímeros, micelas, liposomas, nanotubos de carbono y las partículas tipo virus (VLP's), son un claro ejemplo de los materiales que han sido estudiados para el desarrollo de la nanomedicina, como es el caso de la elaboración de nanovehículos para la administración de fármacos (Alemzadeh et al., 2018). Las VLP's han sido diseñadas para mimetizar la estructura de un virus, pero sin material genético infeccioso (Lee et al., 2016); hecho que ha permitido su uso en aplicaciones biomédicas, tales como, el desarrollo de vacunas (Ludwig y Wagner, 2007; Villagrana-Escareño et al., 2019), y terapias génicas, principalmente (Ronzitti et al., 2019; Teunissen et al., 2013).

Las VLP's derivan de un virus y en la mayoría de los casos su estructura y morfología son idénticas al virus nativo (Kawano et al., 2018). La mayoría de los virus consisten comúnmente en cientos de subunidades conformadas por un tipo de proteína que pueden ser capaces de autoensamblarse para formar una cápside que protege a su material genético, ya sea, ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). La función natural de los virus es infectar células vivas para replicarse dentro de las células huésped. La mayoría de las proteínas que constituyen los virus tienen una capacidad altamente conservada para autoensamblarse, de tal manera que es posible sintetizar VLP's (Lee et al., 2016). Las formas y tamaños de las cápsides virales suelen ser muy regulares y estables (Mateu, 2013), por lo cual, las VLP's se han propuesto para un sin número de aplicaciones en bionanotecnología (Balkrishna et al., 2021; González-Davis et al., 2019; Schwarz et al., 2017; Smith et al., 2013).

Existen muchos virus utilizados para la producción de VLP's, particularmente aquellas con estructuras más simples; por ejemplo, el virus de la hepatitis B recombinante (VHB), expresado por *Escherichia coli*, el virus del moteado clorótico del caupí (CCMV), y las cápsides del poliomavirus; las cuales, se han estudiado y manipulado ampliamente (Glasgow y Tullman-Ercek, 2014). La infección de organismos huésped o células huésped cultivadas ha sido una forma efectiva de producir grandes cantidades de viriones en su forma nativa a los que se le remueve el contenido genético, para posteriormente, la proteína de cápside se reensamble formando VLP'S. Esta técnica se ha aplicado con éxito a gran escala para varios tipos de virus, como el virus del mosaico del tabaco (TMV), y el virus del mosaico del caupí (CPMV) (Alonso et al., 2013). Otras cápsides, como los bacteriófagos MS2 y Q β , requieren condiciones más duras para desmontar sus estructuras altamente estables de forma reversible (Hung et al., 1969). Algunos virus, como el virus del moteado necrótico del trébol rojo (RCNMV), y el bacteriófago P22, también pueden sufrir transiciones

estructurales, afectando la porosidad de la cápside cuando se tratan con quelantes metálicos o altas temperaturas, respectivamente (Sherman et al., 2006). Muchas cápsides, incluidas HBV, CCMV, TMV y el virus del mosaico del bromo (BMV), se ensamblan y desensamblan en función del pH y la fuerza iónica (Katen y Zlotnick, 2009; Teunissen et al., 2013).

Recientemente, el uso de VLP's con alta capacidad de carga y biocompatibilidad han alcanzado etapas clínicas. Las VLP's de virus de plantas han recibido menos atención, ya que para la mayoría de los desarrollos de vectores virales se utilizan virus de mamíferos. Sin embargo, debido a su fácil producción, manejo y estructura simple, los virus de plantas y de bacterias son atractivos para algunas aplicaciones biomédicas (Alemzadeh et al., 2018; Eiben et al., 2019; Hema et al., 2019). Los bromovirus de plantas, como el BMV, son nanopartículas virales que se han propuesto como nanovehículos para la administración de fármacos en diferentes terapias y como agentes de diagnóstico por imágenes en el cáncer (Núñez-Rivera et al., 2020). Este tipo de VLP también ofrece la oportunidad de distintas modificaciones en el interior, exterior, y la interfaz de su estructura mediante enfoques genéticos y químicos que forman nano portadores para la administración de fármacos (Alemzadeh et al., 2018; Nuñez-Rivera et al., 2020; Villagrana-Escareño et al., 2019). Además, la proteína de cápside del BMV es capaz de encapsular moléculas aniónicas, como ARN heterólogos (Azizgolshani et al., 2013), enzimas (Sánchez Sánchez et al., 2014), fármacos (Barwal et al., 2016) o nanopartículas de oro (Sun et al., 2007) por complementariedad de carga con la posibilidad de dirigirlas a células diana a través de la funcionalización de la superficie externa de la cápside (Gillitzer et al., 2002; Nuñez-Rivera et al., 2020). De manera similar, las VLP's del CCMV, estrechamente relacionado, se han cargado con diferentes cargas, incluidas nanopartículas de oro, cromóforos con carga negativa y polímeros (Cadena-Nava et al., 2019).

1.3 Cápside del BMV

El BMV es un virus que infecta naturalmente a gramíneas. El BMV está conformado por una cápside constituida por 180 proteínas, de masa molecular 20,835 Da. El N-terminal de cada una de estas proteínas tiene una carga positiva que queda expuesto hacia el interior, de manera que la unión entre el virus y su material genético se favorece electrostáticamente (Lucas et al., 2002). También, la cápside del BMV tiene la capacidad de ser sometida a transiciones estructurales para encapsular moléculas pequeñas de manera controlada y reversible (Cadena-Nava et al., 2019). A pH 7.5 o mayor y con una fuerza iónica igual o mayor a 0.5 M, la cápside se disocia en dímeros. Después de reestablecer un pH y fuerza iónica bajos se puede

llevar a cabo su reensamble. Inclusive, este método se ha utilizado para encapsular moléculas aniónicas (Sánchez Sánchez et al., 2014).

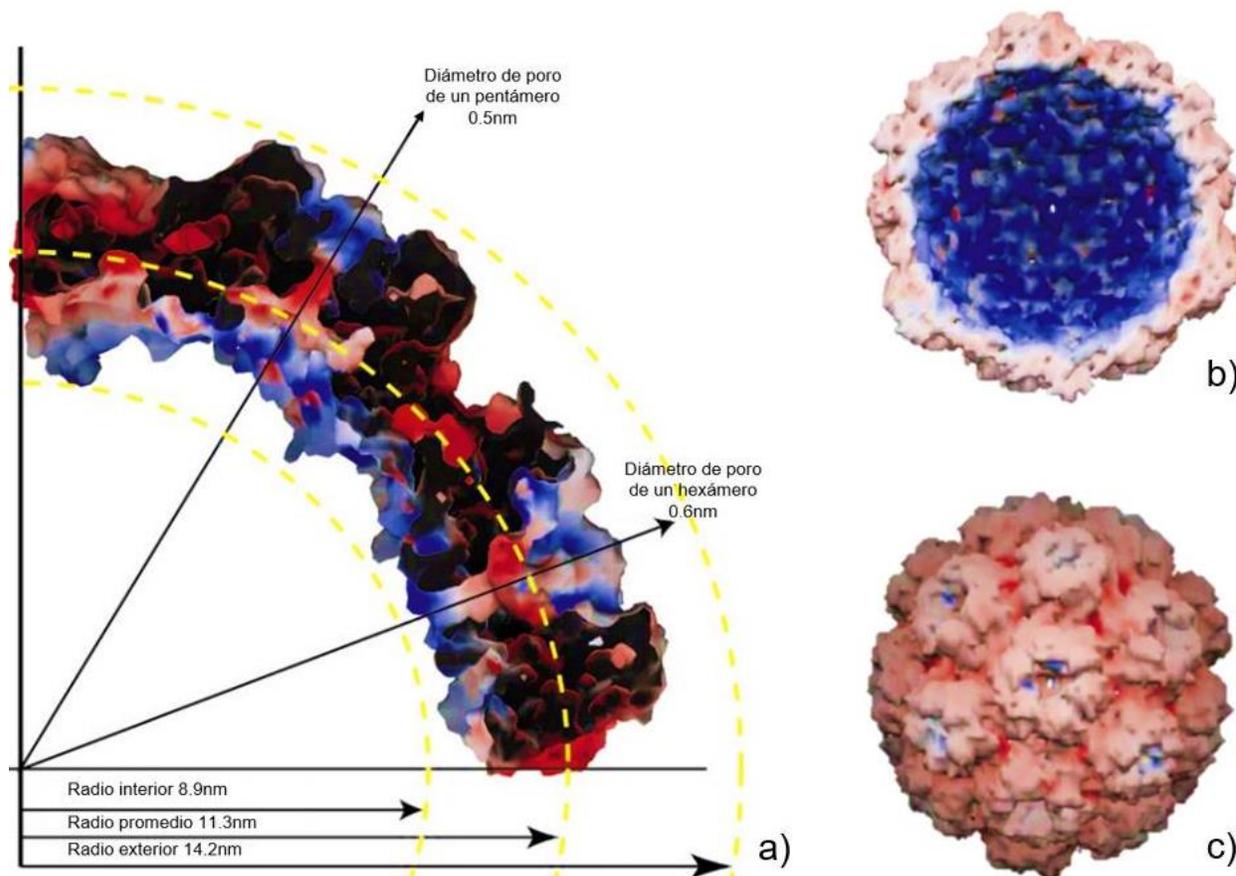


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de una cápside del virus BMV T=3. a) Cuadrante de la sección transversal de una cápside vacía del BMV con radio exterior de 14.2nm. b) Perspectiva del interior de la cápside del BMV, en color azul se indica la densidad de cargas electrostáticas positivas. c) Perspectiva de la superficie exterior de la cápside del BMV, en color rojo se indica una mayor distribución de cargas positivas. Figura tomada de Gama López (2019).

Durante los últimos años, se ha estudiado la toxicidad del virus BMV, cuyos resultados fueron negativos, en los que incluso a altas concentraciones de virus no se encontró un efecto citotóxico en las células (Bongsu et al., 2011; Núñez-Rivera et al., 2020). También, se evaluó la respuesta inmune *in vitro* del BMV y se comparó con la inducida por el CCMV, en el que sorprendentemente se encontró una diferencia notable. El CCMV arroja una alta activación de macrófagos en contraste con el BMV, con una respuesta inmune casi nula. Este alto grado de biocompatibilidad y baja inmunogenicidad hacen que las cápsides del BMV sean candidatas adecuadas como portadores para administrar fármacos terapéuticos o moléculas de RNA de interferencia (siRNA). Por otro lado, no se ha encontrado indicios de que las partículas virales puedan cruzar la barrera hematoencefálica por sí solas, no obstante, el trasplante de células

hematopoyéticas (TPH) en combinación con la TRE y el uso de moléculas que aumenten la permeabilidad de la barrera hematoencefálica pueden mejorar los resultados clínicos para este caso (Macauley, 2016; Poswar et al., 2019).

1.4 Nanorreactores enzimáticos

Las VLP's pueden ser aprovechadas para la producción de nanorreactores enzimáticos mediante el confinamiento de enzimas activas (Comellas-Aragonès et al., 2007). En este tipo de nanorreactores se han reportado propiedades catalíticas diferentes a las que tienen las enzimas en su forma libre (Zhu et al., 2019), destacando que pueden albergarse los sitios catalíticos activos y controlar el acceso de reactivos y productos, dando lugar a reacciones catalíticas mucho más estables (Sánchez-Sánchez et al., 2014). Además, se ha reportado que el confinamiento de enzimas en cápsides virales puede ayudar a protegerlas ante la proteólisis.

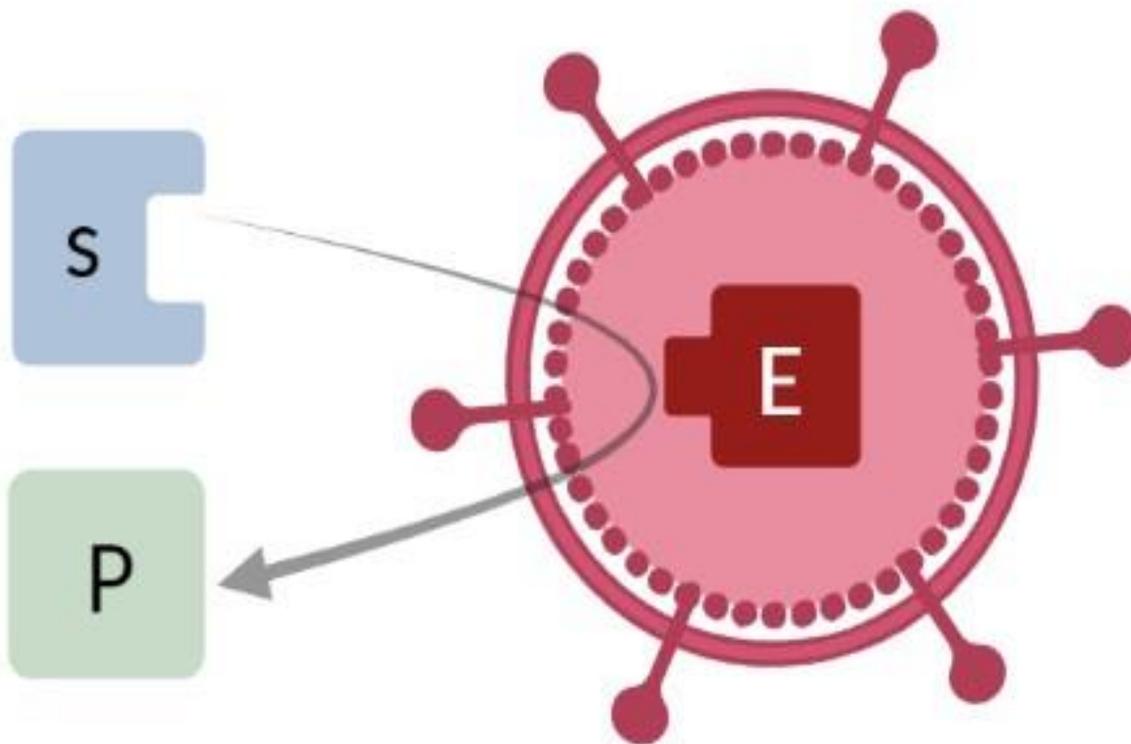


Figura 3. Representación esquemática de un nanorreactor enzimático. La enzima (E) confinada en el interior de una cápside viral catalizará la reacción de sustrato (S) a producto (P), a través de los poros de la cápside.

1.5 Antecedentes

1.5.1 La terapia de reemplazo enzimático (TRE) para enfermedades congénitas del metabolismo

La nanotecnología ha impactado significativamente en el desarrollo de la medicina para lo cual implica el uso de nanomateriales como lo son las nanopartículas y nanodispositivos con fines de diagnóstico, administración, detección o actuación en un organismo vivo. Un importante esfuerzo de investigación se centra actualmente en el uso de nanopartículas (NP), para la administración de fármacos, cuyo objetivo principal es el diseño de nanoportadores que contengan fármacos específicos y puedan dirigirse a tejidos diana, reduciendo de esta manera la dosis del fármaco y, por ende, el aumento de la eficacia del tratamiento. Las NP también pueden usarse como acarreadores de actividad enzimática, especialmente para tratamiento de los trastornos originados por deficiencias de la actividad enzimática y utilizando enzimas exógenas terapéuticas (González-Davis et al., 2019).

Existen muchas enfermedades originadas por la falta de una o más actividades enzimáticas, por lo que, la administración de enzimas exógenas ha sido utilizada con éxito como terapia de reemplazo enzimático (TRE) en trastornos como: La deficiencia de adenosina desaminasa (ADA) (Blackburn y Kellems, 2005), la enfermedad de Gaucher (Tekoah et al., 2013), la hipofosfatasa (Kitaoka et al., 2017), la encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (de Vocht et al., 2009), entre otras. Para el caso de la enfermedad de Pompe, la TRE ha sido la única terapia farmacológica establecida que se enfoca en esta deficiencia enzimática (Stevens, 2022), sin embargo, un factor importante que puede limitar la biodisponibilidad de la enzima terapéutica es el desarrollo de anticuerpos neutralizantes anti-GAA que se produce después del inicio de la TRE (Tarnopolsky et al., 2016). Por lo cual, el éxito de la TRE se basará principalmente en la bioquímica enzimática, las concentraciones locales de enzimas y, la capacidad de las células tratadas para cambiar y ser reemplazadas por células normales. Todos estos factores podrían modularse y mejorarse mediante el uso de NP conteniendo actividad enzimática (González-Davis et al., 2019)

1.5.2 Nanorreactores basados en virus con actividad enzimática

Diversas enzimas han sido confinadas en VLP's (**Tabla 1**), entre las cuales, se encuentran la glucosa oxidasa (Chauhan et al., 2020), β -glucosidasa, galactoquinasa, glucoquinasa (Patterson et al., 2014), peroxigenasa

(Gad y Ayakar, 2021), citocromo P450 (Sánchez Sánchez et al., 2014), entre otras. En todos estos casos se tienen nanorreactores capaces de transformar a sus respectivos sustratos. Los niveles de confinamiento van desde una molécula de enzima hasta más de cien enzimas por cápside. La concentración de enzima puede ser muy alta: de 0.1 a 5.7 mM, lo que representa condiciones especiales de catálisis que deben ser tomadas en cuenta, como lo son: una cinética que no sigue la ecuación de Michaelis-Menten, que no todos los sitios activos de la enzima están accesibles al sustrato y, que se pierde movilidad de la molécula de enzima reduciendo su actividad catalítica (Chauhan et al., 2021).

Tabla 1. Investigaciones recientes sobre partículas tipo virus (VLP's) con actividad enzimática.

Trabajo	Cápside	Referencia
Nanorreactores basados en virus con actividad GALT para la terapia clásica de galactosemia.	BMV	Gama et al. (2021).
Nanorreactores de VLP enzimáticos dirigidos con actividad de β -glucocerebrosidasa como posible terapia de reemplazo enzimático para la enfermedad de Gaucher.		Chauhan et al. (2022).
Activación de profármacos de quimioterapia mediante nanopartículas biocatalíticas similares a virus que contienen citocromo P450.	CCMV	Sánchez-Sánchez et al. (2014).
El virus del moteado clorótico del caupí estabilizado como plataforma para la terapia dirigida de reemplazo de enzimas.		Oudmaijer (2021).
Diseño de un nanovehículo-VLP para el suministro de actividad enzimática CYP450.	P22	Sánchez Sánchez et al. (2015).
Nanorreactor P22 biocatalítico multifuncional para el tratamiento combinado del cáncer de mama ER+.		Chauhan et al. (2018).
Encapsulación de enzimas activas dentro de partículas similares al virus del bacteriófago P22.		Patterson (2018).

En el trabajo reportado por Gama et al. (2021), se obtuvieron nanorreactores enzimáticos por encapsulación de la galactosa-1-fosfato uridil-transferasa (GALT), en cápsides del BMV mediante la estrategia de autoensamble de las proteínas de cápside. Los resultados mostraron afinidad del sustrato hacia los nanorreactores con una ligera reducción comparada con la obtenida por la enzima libre. A pesar de no utilizar ningún tipo de funcionalización, los nanorreactores se internalizaron con éxito en diferentes

líneas celulares, tales como fibroblastos y hepatocitos; por lo que demostraron ser una preparación enzimática innovadora con uso potencial para el tratamiento de la galactosemia clásica.

Otro estudio publicado por Oudmaijer, se basó en mejorar la efectividad de la TRE para hacer frente a enfermedades de almacenamiento lisosomal, tales como la enfermedad de Gaucher y Fabry por medio del encapsulamiento de las enzimas glucocerebrosidasa (GBA) y α -galactosidasa A (GLA), en nanopartículas basadas en cápsides del CCMV. Las enzimas encapsuladas demostraron ser catalíticamente activas y a fines hacia su sustrato fluorogénico. Además, la funcionalización dual de la superficie del CCMV con polietilenglicol (PEG) y el ligando de direccionamiento, dieron como resultado una especificidad segura hacia la célula enferma, reduciendo así la dosis necesaria para lograr una concentración eficaz del agente terapéutico. Mediante la variación del ligando, la partícula pudo dirigirse a diferentes células enfermas, lo que hace que este sistema de administración sea altamente sintonizable. Por lo tanto, esta investigación ha ilustrado los primeros pasos en la terapia de reemplazo de enzimas dirigida que se puede ajustar a cualquier otra enfermedad de deficiencia enzimática lisosomal (Oudmaijer, 2021). Recientemente, la enzima glucocerebrosidasa fue encapsulada en cápsides de BMV y funcionalizadas con manosa para ser dirigidas a macrófagos pensando en la TRE para la enfermedad de Gaucher (Chauhan et al. 2022). Los resultados de estos trabajos han sido esperanzadores para posibles mejoras en la TRE.

1.6 Justificación

El tratamiento por reemplazo enzimático de la enfermedad de Pompe presenta baja efectividad debido principalmente por la activación del sistema inmune, la proteólisis, la ineficacia del direccionamiento muscular, y la incapacidad de la enzima terapéutica de atravesar la barrera hematoencefálica (Piras et al., 2020). Resulta imperante la necesidad de encontrar nuevas alternativas que puedan mejorar la efectividad y seguridad del tratamiento convencional. Dado que, las VLP's basados en el BMV han demostrado tener características convenientes para su uso en aplicaciones médicas (Núñez-Rivera et al., 2020; Tejeda-Rodríguez et al., 2019), y la encapsulación de enzimas (Chauhan et al., 2022; Gama et al., 2021); es pertinente el diseño de nanorreactores con actividad GAA usando las cápsides virales del BMV. Este sistema podrá otorgar estabilidad, direccionar el tratamiento y superar las barreras biológicas y otras deficiencias del tratamiento convencional. La producción de VLP's basadas en las cápsides del BMV que contengan en su interior a la enzima GAA y que funcionen como nanoreactor enzimático con todas las propiedades catalíticas de la enzima GAA, podría ser parteaguas para el posible desarrollo de una solución alterna que ayude a mejorar la TRE convencional para la EP.

1.7 Hipótesis

El confinamiento de la enzima GAA en el interior de la cápside del BMV por el método de autoensamble, produce nanorreactores enzimáticos con el potencial para mejorar la terapia de reemplazo enzimático de la enfermedad de Pompe.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo general

Diseñar y sintetizar nanorreactores enzimáticos basados en el confinamiento de la enzima GAA en cápsides del BMV por el método de autoensamble.

1.8.2 Objetivos específicos

- 1) Obtener proteína de cápside (CP) del BMV a partir del desensamble de los viriones nativos.
- 2) Diseñar un protocolo de confinamiento para la enzima GAA en cápsides del BMV, en una relación GAA: CP óptima, mediante el método de autoensamble para producir nanorreactores enzimáticos con actividad GAA.
- 3) Caracterizar la estructura de los nanorreactores producidos por microscopía electrónica de transmisión (TEM), y por dispersión dinámica de luz (DLS).
- 4) Caracterizar la actividad catalítica de los nanorreactores enzimáticos producidos y, compararla con la actividad de la enzima libre.

Capítulo 2. Metodología

Este trabajo fue desarrollado mediante el diseño y síntesis de nanorreactores enzimáticos con actividad GAA, basadas en cápsides del BMV. La infección de plantas de *Hordeum vulgare* (cebada, por su nombre común), con el virus nativo BMV fue llevada a cabo para la producción de la proteína de cápside. La enzima GAA fue adquirida en Sigma-Aldrich bajo el número de referencia de producto: G0660-750UN y, almacenada a -20 °C en su presentación original para mantener su viabilidad. Para su manipulación, la enzima GAA fue preparada siguiendo el protocolo descrito por Ali et al. (2020). La cuantificación de proteína, tanto de la enzima libre como de las preparaciones de nanorreactores, fue realizada mediante la técnica Bradford. Finalmente, los nanorreactores sintetizados fueron llevados a estrictos procesos de caracterización.

2.1 Producción de la proteína de cápside (CP) del BMV

De manera natural, el BMV tiene la capacidad de infectar gramíneas (Díaz-Cruz et al., 2017), por lo que, se utilizó el protocolo descrito por Ramírez Acosta (2020), para crecer, infectar y cosechar plantas de cebada con el virus BMV (**Figura 4**), mismas que, servirían para producir proteína de cápside a partir del desensamble de los viriones. Para ello, se habilitó el invernadero perteneciente al departamento de bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (CNYN-UNAM), donde se utilizaron macetas de plástico que fueron rellenas de tierra enriquecida con fertilizantes.

Previamente, se germinaron $\frac{1}{4}$ de taza de semillas de cebada en un frasco de vidrio de 500 ml tapado con gasa. Las semillas contenidas en el frasco fueron lavadas y remojadas de 8 a 15 hrs con dos tazas de agua. El líquido se drenó y las semillas fueron enjuagadas para dejarlas secar. Este proceso se realizó dos veces al día y, se finalizó hasta que las semillas fueron germinadas. Después, se sembraron 10 semillas de cebada germinadas en cada maceta, las cuales fueron regadas diariamente. Posterior a las dos semanas de siembra, las hojas de cebada fueron sutilmente erosionadas con ayuda de una fibra metálica de pelo de ángel en la que se aplicó 10 μ l de solución de BMV nativo que se encontraba suspendida en un buffer de inoculación de fosfato de potasio 500 mM a pH 4.5, a una concentración de 0.2 mg/ml. Se dejó incubar al virus en la cebada hasta que sus hojas mostraron los síntomas típicos de infección, determinadas por la aparición de un patrón de clorosis. El patrón de clorosis en las hojas de cebada es la aparición de líneas

amarillentas a lo largo de la lámina foliar (Gama et al., 2021). Cuando la clorosis fue suficientemente evidente, las hojas de cebada fueron cosechadas y almacenadas a -20°C hasta su utilización para la extracción de virus.

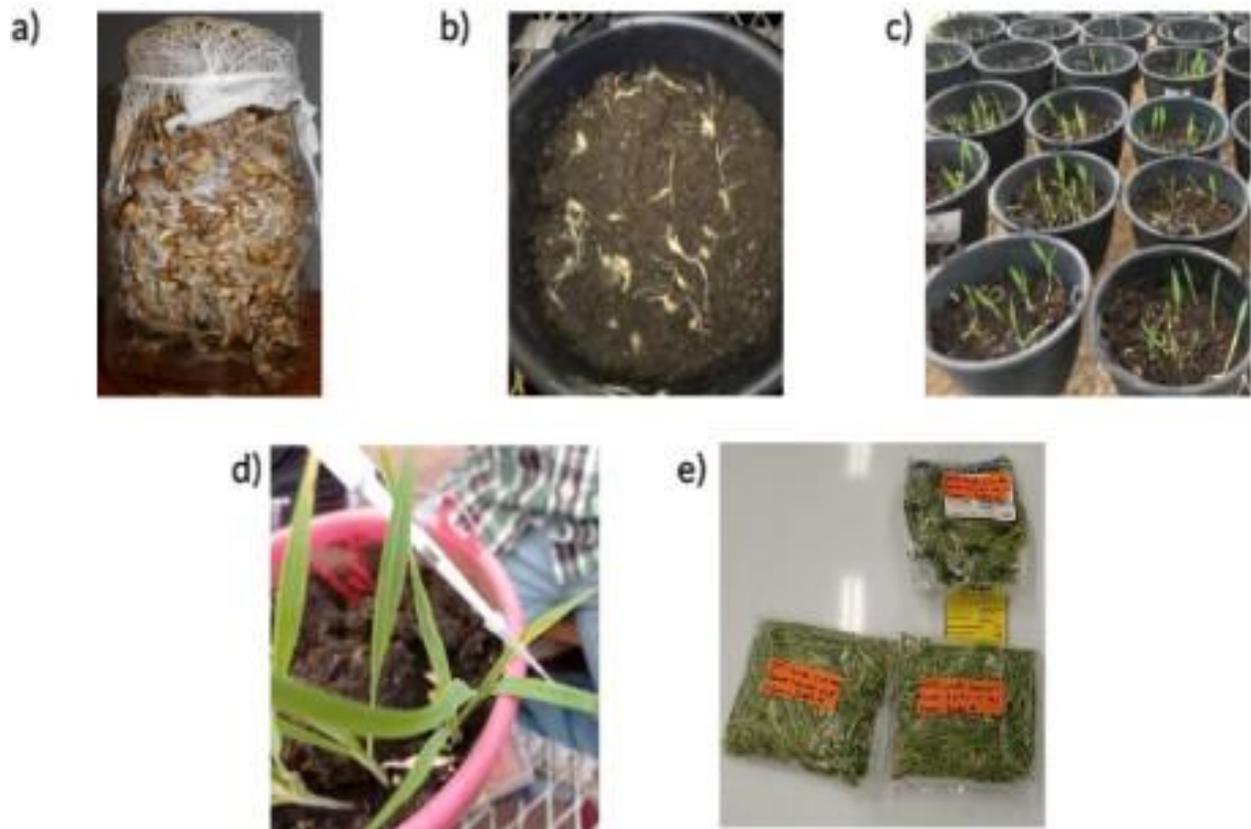


Figura 4. Amplificación de viriones nativos de BMV en plantas de cebada. a) Germinación de semillas de cebada. b) Siembra de semillas de cebada germinadas. c) Crecimiento de plantas de cebada a través de un sistema de riego con mangueras. d) Inoculación de hojas de cebada con virus BMV (15 días posteriores a la siembra). e) Almacenamiento de hojas de cebada con signos de clorosis a -20°C .

Posteriormente, se realizó la extracción y purificación del virus amplificado en las plantas de cebada inoculadas (**Figura 5**), siguiendo el método descrito por Cadena-Nava et al. (2019). Las hojas de cebada infectadas que fueron almacenadas a -80°C se llevaron a descongelamiento hasta alcanzar la temperatura ambiente. Enseguida, se trituraron 100 gr de estas hojas en una licuadora que contenía solución amortiguadora de extracción de virus (acetato de sodio 0.5 M, acetato de magnesio 80 mM, pH 4.5 ajustado con ácido acético), suficiente para lograr un macerado consistente. El macerado fue filtrado con una gasa ejerciendo presión para obtener un buen rendimiento de extracto. El filtrado fue mezclado 1:1 %Vol. con diclorometano, la cual, fue centrifugada a 15,000 rpm por 15 min a 4°C dando lugar a la separación de la mezcla en dos fases. La fase superior de color amarillo claro fue recuperada y la fase inferior de color café oscuro fue descartada. La fase recuperada fue centrifugada nuevamente bajo las

condiciones arriba mencionadas, cuyo sobrenadante fue colocado en agitación por 12 horas a 4°C para eliminar los residuos de diclorometano. A partir de este extracto se realizó el aislamiento y purificación del BMV.

Las partículas virales fueron aisladas del extracto final por centrifugación, utilizando un colchón de sacarosa. Previamente, se prepararon tubos de ultracentrífuga que contenían en el fondo una solución de sacarosa al 10% (m: v), correspondientes al 13% de la capacidad máxima de los tubos. Sobre la solución de sacarosa, se vertió el extracto final hasta aforar los tubos de centrifuga al volumen máximo. Los tubos fueron centrifugados a 32,000 rpm por dos horas a 4°C, cuyo pellet fue recuperado descartando el sobrenadante. Los pellets fueron resuspendidos en 150 µl de solución amortiguadora de suspensión de virus (acetato de sodio 50 mM, acetato de magnesio 8 mM, ajustado a pH 4.5 con ácido acético). Esta suspensión fue almacenada a 4°C hasta su utilización para la purificación de virus.

Los viriones fueron purificados por centrifugación utilizando un gradiente de densidad de sacarosa. Previamente, se prepararon tubos de centrifuga con un gradiente de densidad de sacarosa. Los tubos fueron preparados con 25 ml de una solución de sacarosa al 25% (m: v). Los tubos se colocaron a -80°C por una hora, para después, descongelarse a temperatura ambiente. Este proceso se ejecutó dos veces de manera consecutiva para finalmente almacenar los tubos a 4°C. Enseguida, la suspensión de virus fue colocada cuidadosamente sobre los tubos con gradientes de sacarosa, los cuales fueron centrifugados a 32,000 rpm por dos horas a 4°C.

Finalizada la centrifugación, los tubos fueron sujetos de un soporte universal y, observados en un cuarto oscuro, iluminando la base de estos con una linterna de luz blanca. Tras la iluminación de los tubos, se hizo notar la presencia de una banda azul a mitad de su columna, la cual fue recuperada utilizando una pipeta Pasteur de vidrio. La fase recuperada fue mezclada con solución amortiguadora de suspensión de virus para diluir la concentración de sacarosa y, por el método de centrifugación, eliminar el exceso de ésta. La mezcla con virus fue centrifugada a 34,000 rpm por 3 horas a 4°C.

Tras la centrifugación, se formó un pellet que fue recuperado descartando el sobrenadante. Cada pellet fue resuspendido con 200 µl de solución de suspensión de virus para mezclar todas estas en una muestra final de concentración igual a 2 mg/ml. Finalmente, la muestra de virus se almacena a -80 °C hasta su utilización.



Figura 5. Extracción y purificación del BMV a partir de plantas de cebada infectadas. a) Cultivo de plantas de cebada para inoculación con BMV. b) Extracción de BMV por medio del triturado de hojas de cebada infectadas con BMV. c) Centrifugación del macerado con diclorometano y recuperación de la fase acuosa. d) Colchón de sacarosa al 10% para aislar el BMV por centrifugación. e) Purificación del BMV por centrifugación con gradiente de sacarosa (10 a 40%). e) Almacenamiento del BMV en alícuotas de 1.5 ml a una concentración de 2 mg/ml y a una temperatura de -80°C.

Haciendo uso de un espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000c de Thermo Fisher Scientific, se procedió a medir la concentración de BMV en la muestra final determinada por la absorbancia a 260 nm y considerando su coeficiente de extinción molar, mientras que, la pureza del virus estuvo mediada por la relación de absorbancia 280/260 nm ≥ 1.5 . El rendimiento de extracción se calculó de acuerdo con la masa total de viriones obtenida sobre la masa total de hojas de cebada utilizadas en la extracción.

Finalmente, la proteína de cápside del BMV fue extraída y purificada a partir del desensamble de los viriones, siguiendo el protocolo descrito por Gama et al. (2021) (**Figura 6**). Se colocó una muestra de 8 mg de virus BMV dentro de una membrana de diálisis de 14 kDa ante una solución amortiguadora de desensamble (cloruro de calcio 0.5 M, ácido etilendiaminotetraacético 1 mM, dithiothreitol 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0.5 mM, tris 50 mM a pH 7.5), por 24 horas en agitación y a 4°C. Después de la diálisis, la muestra fue ultracentrifugada a 50,000 rpm durante 8:30 horas a 4°C. El sobrenadante fue recuperado tomando alícuotas de 500 μ l desde la parte superior hasta la parte inferior del tubo de ultracentrífuga teniendo cuidado de no resuspender el pellet.

La concentración de proteína de cápside del BMV fue calculada por medio de la lectura de absorbancia a 280 nm y considerando su coeficiente de extinción molar, mientras que la pureza fue calculada como la razón de absorbancia 280/260 nm. La pureza se consideró como óptima para cuando dicha razón era mayor o igual a 1.5, mientras que, el rendimiento de la purificación de la proteína de cápside se estimó como la relación de masa total de CP obtenida entre la masa total de BMV desensamblado. La solución final de proteína de cápside fue esterilizada por filtración con membrana de acetato de celulosa de 0.22 μm y almacenada a 4°C hasta su utilización. La proteína de cápside utilizada para la síntesis de nanorreactores no excedió más de dos semanas de almacenamiento a partir de su purificación.

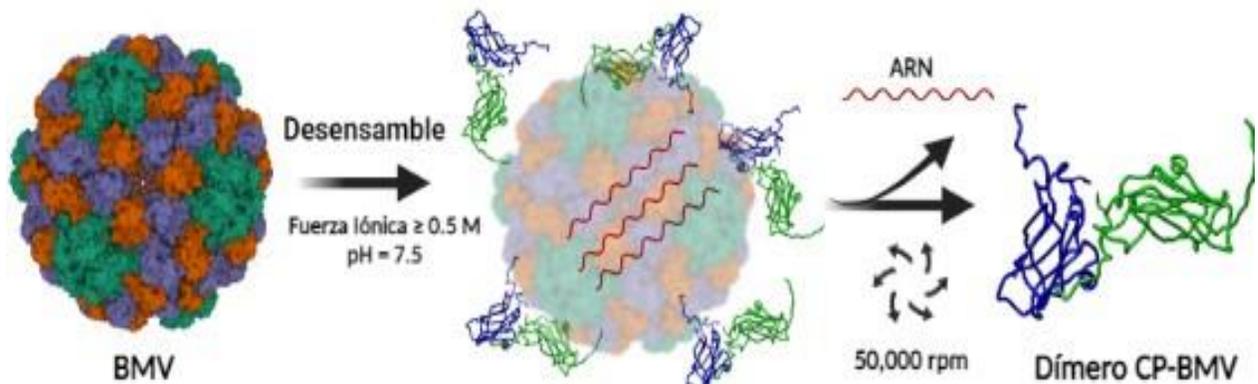


Figura 6. Mecanismo de desensamblaje del BMV y purificación de su proteína de cápside. La cápside del BMV se desensambla en dímeros de proteína. Las muestras son ultracentrifugadas a 50,000 rpm para aislar los dímeros del ARN.

2.2 Diseño y síntesis de nanorreactores enzimáticos con actividad GAA basadas en cápsides del BMV

La complementariedad de cargas electroestáticas, entre la proteína de cápside del BMV y la superficie de las moléculas cargo, es el principal mecanismo para el encapsulamiento de moléculas de interés mediante el proceso de autoensamble (Chauhan et al., 2022). Por lo tanto, las propiedades electrostáticas de la enzima GAA y la proteína de cápside del BMV fueron estudiadas usando el software Maestro de Schrödinger® (versión 2019-1). Se usaron las coordenadas de la estructura cristalográfica de la GAA humana (PDB 5KZW), y de la proteína de cápside del BMV (PDB 1JS9), obtenidas del repositorio central de datos sobre proteína (Uniprot). El modelo de Poisson-Boltzmann fue utilizado para modelar la distribución superficial de carga eléctrica de la enzima GAA y la proteína de cápside del BMV con la finalidad de determinar las interacciones electroestáticas GAA-CP para la formación de VLP's.

Para considerar geoméricamente la posibilidad de contener la enzima GAA dentro de la cápside del BMV, fue necesario medir el diámetro hidrodinámico de la enzima GAA mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS), utilizando un equipo ZetaSizer Nano SZ de Malvern. La enzima comercial GAA fue disuelta en buffer de fosfato de potasio 60 mM a pH 6.8, cuya preparación siguió la ecuación Henderson-Hasselbach reportada por Stoll y Blanchard (1990). La cantidad total de proteína de enzima GAA fue medida por medio de la técnica de Bradford. Se estimó la capacidad de carga de las VLP's BMV:GAA, considerando de manera ideal una esfera de radio igual a ½ del diámetro hidrodinámico medido. Se calculó el volumen que ocuparía la GAA y el volumen disponible en 75% del interior de las cápsides del BMV con un diámetro interno de 21 nm (Lucas et al., 2002). La ecuación (1) fue la relación utilizada para estimar la capacidad de carga del interior hueco del BMV para la enzima GAA.

$$N_{\frac{GAA}{BMV}} = \frac{3}{4} \left(\frac{r_{BMV}}{r_{GAA}} \right)^3 \quad (1)$$

Donde N es el número de moléculas de enzima por cápside del BMV, r_{GAA} es el radio hidrodinámico de la enzima y r_{BMV} es el radio interior de la cápside del BMV.

La estimación de la capacidad de carga de las VLP's, en función del volumen, ayudo a determinar tres distintas relaciones molares de la VLP-BMV y la enzima GAA para llevar a cabo reacciones de autoensamble. Para las reacciones de autoensamble, las muestras de GAA y CP-BMV fueron llevadas a diálisis en solución amortiguadora de ensamble (NaCl 0.05 M; Tris 0.05 M; KCl 0.01 M y MgCl₂ 0.005 M, a pH 7.2 ajustado con ácido clorhídrico), por 12 h a -4°C. Transcurrido ese tiempo, las muestras fueron dializadas en solución amortiguadora de acidificación (acetato de sodio 0.05 M, acetato de magnesio 0.008 M a pH 4.7, ajustado con ácido acético). Al finalizar el proceso de diálisis, la formación de VLP's fue monitoreada por DLS, identificando la aparición de diámetros hidrodinámicos similares a la del BMV nativo. Una vez corroborada la formación de VLP's, las muestras fueron purificadas mediante centrifugación a 40,000 rpm por 2 hrs a 4°C. Después del proceso de centrifugación, el sobrenadante fue descartado y el precipitado fue resuspendido en solución amortiguadora de acidificación para nuevamente

estimar el diámetro hidrodinámico de las partículas y así, corroborar el éxito de purificación de los nanorreactores. En la **figura 7** se ilustra el proceso de síntesis de VLP's BMV:GAA.

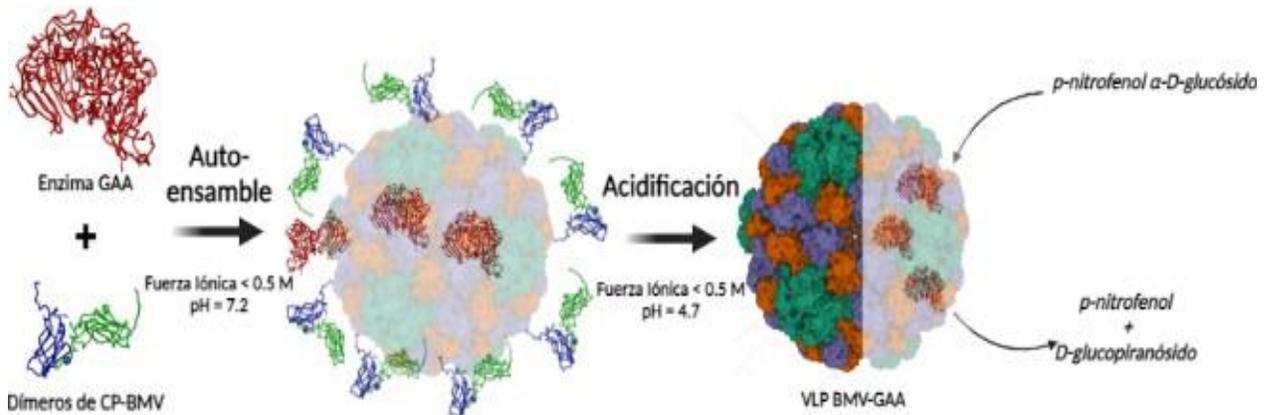


Figura 7. Proceso de síntesis de las VLP's del BMV con actividad GAA, por el método de autoensamble. La proteína GAA es rodeada por los dímeros de CP-BMV que conforman la cápsida cuando son dializadas en solución amortiguadora de ensamble. Transcurrida las 12 horas, las muestras son dializadas en solución amortiguadora de acidificación para el almacenamiento de las VLP's.

2.3 Caracterización de los nanorreactores enzimáticos con actividad GAA

Una vez purificadas las VLP's BMV:GAA, las masas totales de proteína de las muestras fueron cuantificadas por medio de la técnica Bradford descrita por Ernst y Zor (2010). El rendimiento de síntesis de VLP's fue determinada por el cociente de la masa total de proteína en la muestra final de VLP's sobre la masa total de proteína presente al inicio de la reacción de autoensamble. Posteriormente, por medio de un ensayo de electroforesis en gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), se estimó la proporción de GAA y CP en las muestras de VLP's producidas.

Ensayos de actividad enzimática de las VLP's BMV:GAA sintetizadas y de la enzima GAA libre fueron realizados siguiendo el protocolo descrito por Siro y Lovgren (1978), en el que se utiliza el sustrato sintético *p*-nitrofenol α -D-glucósido (pNP-Glc) para estimar los parámetros catalíticos de las partículas activas aplicando el modelo de Michaelis-Menten (**Figura 8**). Se usó un espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000c de Thermo Fisher Scientific para medir el cambio de absorbancia (400 nm), en función del tiempo y así estimar la velocidad inicial de la enzima a diferentes concentraciones molares del sustrato. Posteriormente, se realizó una regresión no lineal de Michaelis-Menten para determinar las constantes catalíticas K_M y K_{cat} de las muestras, utilizando el software CurveExpert Professional (versión 2.7.3.). Por

último, los valores de actividad enzimática de las VLP's con actividad GAA fueron comparados con las obtenidas por la enzima libre.

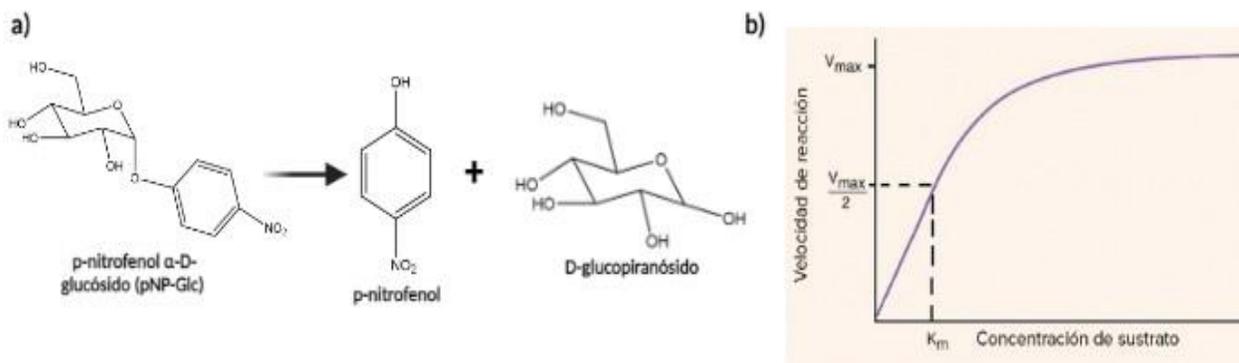


Figura 8. Cinética enzimática de la GAA. a) Degradación del sustrato p-nitrofenol α -D-glucósido (pNP-Glc) tras ser catalizada por la GAA. b) Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten para determinar los parámetros catalíticos de la GAA.

La caracterización de la estructura de las VLP's BMV:GAA fueron estudiadas por la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM), utilizando un microscopio JEOL JEM-2010. Se colocaron 10 μ L de la suspensión de las VLP's sobre una rejilla de cobre para TEM, en la que se dejó incubar por un minuto a temperatura ambiente para después retirar la gota con papel secante. Enseguida, se depositó una gota más de 4 μ L de acetato de uranilo al 1% sobre la rejilla y se incubó bajo las mismas condiciones, retirando con papel secante el acetato de uranilo. Las preparaciones fueron observadas bajo el microscopio a un voltaje de operación de 200 kV. Finalmente, las micrografías obtenidas se analizaron en el software ImageJ (versión 1.8.0), para conocer la morfología, tamaño y homogeneidad de las nanopartículas producidas.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Obtención de la proteína de cápside (CP) del BMV

La obtención de proteína de cápside (CP) del BMV fue lograda con éxito a partir del desensamble de los viriones nativos. De manera satisfactoria, el invernadero fue habilitado para el cuidado de 150 macetas que contenían plantas de cebada para ser infectadas con BMV (**Figura 9**). La infección de plantas de cebada con el BMV fue un método efectivo para amplificar los viriones (**Figura 10**). Con la estrategia utilizada para la extracción y purificación de BMV, se logró un rendimiento de producción de 0.5 mg de BMV por cada gramo de hojas de cebada infectadas, con una pureza mediada por el cociente de absorbancia $260\text{ nm}/280\text{ nm} \geq 1.5$ (**Figura 11**). A partir del desensamble de los viriones, se obtuvo exitosamente CP con una pureza mediada por el cociente de absorbancia $280\text{ nm}/260\text{ nm} \geq 1.5$, y con un rendimiento de 0.6 mg de CP-BMV por cada mg de BMV utilizado en el desensamble. Los resultados anteriores son similares a los obtenidos en otros trabajos de investigación reportados recientemente (Chauhan et al., 2022; Gama et al., 2021; Pérez Sánchez, 2019).



Figura 9. Habilitación del invernadero para el cultivo de plantas de cebada. Para el crecimiento óptimo de la cebada, se utilizó un sistema de riego con mangueras, las cuales, estaban montadas sobre una mesa metálica con capacidad para 75 macetas.



Figura 10. Plantas de cebada infectadas con el BMV. Las hojas de cebada muestran los síntomas típicos de infección, determinadas por la aparición de un patrón de clorosis. El patrón de clorosis en las hojas de cebada es la aparición de líneas amarillentas a lo largo de la lámina foliar.

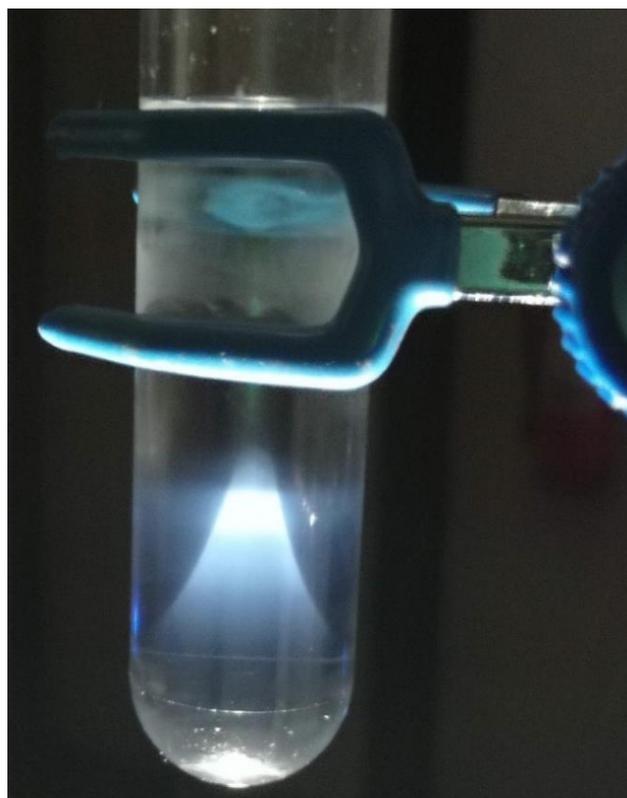


Figura 11. Purificación del BMV por gradiente de sacarosa. Después de la centrifugación, al incidir luz blanca por debajo del tubo que contiene el gradiente y la muestra de extracción, una intensa banda azul a mitad de esta se hace notar, correspondiente a la presencia de BVM. Lo anterior es debido al efecto Rayleigh reportado en en el trabajo de Dragnea et al. (2003).

3.2 Diseño y síntesis de nanorreactores enzimáticos con actividad GAA basados en cápsides del BMV

La enzima GAA posee una distribución superficial de carga negativa (**Figura 12**), contrario a lo que sucede con la proteína de cápside del BMV, cuya distribución interna de cargas eléctricas es altamente positiva (Lucas et al., 2002). Con lo anterior, se determinó que la complementariedad de cargas eléctricas entre la enzima GAA y la parte interna de las cápsides del BMV iban a estar presentes para la formación de VLP's por el método de autoensamble.

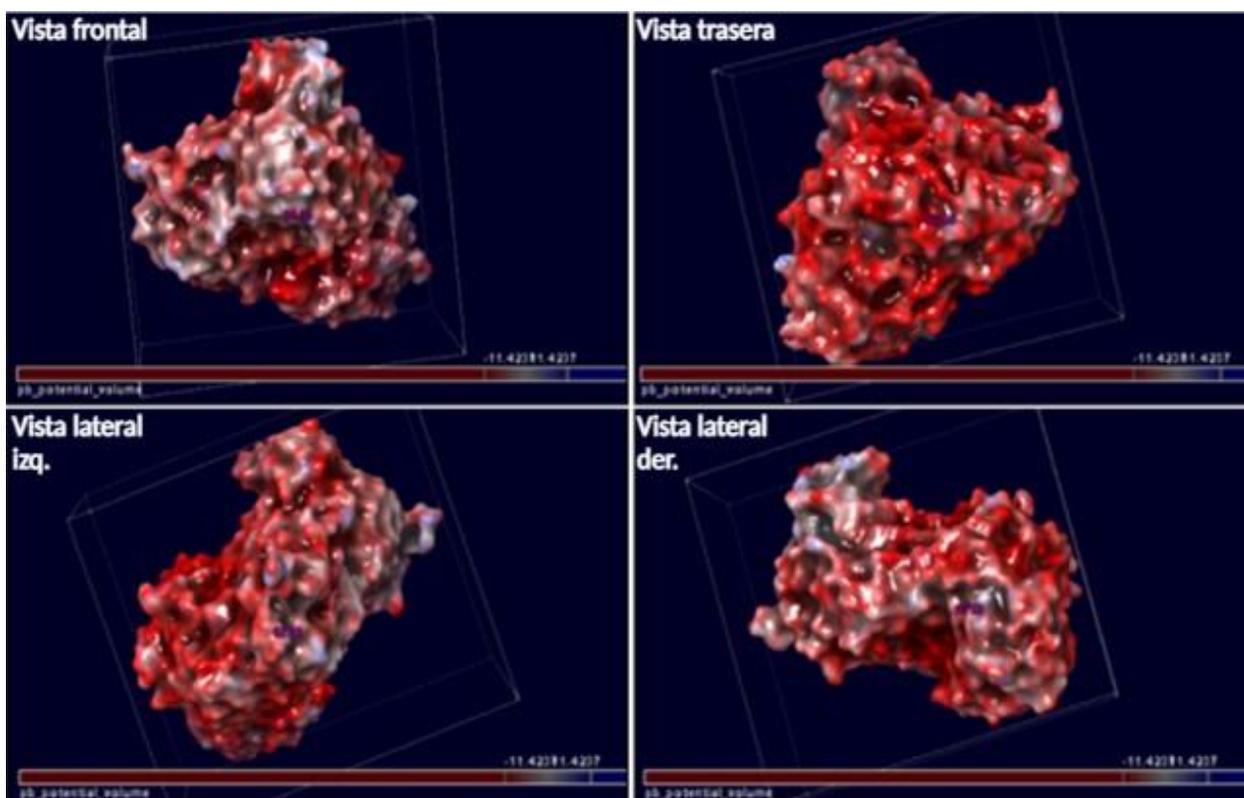


Figura 12. Mapa electrostático de la enzima GAA. Se ilustra de color rojo las cargas negativas y de color azul las cargas positivas.

La enzima GAA tuvo un diámetro hidrodinámico de 7 nm, determinado por DLS (**Figura 13**). Considerando un 75% de espacio disponible en el interior de la cápside del BMV, se determinó la cantidad de 20 moléculas de enzima GAA por cada cápside de BMV como la capacidad máxima teórica. A partir de este

resultado, se probaron tres razones molares distintas (1:2, 1:10 y 1:20 VLP: GAA), para la síntesis de nanorreactores enzimáticos por el método de autoensamble.

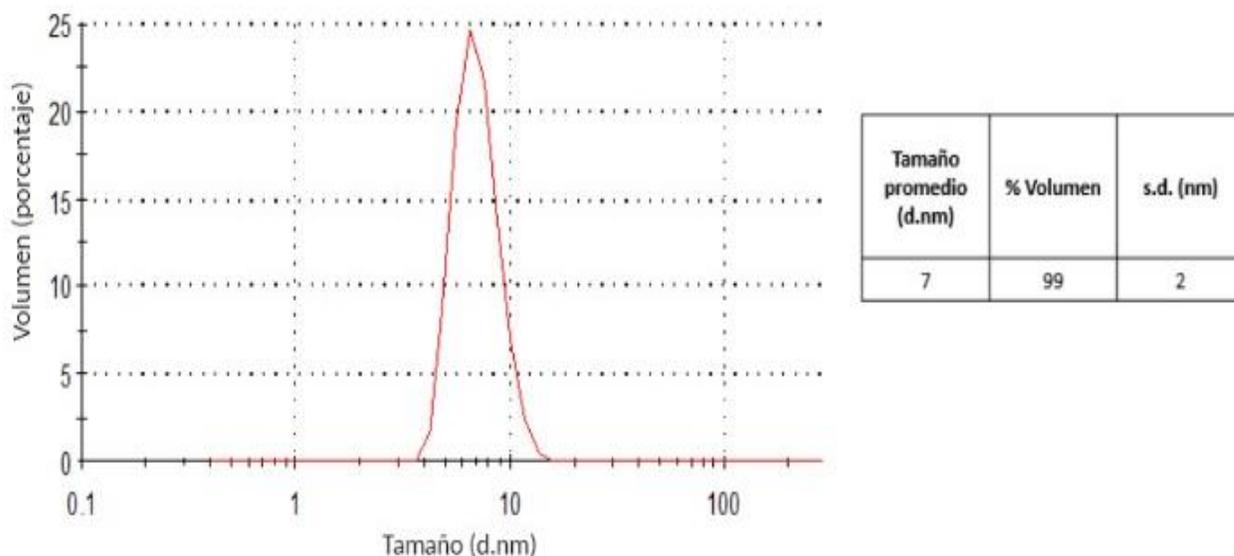


Figura 13. Distribución de tamaño hidrodinámico de la enzima GAA. La distribución de tamaños de la muestra de GAA fue homogénea y de tamaño promedio igual a 7 ± 2 nm.

3.3 Caracterización de los nanorreactores BMV:GAA

La síntesis de nanorreactores BMV:GAA por el método de autoensamble fueron obtenidas con éxito. Las VLP's fueron purificadas por centrifugación y presentaron un diámetro hidrodinámico promedio de 26 ± 10 nm, similares a la del virión nativo con $T= 3$ (Lucas et al., 2002; Strugała et al., 2017). La población de partículas producidas fue en incremento para cuando la relación molar de VLP: GAA fue en disminución. Además, los picos correspondientes a la enzima y proteína de cápside libre no se hacen presentes en el análisis por DLS (**Figura 14**). Se destaca que, el rendimiento de encapsidación derivadas de las reacciones de autoensamble no fueron mayores al 2% para todos los casos.

Para la cuantificación del contenido de moléculas de GAA dentro de cada cápside del BMV, se usó la técnica de densitometría en gel de electroforesis desnaturizante (**Figura 15**). Los resultados cuantitativos se muestran en la **Tabla 2**. Como era de esperarse, a mayor proporción de GAA, mayor es su encapsidación. De esta manera, la relación 1:20 VLP: GAA, fue la que mostró un mayor contenido de moléculas de enzima por cápside comparada con el resto de relaciones y, la relación 1:2 VLP: GAA, fue la que supero la cantidad esperada de moléculas de enzima confinadas.

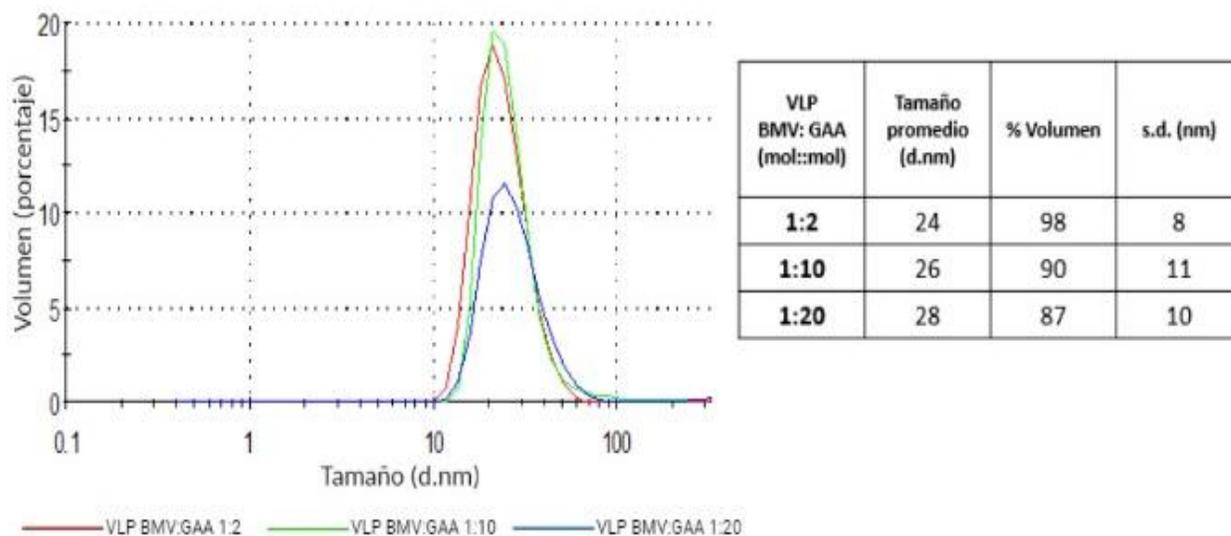


Figura 14. Distribución de tamaños hidrodinámicos de las VLP's BMV-GAA. No se hacen notar los picos correspondientes a la enzima y CP libre, por lo que se determina la efectividad del método de purificación.

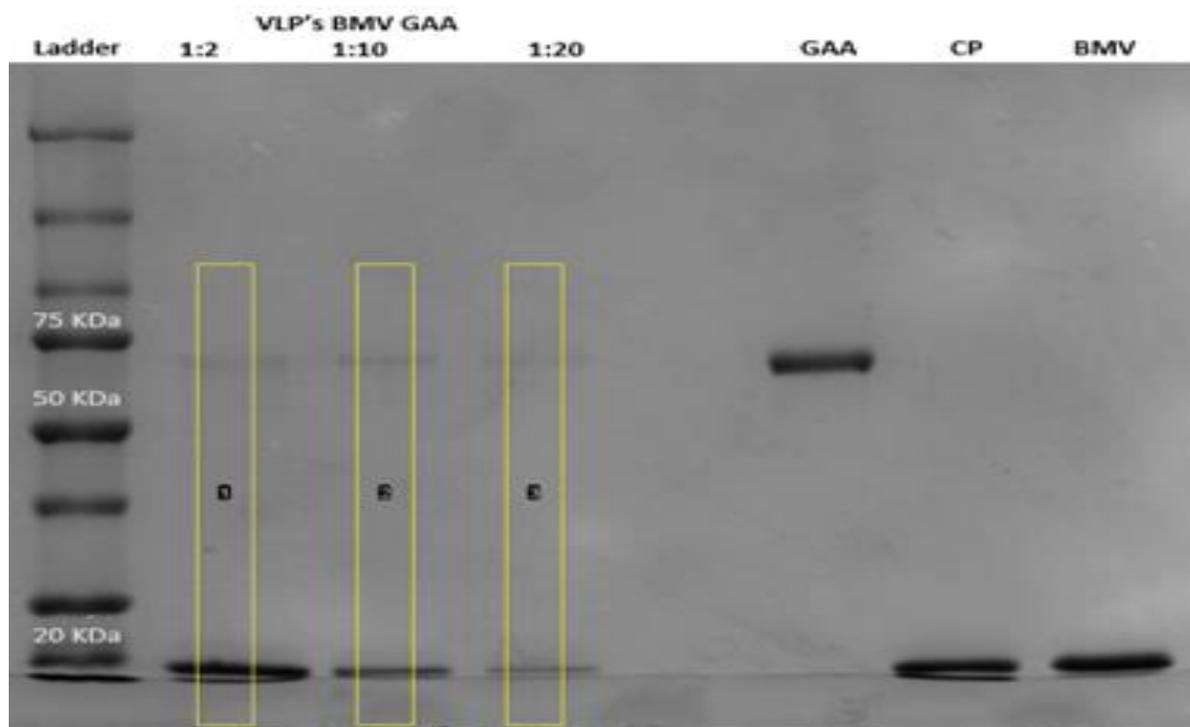


Figura 15. Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida de las VLP's BMV-GAA, procesadas en el software ImageJ. Carril 1, corresponde al marcador de peso molecular (Bio-Rad 20-250KDa). Carril 2, 3 y 4, corresponden a las muestras de autoensamble 1:2, 1:10 y 1:20 (VLP-BMV: GAA), respectivamente. Carriles 6, 7 y 8 corresponden a enzima GAA, proteína de cápside del BMV y virión BMV como testigos.

Tabla 2. Estimación densitométrica del gel de electroforesis correspondiente a las VLP's BMV:GAA producidas.

VLP'S BMV:GAA	% GAA en cápside	Relación molar (monómeros de GAA/CP)	Contenido promedio (monómeros de GAA/VLP)
1:2	8	0.03	5
1:10	11	0.04	7
1:20	21	0.07	14

Ensayos de actividad enzimática de las VLP's BMV:GAA y de la enzima GAA libre fueron realizados con éxito. Se logró medir el cambio de absorbancia (400 nm), usando diferentes concentraciones molares de sustrato p-nitrofenol α -D-glucósido (pNP-Glc) (**Figura 16**).

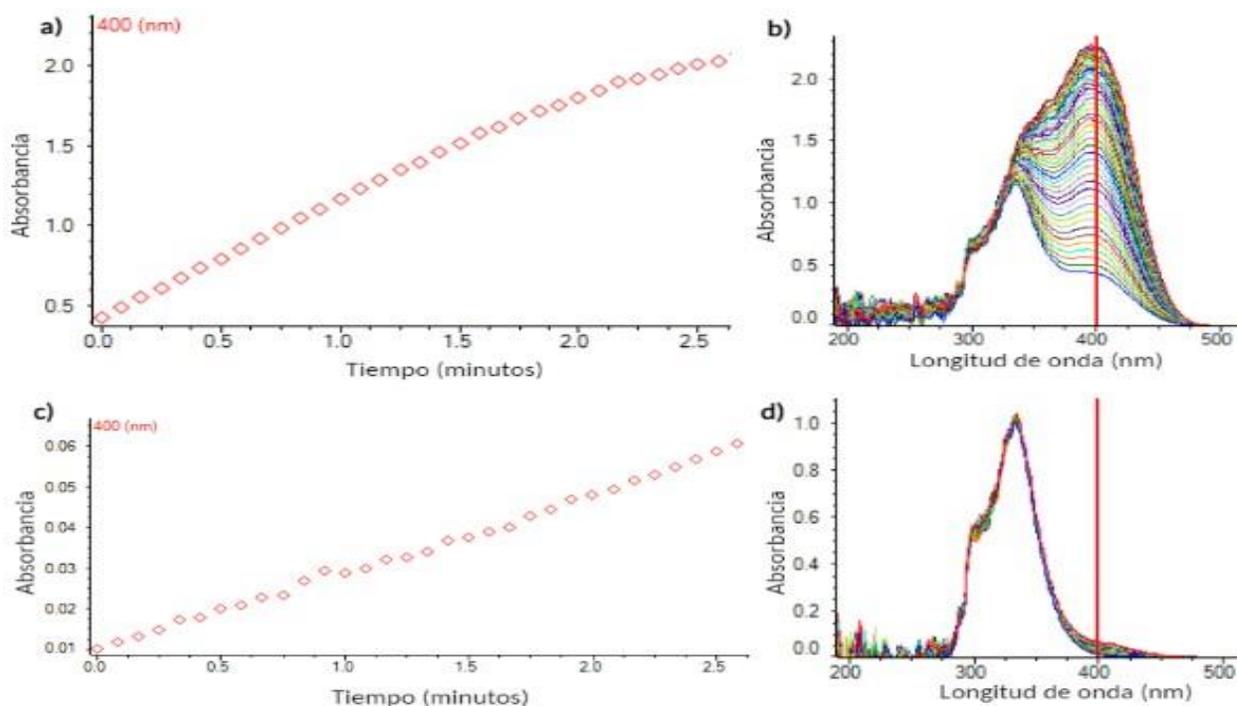


Figura 16. Comparativa de velocidad de reacción catalítica de la enzima GAA libre y de una VLP BMV:GAA. a) Cambios de absorbancia (400 nm) en función del tiempo para la GAA libre. b) Cambios de absorbancia en función de longitud de onda para la GAA libre. c) Cambios de absorbancia (400 nm) en función del tiempo para la VLP BMV:GAA (1:10). d) Cambios de absorbancia en función de longitud de onda para la VLP BMV:GAA (1:10). Se usó $0.45 \mu\text{M}$ de sustrato p-nitrofenol α -D-glucósido (pNP-Glc) que, al ser catalizada por la GAA, se genera un compuesto fenólico detectable a 400 nm.

Se caracterizaron catalíticamente todas las preparaciones (**Tabla 3**). Los resultados del modelado de Michaelis-Menten indican una ligera mayor afinidad (K_M), por parte de las VLP's BMV:GAA hacia el sustrato para cuando se compara con la enzima libre. Tal y como se esperaba, la constante de actividad catalítica (k_{cat}), fue menor para las VLP's en comparación con la enzima libre. Se destaca que, la relación molar 1:10 (VLP-BMV: GAA), obtuvo una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) mayor a la enzima libre y al resto de ensambles, aun para cuando la relación 1:20 presentó más moléculas de GAA en cada cápside.

Tabla 3. Resultados del ensayo de cinética enzimática de las VLP's BMV:GAA en contraste con la enzima GAA libre.

CINÉTICA ENZIMÁTICA				
	ENSAMBLES			Enzima libre
	Relación molar (VLP's BMV: GAA)			
	1:2	1:10	1:20	
K_M (mM)	0.17 ±0.08	0.11 ±0.03	0.11 ±0.1	0.61 ±0.2
k_{cat} (s⁻¹)	71 ±28	124 ±24	43 ±21	388 ±29
k_{cat}/K_M (s⁻¹ mM⁻¹)	418	1127	391	636

De acuerdo con las micrografías obtenidas por TEM (**Figura 17**), las poblaciones de partículas sintetizadas fueron mucho mayores para la relación 1:2 de VLP: GAA, y mucho menor para la relación 1:20 de VLP: GAA, tal y como se esperaba. El tamaño promedio de las VLP's producidas fue de 26 ±3 nm, con algunas partículas rotas, aunque comparables con la morfología del BMV nativo de 28 nm reportados por Narayanan y Han (2017).

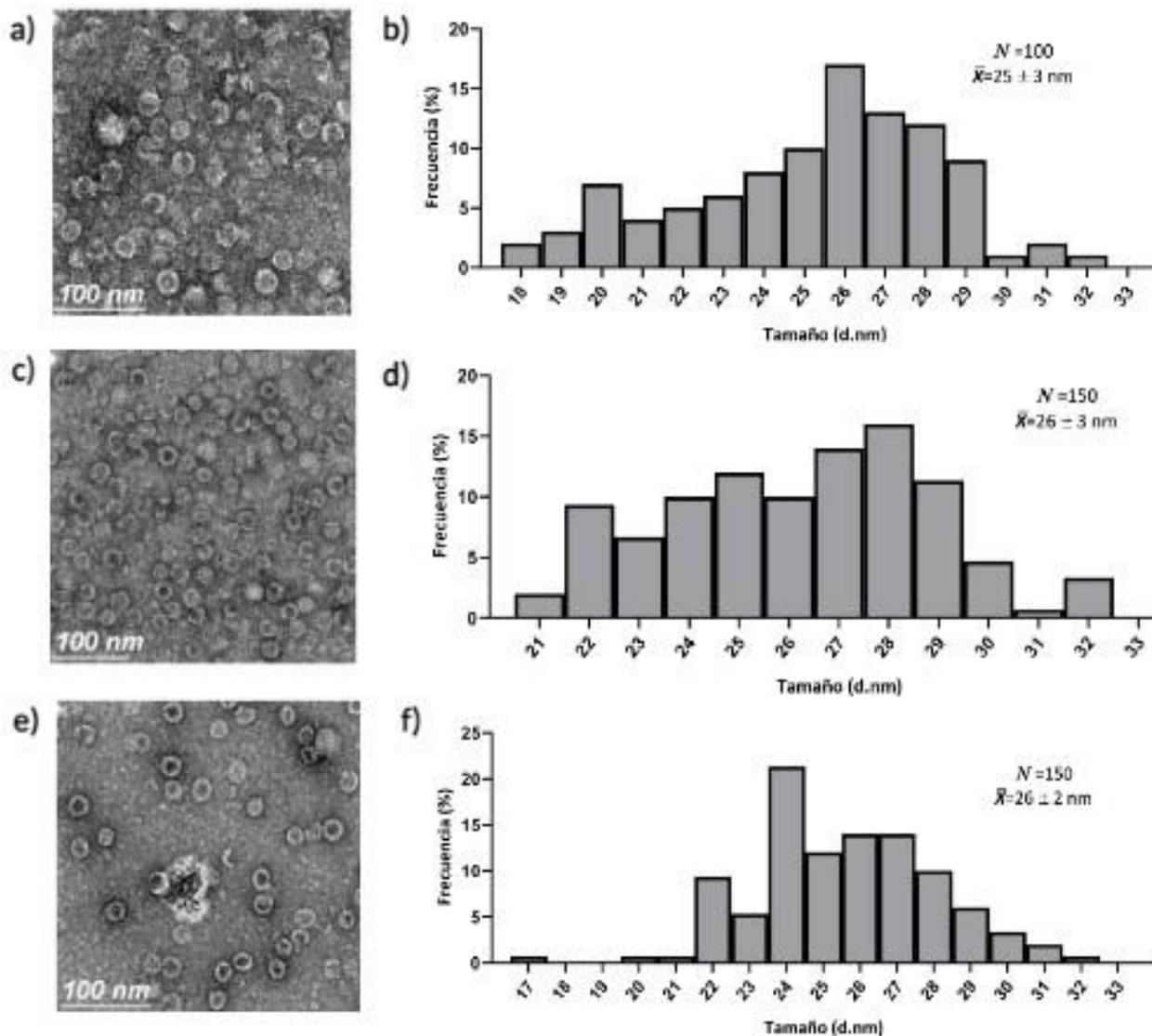


Figura 17. Caracterización estructural de las VLP's BMV-GAA. a) Micrografías de las VLP's BMV-GAA (1:2), de tamaño promedio 25 ± 3 nm. b) Histograma de distribución de tamaños de las VLP's BMV-GAA (1:2). c) Micrografías de las VLP's BMV-GAA (1:10), de tamaño promedio 26 ± 3 nm. d) Histograma de distribución de tamaños de las VLP's BMV-GAA (1:10). e) Histograma de distribución de tamaños de las VLP's BMV-GAA (1:2), de tamaño 25 ± 3 nm. f) Micrografías de las VLP's BMV-GAA (1:20), de tamaño promedio 26 ± 2 nm. d) Histograma de distribución de tamaños de las VLP's BMV-GAA (1:20).

Capítulo 4. Discusión

Pese a lograr exitosamente la amplificación de viriones de BMV a partir de la infección de plantas de cebada, existieron complicaciones importantes que no permitieron el manejo adecuado de los cultivos y, por ende, detuvieron la obtención de proteína de cápside. Lo anterior se debió a la contingencia de salud mundial derivada por la pandemia del COVID-19, donde el acceso al invernadero institucional se mantuvo deshabilitado por un largo periodo de tiempo. Es importante resaltar que el regado con agua para las plantas de cebada y la cosecha de hojas infectadas con BMV deben realizarse de forma periódica para mantener activa la fuente de producción de viriones. Además, los tiempos necesarios para la habilitación del invernadero, germinación de semillas de cebada, siembra, inoculación y, cultivo de hojas infectadas con BMV pueden llegar a demorar la producción de proteína de cápside en hasta 30 días. Es por ello, que se sugiere probar otras estrategias como la reportada por Strugała et al. (2021), en el que se utiliza proteína de cápside del BMV producida con éxito en un sistema de *E. coli*.

La complementariedad de cargas electrostáticas entre la superficie de la enzima GAA (carga superficial negativa a pH=7), y la parte N-terminal de las proteínas de cápside del BMV, permitieron con seguridad realizar el encapsulamiento de la enzima GAA en cápsides virales de BMV. Este mecanismo de encapsulamiento mediado por la complementariedad de cargas eléctricas coincide con los trabajos reportados por distintos autores (Chauhan et al., 2022; Gama et al., 2021; Tejeda-Rodríguez et al., 2019), en el que se señala la complementariedad de cargas como principal interacción para la formación de los nanorreactores basados en cápsides del BMV por el método de autoensamble. El confinamiento de la enzima GAA dentro de las cápsides del BMV fue lograda usando el método de autoensamble previamente reportado para el encapsulamiento de otras biomoléculas, como ácidos nucleicos (Núñez et al, 2019), e incluso, otras enzimas de interés biomédico (Gama et al., 2021; González-Davis et al., 2020; Sánchez-Sánchez et al., 2014).

De acuerdo con los ensayos de actividad enzimática, se determinó que las nanopartículas producidas en este trabajo y denominadas VLP's BMV:GAA, son catalíticamente activas como se muestran en los resultados de la **Tabla 3**. La relación molar 1:10 (VLP's BMV: GAA), fue la reacción de ensamble más eficiente de este estudio, cuya actividad catalítica y estructura superaron al resto. Esta velocidad de transformación (k_{cat}) fue mayor que la obtenida por la proporción 1:20, en la cual, se determinó que hay el doble de moléculas de enzima que en la relación 1:10. Sin embargo, la velocidad de transformación de la proporción 1:10 no supero a la de la enzima libre. Estos resultados pueden deberse a que en un alto

empaquetamiento de la enzima no todos los sitios activos sean accesibles para el sustrato. Además, es posible que un alto confinamiento impida la movilidad molecular que es necesaria para la actividad catalítica (Chauhan et al., 2021).

Por otra parte, la afinidad de la enzima libre hacia el sustrato fue menor en comparación con la enzima encapsulada. Este hecho puede deberse a las condiciones ácidas en las que la enzima se encuentra confinada. En la naturaleza, los lisosomas presentan un pH ácido en su interior y esto favorece la afinidad catalítica de la GAA (Yamamoto et al., 2004). El hecho de que la actividad catalítica de la enzima confinada sea inferior a la de la enzima libre no es de extrañar. Esta reducción de la velocidad de transformación ha sido reportada también en otros nanorreactores enzimáticos (Gama et al., 2021; Tapia-Moreno et al., 2017). Se deben considerar las posibles barreras de difusión que impiden al sustrato pasar a través de las matrices de soporte de la enzima (Zhang et al., 2019), ya que, de la misma forma, el producto de la reacción catalítica tendrá dificultades para salir del nanorreactor. No obstante, las cápsides de virus son candidatas excelentes para ejercer control sobre la cinética de reacción y la selectividad del producto, ya que, las cápsides pueden confinar múltiples enzimas e imitar reacciones enzimáticas naturales (Maity et al., 2015). Además, la actividad catalítica que presentaron los nanorreactores BMV:GAA fueron suficientes para considerarlas en futuros estudios, verbigracia, evaluaciones de estabilidad catalítica en condiciones fisiológicas.

La integridad morfológica y homogeneidad de los nanorreactores BMV:GAA mostraron que eran de forma cuasi-esférica, homogéneas y de aproximadamente 26 nm de tamaño, los cuales, son comparables con la observada en el BMV nativo (Lucas et al., 2002; Strugała et al., 2017). Sin embargo, algunas de estas partículas parecían ser heterogéneas en tamaño y con una estructura rota. Este hecho puede deberse a que durante el proceso de purificación se vea afectada la integridad estructural de las VLP. Este argumento fue reportado por Huhti et al. (2010), en el que estudiaron los métodos de purificación convencionales para las VLP en términos de rendimiento, pureza, integridad morfológica, antigenicidad y funcionalidad.

Debido a la naturaleza proteica de las cápsides virales del BMV, existen muchos grupos funcionales presentes en su estructura superficial externa, especialmente grupos amino y grupos carboxilo libres, que pueden ser usados para el anclaje de ligandos específicos en la superficie de la cápside (Chauhan et al., 2022; Donaldson et al., 2017; Vasconcelos Queiroz et al., 2021). De esta manera, los nanorreactores BMV:GAA podrían ser reconocidos por receptores específicos de las células diana para ser dirigidos hacia los lisosomas y así, mejorar la efectividad del tratamiento contra la EP.

Dentro de las enfermedades originadas por la deficiencia o ausencia de la actividad enzimática, la enfermedad de Pompe si bien es considerada rara (Castro Tarín et al., 2010), no deja de ser importante y grave. La forma “infantil clásica” de la enfermedad es descrita con más frecuencia, induciendo cardiomegalia grave, hepatomegalia, hipotonía desde el nacimiento y muerte temprana. Por el otro lado, la forma “infantil no clásica”, se manifiesta desde el primer año, pero con progresión más lenta y miocardiopatía menos grave. Mientras que, la forma “tardía” se manifiesta en la niñez, en la juventud o en el adulto, entre la segunda y la sexta década de la vida, con miopatía lentamente progresiva, por lo general, sin miocardiopatía (Koeberl et al., 2020).

Dichas variaciones provocan dificultades en la efectividad del tratamiento convencional contra la enfermedad de Pompe, sobre todo para la forma infantil clásica (Bay et al., 2019). Es por ello, que el uso de los nanorreactores BMV:GAA podría mejorar la situación de la terapia por medio del aprovechamiento de sus cualidades: bajo potencial inmunogénico, capacidad de ser endocitadas por las células (Núñez-Rivera et al., 2020), buena actividad catalítica en condiciones ácidas y estructura similar al virión nativo, lo cual, otorga la posibilidad de modificar su superficie externa para dotarlos de funciones nuevas. (Núñez-Rivera et al., 2020). Esto evidencia que, las partículas BMV:GAA, podrían dirigirse y mantenerse estables hasta su sitio de acción, por lo que se esperaría mantengan íntegramente su actividad catalítica dentro de los lisosomas de pacientes con enfermedad de Pompe.

Capítulo 5. Conclusiones

Se diseñaron y sintetizaron de manera exitosa nanorreactores enzimáticos con actividad GAA basados en cápsides del BMV por el método de autoensamble, por lo que, la estrategia de encapsulamiento por complementariedad de cargas electroestáticas resulta factible para esta enzima.

Se obtuvo exitosamente proteína de cápside del BMV. La amplificación del BMV a través de la inoculación de plantas de cebada es una estrategia efectiva para obtener proteína de cápside por medio del desensamble de los viriones.

Los nanorreactores enzimáticos con actividad GAA mostraron una buena actividad catalítica que fue de mayor afinidad al sustrato que para la enzima libre. Los valores de actividad pueden ser suficientes para mejorar la TRE; sobre todo por la oportunidad de modificar su superficie para dirigirlos hacia los lisosomas, lo cual podría mantener más tiempo activa dentro del cuerpo y, por lo tanto, posible disminución de la dosis del tratamiento para la enfermedad de Pompe.

Los nanorreactores con actividad alfa glucosidasa acida son una alternativa muy interesante con la posibilidad de mejorar la terapia de remplazo enzimático para la enfermedad de Pompe. Los siguientes pasos serían: estudiar la estabilidad de los nanorreactores en condiciones fisiológicas, su internalización celular en diferentes líneas celulares relacionadas con la EP y, la actividad catalítica en experimentos in vivo con modelos animales de la enfermedad de Pompe.

Literatura citada

- Alemzadeh, E., Dehshahri, A., Izadpanah, K., y Ahmadi, F. 2018. Plant virus nanoparticles: Novel and robust nanocarriers for drug delivery and imaging. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 167, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.03.026>
- Ali, M., Barakat, A., El-Faham, A., Al-Rasheed, H. H., Dahlous, K., Al-Majid, A. M., Sharma, A., Yousuf, S., Sanam, M., Ul-Haq, Z., Choudhary, M. I., de la Torre, B. G., y Albericio, F. 2020. Synthesis and characterisation of thiobarbituric acid enamine derivatives, and evaluation of their α -glucosidase inhibitory and anti-glycation activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 692–701. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1737045>
- Alonso, J. M., Górzny, M. L., y Bittner, A. M. 2013. The physics of tobacco mosaic virus and virus-based devices in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 31(9), 530–538. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2013.05.013>
- Azizgolshani, O., Garmann, R. F., Cadena Nava, R., Knobler, C. M., y Gelbart, W. M. 2013. Reconstituted plant viral capsids can release genes to mammalian cells. *Virology*, 441(1), 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.03.001>
- Balkrishna, A., Arya, V., Rohela, A., Kumar, A., Verma, R., Kumar, D., Nepovimova, E., Kuca, K., Thakur, N., Thakur, N., Kumar, P., y Bachmann, F. 2021. *Nanotechnology Interventions in the Management of COVID-19: Prevention, Diagnosis and Virus-Like Particle Vaccines*. <https://doi.org/10.3390/vaccines9101129>
- Barwal, I., Kumar, R., Kateriya, S., Dinda, A. K., y Yadav, S. C. 2016. Targeted delivery system for cancer cells consist of multiple ligands conjugated genetically modified CCMV capsid on doxorubicin GNPs complex. *Scientific Reports*, 6(November), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep37096>
- Bay, L. B., Denzler, I., Durand, C., Eiroa, H., Frabasil, J., Fainboim, A., Maxit, C., Schenone, A., y Spécola, N. 2019. Infantile-onset Pompe disease: Diagnosis and management. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 117(4), 271–278. <https://doi.org/10.5546/aap.2019.eng.271>
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., y Rizzolio, F. 2020. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
- Blackburn, M. R., y Kellems, R. E. 2005. Adenosine Deaminase Deficiency: Metabolic Basis of Immune Deficiency and Pulmonary Inflammation. *Advances in Immunology*, 86, 1–41. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(04\)86001-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(04)86001-2)
- Bond, J. E., Kishnani, P. S., y Koeberl, D. D. 2019. Immunomodulatory, liver depot gene therapy for Pompe disease. *Cellular Immunology*, 342, 103737. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.12.011>
- Bongsu, J., Ayala, L. N. R., y Bahman, A. 2011. Optical Nano-Constructs Composed of Genome-Depleted Brome Mosaic Virus Doped with a Near Infrared Chromophore for Potential Biomedical Applications. *ACS Nano*, 5(2), 1243–1252.

- Cadena-Nava, R. D., Comas-García, M., Garmann, R. F., Rao, A. L. N., Knobler, C. M., y Gelbart, W. M. 2019. Correction for Cadena-Nava et al., "Self-Assembly of Viral Capsid Protein and RNA Molecules of Different Sizes: Requirement for a Specific High Protein/RNA Mass Ratio." *Journal of Virology*, 93(4). <https://doi.org/10.1128/JVI.01939-18>
- Cagin, U., Puzzo, F., Gómez, M. J., Moya-Nilges, M., Sellier, P., Abad, C., van Wittenberghe, L., Daniele, N., Guerchet, N., Gjata, B., Collaud, F., Charles, S., Sola, M. S., Boyer, O., Krijnse-Locker, J., Ronzitti, G., Colella, P., y Mingozzi, F. 2020. Rescue of Advanced Pompe Disease in Mice with Hepatic Expression of Secretable Acid α -Glucosidase. *Molecular Therapy*, 28(9), 17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.05.025>
- Carretero Colomer, M. 2007. Enfermedad de POMPE. Nuevas perspectivas terapéuticas. *Offarm*, 26(11), 84–86.
- Castro Tarín, M., García Ortiz, J. E., y Ortiz Aranda, M. 2010. Diagnóstico y Tratamiento de glucogenosis tipo II (enfermedad de Pompe). In Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (Ed.), *Secretaría de Salud*. CENETEC. www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html
- Chauhan, K., Hernández Meza, J. M., Rodríguez Hernández, A. G., Juárez Moreno, K., Sengar, P., y Vázquez Duhalt, R. 2018. Multifunctionalized biocatalytic P22 nanoreactor for combinatory treatment of ER+ breast cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(17), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0345-2>
- Chauhan, K., Olivares-Medina, C. N., Villagrana-Escareño, M. v., Juárez-Moreno, K., Cadena-Nava, R. D., Rodríguez-Hernández, A. G., y Vázquez-Duhalt, R. 2022. Targeted Enzymatic VLP-Nanoreactors with β -Glucocerebrosidase Activity as Potential Enzyme Replacement Therapy for Gaucher's Disease. *ChemMedChem*, 202200384. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202200384>
- Chauhan, K., Sengar, P., Juárez-Moreno, K., Hirata, G. A., y Vázquez-Duhalt, R. 2020. Camouflaged, activatable and therapeutic tandem bionanoreactors for breast cancer theranosis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 580, 365–376. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.07.043>
- Chauhan, K., Zárate-Romero, A., Sengar, P., Medrano, C., y Vázquez-Duhalt, R. 2021. Catalytic Kinetics Considerations and Molecular Tools for the Design of Multienzymatic Cascade Nanoreactors. *The European Society Journal for Catalysis*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cctc.202100604>
- Chien, Y. H., Hwu, W. L., y Lee, N. C. 2013. Pompe disease: Early diagnosis and early treatment make a difference. *Pediatrics and Neonatology*, 54(4), 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.03.009>
- Comellas-Aragonès, M., Engelkamp, H., Claessen, V. I., Sommerdijk, N. A. J. M., Rowan, A. E., Christianen, P. C. M., Maan, J. C., Verduin, B. J. M., Cornelissen, J. J. L. M., y Nolte, R. J. M. 2007. A virus-based single-enzyme nanoreactor. *Nature Nanotechnology*, 2(10), 635–639. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.299>
- de Vocht, C., Ranquin, A., Willaert, R., van Ginderachter, J. A., Vanhaecke, T., Rogiers, V., Versées, W., van Gelder, P., y Steyaert, J. 2009. Assessment of stability, toxicity and immunogenicity of new polymeric nanoreactors for use in enzyme replacement therapy of MNGIE. *Journal of Controlled Release*, 137(3), 246–254. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2009.03.020>

- Desai, A. K., Kazi, Z. B., Bali, D. S., y Kishnani, P. S. 2019. Characterization of immune response in Cross-Reactive Immunological Material (CRIM)-positive infantile Pompe disease patients treated with enzyme replacement therapy. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 20(100475). <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2019.100475>
- Díaz-Cruz, G. A., Smith, C. M., Wiebe, K. F., Charette, J. M., y Cassone, B. J. 2017. First Report of Brome mosaic virus Infecting Soybean, Isolated in Manitoba, Canada. *The American Phytopathological Society (APS) Publications*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1012-PDN>
- Donaldson, B., Al-Barwani, F., Pelham, S. J., Young, K., Ward, V. K., y Young, S. L. 2017. Multi-target chimaeric VLP as a therapeutic vaccine in a model of colorectal cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 5(69). <https://doi.org/10.1186/s40425-017-0270-1>
- Dragnea, B., Chen, C., Kwak, E.-S., Stein, B., y Kao, C. C. 2003. Gold Nanoparticles as Spectroscopic Enhancers for in Vitro Studies on Single Viruses. *Journal of the American Chemical Society*, 125(21), 6374–6375. <https://doi.org/10.1021/ja0343609>
- Eiben, S., Koch, C., Altintoprak, K., Southan, A., Tovar, G., Laschat, S., Weiss, I. M., y Wege, C. 2019. Plant virus-based materials for biomedical applications: Trends and prospects. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 145, 96–118. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.08.011>
- Ernst, O., y Zor, T. 2010. Linearization of the Bradford protein assay. *Journal of Visualized Experiments*, 38, 1–6. <https://doi.org/10.3791/1918>
- Fernández-Simón, E., Carrasco-Rozas, A., Gallardo, E., González-Quereda, L., Alonso-Pérez, J., Belmonte, I., Pedrosa-Hernández, I., Montiel, E., Segovia, S., Suárez-Calvet, X., Llauger, J., Mayos, M., Illa, I., Barba-Romero, M. A., Barcena, J., Paradas, C., Carzorla, M. R., Creus, C., Coll-Cantí, J. y Díaz-Manera, J. 2019. Study of the effect of anti-rhGAA antibodies at low and intermediate titers in late onset Pompe patients treated with ERT. *Molecular Genetics and Metabolism*, 128(1), 129–136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.07.013>
- Gad, S., y Ayakar, S. 2021. Protein scaffolds: A tool for multi-enzyme assembly. *Biotechnology Reports*, 32(August), e00670. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00670>
- Gama López, P. A. 2019. *Nanobiorreactores con actividad enzimática como terapia para la galactosemia clásica*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 65.
- Gama, P., Cadena-Nava, R. D., Juárez-Moreno, K., y Pérez-Robles, J. 2021. Virus-Based Nanoreactors with GALT Activity for Classic Galactosemia Therapy. *European Chemical Societies Publishing*, 1–9. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000999>.
- Gillitzer, E., Willits, D., Young, M., y Douglas, T. 2002. Chemical modification of a viral cage for multivalent presentation. *Chemical Communications*, 20, 2390–2391.
- Glasgow, J., y Tullman-Ercek, D. 2014. Production and applications of engineered viral capsids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 5847–5858. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5787-3>
- González-Davis, O., Chauhan, K., Zapian-Merino, S.-J., y Vázquez-Duhalt, R. 2020. Bi-enzymatic virus-like bionanoreactors for the transformation of endocrine disruptor compounds. *International Journal of*

- González-Davis, O., Kanchan, C., y Vázquez-Duhalt, R. 2019. Biocatalytic Nanoreactors for Medical Purposes. In *Pharmaceutical Biocatalysis* (pp. 637–671). <https://doi.org/10.1201/9780429295034-18>
- Hema, M., Vishnu Vardhan, G. P., Savithri, H. S., y Murthy, M. R. N. 2019. Emerging Trends in the Development of Plant Virus-Based Nanoparticles and Their Biomedical Applications. In V. B. T.-R. D. in A. M. and B. Buddolla (Ed.), *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry* (pp. 61–82). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00006-4>
- Huhti, L., Blazevic, V., Nurminen, K., Koho, T., Hytönen, V. P., y Vesikari, T. 2010. A comparison of methods for purification and concentration of norovirus GII-4 capsid virus-like particles. *Arch Virol*, 155, 1855–1858. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0768-z>
- Hung, P. P., Ling, C. M., y Overby, L. R. 1969. Self-Assembly of Q β and MS2 Phage Particles: Possible Function of Initiation Complexes. *Science*, 166(3913), 1638–1640. <https://doi.org/10.1126/science.166.3913.1638>
- Katen, S., y Zlotnick, A. 2009. Chapter 14 The Thermodynamics of Virus Capsid Assembly. *Methods in Enzymology*, 455(A), 395–417. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)04214-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)04214-6)
- Kawano, M., Matsui, M., y Handa, H. 2018. Technologies that generate and modify virus-like particles for medical diagnostic and therapy purposes. In A. M. B. T.-D. and D. of N. N. Grumezescu (Ed.), *Design and Development of New Nanocarriers* (pp. 555–594). William Andrew Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813627-0.00015-6>
- Kitaoka, T., Tajima, T., Nagasaki, K., Kikuchi, T., Yamamoto, K., Michigami, T., Okada, S., Fujiwara, I., Kokaji, M., Mochizuki, H., Ogata, T., Tatebayashi, K., Watanabe, A., Yatsuga, S., Kubota, T., y Ozono, K. 2017. Safety and efficacy of treatment with asfotase alfa in patients with hypophosphatasia: Results from a Japanese clinical trial. *Clinical Endocrinology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/cen.13343>
- Koeberl, D. D., Case, L. E., Desai, A., Smith, E. C., Walters, C., Han, S., Thurberg, B. L., Young, S. P., Bali, D., y Kishnani, P. S. 2020. Improved muscle function in a phase I/II clinical trial of albuterol in Pompe disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 129(2), 67–72. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.12.008>
- Kohler, L., Puertollano, R., y Raben, N. 2018. Pompe Disease: From Basic Science to Therapy. In *Neurotherapeutics* (Vol. 15, Issue 4, pp. 928–942). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0655-y>
- Kok, K., Kuo, C., Katzy, R. E., Lelieveld, L. T., Wu, L., Roig-zamboni, V., Marel, G. A. van der, Cod, J. D. C., Sulzenbacher, G., Davies, G. J., Overkleeft, H. S., Aerts, J. M. F. G., y Artola, M. 2022. 1,6-epi-Cyclophellitol Cyclosulfamidate Is a Bona Fide Lysosomal α -Glucosidase Stabilizer for the Treatment of Pompe Disease. *Journal of the American Chemical Society*, 144, 14819–14827. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c05666>
- Lee, E. J., Lee, N. K., y Kim, I.-S. 2016. Bioengineered protein-based nanocage for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 106, 157–171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.03.002>

- Li, Z., Zhao, T., Li, J., Yu, Q., Feng, Y., Xie, Y., y Sun, P. 2022. Nanomedicine Based on Natural Products: Improving Clinical Application Potential. *Journal of Nanomaterials*. <https://doi.org/10.1155/2022/3066613>
- Lim, J.-A., Yi, H., Gao, F., Raben, N., Kishnani, P. S., y Sun, B. 2019. Intravenous Injection of an AAV-PHP.B Vector Encoding Human Acid α -Glucosidase Rescues Both Muscle and CNS Defects in Murine Pompe Disease. *Molecular Therapy - Methods y Clinical Development*, 12, 233–245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.01.006>
- Lucas, R. W., Larson, S. B., y McPherson, A. 2002. The crystallographic structure of brome mosaic virus. *Journal of Molecular Biology*, 317(1), 95–108. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5389>
- Ludwig, C., y Wagner, R. 2007. Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(6), 537–545. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.10.013>
- Macauley, S. L. 2016. Combination Therapies for Lysosomal Storage Diseases: A Complex Answer to a Simple Problem HHS Public Access. In *Pediatr Endocrinol Rev* (Vol. 13, Issue 1).
- Maity, B., Fujita, K., y Ueno, T. 2015. Use of the confined spaces of apo-ferritin and virus capsids as nanoreactors for catalytic reactions. *Current Opinion in Chemical Biology*, 25, 88–97. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2014.12.026>
- María Vasconcelos Queiroz, A., Wysllyas de Freitas Oliveira, J., Jassica Moreno, C., A Guérin, D. M., Sousa Silva, M., y Baxter, V. K. 2021. VLP-Based Vaccines as a Suitable Technology to Target Trypanosomatid Diseases. *MDPI*, 9(220). <https://doi.org/10.3390/vaccines9030220>
- Mateu, M. G. 2013. Assembly, stability and dynamics of virus capsids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 531(1–2), 65–79. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2012.10.015>
- Narayanan, K. B., y Han, S. S. 2017. Icosahedral plant viral nanoparticles - bioinspired synthesis of nanomaterials/nanostructures. *Advances in Colloid and Interface Science*, 248, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.08.005>
- Núñez-Rivera, A., Fournier, P. G. J., Arellano, D. L., Rodríguez-Hernández, A. G., Vázquez-Duhalt, R., y Cadena-Nava, R. D. 2020. Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 372–382. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.28>
- Oudmaijer, E. J. M. 2021. *Stabilized Cowpea chlorotic mottle virus as a platform for targeted enzyme replacement therapy*. Eindhoven University of Technology.
- Pascual Pascual, S. I., Nascimento, A., Fernández Llamazares, C. M., Medrano López, C., Villalobos Pinto, E., Martínez Moreno, M., Ley, M., Manrique Rodríguez, S., y Blasco Alonso, J. 2016. Guía clínica de la enfermedad de Pompe infantil. *Revista de Neurología*, 63(6), 269–279. <https://doi.org/10.33588/rn.6306.2016232>
- Patterson, D. P. 2018. Encapsulation of Active Enzymes within Bacteriophage P22 Virus-Like Particles. In *Protein Scaffolds: Design, Synthesis, and Applications* (Vol. 1798, pp. 11–24).
- Patterson, D. P., Schwarz, B., Waters, R. S., Gedeon, T., y Douglas, T. 2014. Encapsulation of an Enzyme Cascade within the Bacteriophage P22 Virus-Like Particle. *ACS Chem. Biol.*, 9(2), 359–365.

- Pena, L. D. M., Barohn, R. J., Byrne, B. J., Desnuelle, C., Goker-Alpan, O., Ladha, S., Laforêt, P., Mengel, K. E., Pestronk, A., Pouget, J., Schoser, B., Straub, V., Trivedi, J., van Damme, P., Vissing, J., Young, P., Kacena, K., Shafi, R., Thurberg, B. L. y van der Ploeg, A. T. 2019. Safety, tolerability, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and exploratory efficacy of the novel enzyme replacement therapy avalglucosidase alfa (neoGAA) in treatment-naïve and alglucosidase alfa-treated patients with late-onset Pompe disease: A phase 1, o. *Neuromuscular Disorders*, 29(3), 167–186. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.12.004>
- Pérez Sánchez, J. E. 2019. *Cápsides del BMV como nanovehículos de fármacos hidrofóbicos*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 93.
- Piras, G., Montiel-Equihua, C., Chan, Y.-K. A., Wantuch, S., Stuckey, D., Burke, D., Prunty, H., Phadke, R., Chambers, D., Partida-Gaytan, A., Leon-Rico, D., Panchal, N., Whitmore, K., Calero, M., Benedetti, S., Santilli, G., Thrasher, A. J., y Gaspar, H. B. 2020. Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Rescues Clinical Phenotypes in a Murine Model of Pompe Disease. *Molecular Therapy - Methods y Clinical Development*, 18, 558–570. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.07.001>
- Poswar, F., Vairo, F., Burin, M., Michelin-Tirelli, K., Brusius-Facchin, A., Kubaski, F., Desouza, C., Baldo, G., y Giugliani, R. 2019. Lysosomal diseases: Overview on current diagnosis and treatment. *Genetics and Molecular Biology*, 42(1), 165–177. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2018-0159>
- Puzzo, F., Colella, P., Biferi, M. G., Bali, D., Nicole, K., Vidal, P., Collaud, F., Simon-sola, M., Charles, S., Leborgne, C., Meliani, A., Cohen-tannoudji, M., Gjata, B., Sellier, P., Wittenberghe, L. van, Vignaud, A., Boisgerault, F., Barkats, M., Laforet, P. y Mingozzi, F. 2017. Rescue of Pompe disease in mice by AAV-mediated liver delivery of secretable acid α -glucosidase. *Sci Transl Med.*, 9(418), 1–27. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam6375>
- Ramírez Acosta, K. 2020. *Desarrollo de un sistema antimicrobiano basado en nanopartículas tipo virus*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 77.
- Ronzitti, G., Collaud, F., Laforet, P., y Mingozzi, F. 2019. Progress and challenges of gene therapy for Pompe disease. *Annals of Translational Medicine*, 7(13), 287–287. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.04.67>
- Sánchez Sánchez, L., Cadena Nava, R. D., Palomares, L. A., Ruiz García, J., Koay, M. S. T., Cornelissen, J., y Vázquez Duhalt, R. 2014. Chemotherapy pro-drug activation by biocatalytic virus-like nanoparticles containing cytochrome P450. *Enzyme and Microbial Technology*, 60, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.04.003>
- Sánchez Sánchez, L., Tapia Moreno, A., Juárez Moreno, K., Patterson, D. P., Cadena Nava, R. D., Douglas, T., y Vázquez Duhalt, R. 2015. Design of a VLP-nanovehicle for CYP450 enzymatic activity delivery. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(66), 11. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0127-z>
- Sánchez-Sánchez, L., Cadena-Nava, R. D., Palomares, L. A., Ruiz-García, J., Koay, M. S. T., Cornelissen, J. J. M. T., y Vázquez-Duhalt, R. 2014. Chemotherapy pro-drug activation by biocatalytic virus-like nanoparticles containing cytochrome P450. *Enzyme and Microbial Technology*, 60, 24–31. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2014.04.003>
- Schwarz, B., Uchida, M., y Douglas, T. 2017. Biomedical and Catalytic Opportunities of Virus-Like Particles in Nanotechnology. *Advances in Virus Research*, 97, 1–60. <https://doi.org/10.1016/BS.AIVIR.2016.09.002>

- Sherman, M. B., Guenther, R. H., Tama, F., Sit, T. L., Brooks, C. L., Mikhailov, A. M., Orlova, E. v., Baker, T. S., y Lommel, S. A. 2006. Removal of Divalent Cations Induces Structural Transitions in Red Clover Necrotic Mosaic Virus, Revealing a Potential Mechanism for RNA Release. *Journal of Virology*, 80(21), 10395–10406. <https://doi.org/10.1128/jvi.01137-06>
- Siro, M.-R., y Lovgren, T. 1978. On the properties of α -glucosidase and the binding of glucose to the enzyme. *Acta Chemica Scandinavica*, 32, 447–451.
- Smith, D. M., Simon, J. K., y Baker, J. R. 2013. Applications of nanotechnology for immunology. *Nature Reviews Immunology*, 13(8), 592–605. <https://doi.org/10.1038/nri3488>
- Stevens, D. 2022. Pompe Disease: a Clinical, Diagnostic, and Therapeutic Overview. *Current Treatment Options in Neurology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s11940-022-00736-1>
- Stoll, V. S., y Blanchard, J. S. 1990. Buffers: Principles and Practice. *Methods in Enzymology*, 182(C), 24–38. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82006-N](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82006-N)
- Strugała, A., Jagielski, J., Kamel, K., Nowaczyk, G., Radom, M., Figlerowicz, M., y Urbanowicz, A. 2021. Virus-like particles produced using the brome mosaic virus recombinant capsid protein expressed in a bacterial system. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms22063098>
- Strugała, A., Kręcisz, M., Rybka, J. D., Urbanowicz, A., Szpotkowski, K., Bierwagen, P., Figlerowicz, M., Kozak, M., Böttcher, C., y Giersig, M. 2017. Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method. *Journal of Chromatography B*, 1068–1069, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.10.022>
- Sun, J., DuFort, C., Daniel, M. C., Murali, A., Chen, C., Gopinath, K., Stein, B., De, M., Rotello, V. M., Holzenburg, A., Kao, C. C., y Dragnea, B. 2007. Core-controlled polymorphism in virus-like particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(4), 1354–1359. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610542104>
- Tapia-Moreno, A., Juárez-Moreno, K., González-Davis, O., Cadena-Nava, R. D., y Vázquez-Duhalt, R. 2017. Biocatalytic virus capsid as nanovehicle for enzymatic activation of Tamoxifen in tumor cells. *Biotechnology Journal*, 12(6). <https://doi.org/10.1002/biot.201600706>
- Tarnopolsky, M., Katzberg, H., Petrof, B. J., Sirrs, S., Sarnat, H. B., Myers, K., Dupré, N., Dodig, D., Genge, A., Venance, S. L., Korngut, L., Raiman, J., y Khan, A. 2016. Pompe Disease: Diagnosis and Management. Evidence-Based Guidelines from a Canadian Expert Panel. *Can J Neurol Sci*, 43, 472–485. <https://doi.org/10.1017/cjn.2016.37>
- Tejeda-Rodríguez, J. A., Núñez, A., Soto, F., García-Gradilla, V., Cadena-Nava, R., Wang, J., y Vázquez-Duhalt, R. 2019. Cover Feature: Virus-Based Nanomotors for Cargo Delivery (ChemNanoMat 2/2019). *ChemNanoMat*, 5(2). <https://doi.org/10.1002/cnma.201800483>
- Tejeda-Rodríguez, J. A., Núñez, A., Soto, F., García-Gradilla, V., Cadena-Nava, R., Wang, J., y Vázquez-Duhalt, R. 2019. Virus-Based Nanomotors for Cargo Delivery. *ChemNanoMat*, 5(2). <https://doi.org/10.1002/cnma.201800403>

- Tekoah, Y., Tzaban, S., Kizhner, T., Hainrichson, M., Gantman, A., Golembo, M., Aviezer, D., y Shaaltiel, Y. 2013. Glycosylation and functionality of recombinant β -glucocerebrosidase from various production systems. *Bioscience Reports*, 33(5), 771–781. <https://doi.org/10.1042/BSR20130081>
- Teunissen, E. A., de Raad, M., y Mastrobattista, E. 2013. Production and biomedical applications of virus-like particles derived from polyomaviruses. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 172(1), 305–321. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2013.08.026>
- Unnisa, Z., Yoon, J. K., Schindler, J. W., Mason, C., y van Til, N. P. 2022. Gene Therapy Developments for Pompe Disease. *Biomedicines*, 10(2), 1–26. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020302>
- Villagrana-Escareño, M. v., Reynaga-Hernández, E., Galicia-Cruz, O. G., Durán-Meza, A. L., de La Cruz-González, V., Hernández-Carballo, C. Y., y Ruíz-García, J. 2019. VLPs Derived from the CCMV Plant Virus Can Directly Transfect and Deliver Heterologous Genes for Translation into Mammalian Cells. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4630891>
- Yamamoto, K., Nakayama, A., Yamamoto, Y., y Tabata, S. 2004. Val216 decides the substrate specificity of α -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 271(16), 3414–3420. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04276.x>
- Zhang, H., Wu, Z. Y., Yang, Y. Y., Yang, F. Q., y Li, S. P. 2019. Recent applications of immobilized biomaterials in herbal analysis. *Journal of Chromatography A*, 1603, 216–230. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2019.06.059>
- Zhu, W., Chen, Z., Pan, Y., Dai, R., Wu, Y., Zhuang, Z., Wang, D., Peng, Q., Chen, C., y Li, Y. 2019. Functionalization of Hollow Nanomaterials for Catalytic Applications: Nanoreactor Construction. *Advanced Materials*, 31(38), 1–30. <https://doi.org/10.1002/adma.201800426>