

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



Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida

**Estabilización de cápsides virales para su potencial uso
como bionanorreactores**

Tesis

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

Presenta:

Olga Elena Valdes Resendiz

Ensenada, Baja California, México
2015

Tesis defendida por

Olga Elena Valdes Resendiz

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Director del Comité

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Dra. Katrin Quester

Dr. Víctor Ruíz Cortés



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Director de Estudios de Posgrado

Olga Elena Valdes Resendiz © 2015

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

Resumen de la tesis que presenta **Olga Elena Valdes Resendiz** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Estabilización de cápsides virales para su potencial uso como bionanorreactores

Resumen aprobado por:

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Director de tesis

Los virus presentan ciertas características que pueden ser aprovechadas para su uso como nano-contenedores. Así, los virus de principal interés para ser utilizados de esta manera son aquellos que infectan bacterias (Bacteriófagos) y los virus de plantas como el virus del moteado clorótico del caupí (CCMV). Y dado que su potencial utilización siempre va enfocada al tratamiento de enfermedades en humanos, en donde las condiciones fisiológicas pueden no ser permisibles para el virus nativo, promoviendo su desensamble y por lo tanto desprotección de su contenido, en el presente trabajo se realizó la estabilización de cápsides y partículas tipo virus (VLP) mediante el entrecruzado de las proteínas para su eficiente uso como bionanorreactores.

En este proyecto como modelo de estudio se llevó a cabo el entrecruzado de las proteínas que forman las cápside y partículas tipo virus (VLPs) del CCMV. El entrecruzado se realizó mediante glutaraldehído (GA) bajo diferentes condiciones, el cual es utilizado comúnmente para el acoplamiento de aminoácidos y en la síntesis artificial de proteínas. Posteriormente se estudió la estabilidad de las cápsides entrecruzadas a diferentes condiciones fisicoquímicas como pH, fuerza iónica y temperatura, confirmando la integridad de las mismas mediante ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA), microscopía electrónica de transmisión (TEM). De los ensayos realizados se determinó que 50 mM es la concentración adecuada de glutaraldehído para la estabilización de las cápsides virales. Estos resultados podrían extenderse a otros tipos de virus y VLPs para su potencial uso como bionanorreactores.

Palabras clave: CCMV (Virus del moteado clorótico del caupí), VLPs (Partículas tipo virus), GA (glutaraldehído), EMSA (ensayos de retardo de movilidad electroforética), TEM (microscopio electrónico de transmisión), entrecruzado.

Abstract of the thesis presented by **Olga Elena Valdes Resendiz** as a partial requirement to obtain the Master degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology.

Viral capsids stabilization for its potential use as bionanoreactors

Abstract approved by:

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Thesis Director

The viruses exhibit several properties that can be useful for their application as nanocontainers. For this purposes, the most interesting viruses are those that infect bacteria (bacteriophages) and those infecting plants, like the Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV). Their potential use has been mainly focused in the treatment of human diseases in, where the physiologic conditions may not be adequate for the native virus, inducing their disassembly, and then leaving its cargo unprotected. In the present work we studied the stabilization of viral capsids or virus-like particles (VLPs) by means of cross-linking of the capsid proteins, to improve their efficient use as bionanoreactors.

In this work, CCMV derived VLPs were cross-linked with different glutaraldehyde (GA) concentrations and under different reaction conditions. Glutaraldehyde is commonly used as a protein linker and for the artificial synthesis of proteins. The stability of the cross-linked capsids was studied under different physicochemical conditions as pH, ionic strength and temperature. The integrity of these capsids was confirmed by means of electrophoretic mobility assay (EMSA) and transmission electron microscopy (TEM). Our results showed that a treatment with 50 mM of glutaraldehyde seems to be the best for the virus capsid stabilization. These stabilization strategy could be applied to other viruses for their potential use as bionanoreactors.

Keywords: CCMV (Cowpea Chlorotic Mottle Virus), VLPs (Virus-like particles), GA (glutaraldehyde), EMSA (electrophoretic mobility shift assay), TEM (transmission electron microscopy), cross-linking.

Dedicatoria

A mis papás Juan Ramón y María Elena

Y a Niero

“Live long and prosper”

Agradecimientos

- A mi asesor de tesis, Dr. Ruben Darío Cadena, por haberme introducido y guiado en mi investigación
- A nuestra técnico de laboratorio, Dra. Katrin Quester, por haberme brindado sus consejos y ayuda
- A mis amigos Paty, Pau, Kee, Moni, Aldo, Tabi, Alex, Javier, Pancho, y todos en el laboratorio que por su compañerismo y amistad han hecho de mi maestría un camino divertido
- A mis papas María Elena y Juan Ramón, por todo su apoyo
- A Niero
- Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, por el apoyo económico otorgado para concluir mi tesis
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca (542861) otorgada durante mis estudios de maestría.
- A las instituciones que otorgaron los proyectos de investigación UNAM-DGAPA-PAPIIT (IA100314) y CB-SEP-CONACYT (239878) al Dr. Rubén D. Cadena Nava, por el financiamiento proporcionado para realizar mi tesis
- Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM, por haberme adoptado y otorgado los medios para realizar mi trabajo de investigación

Tabla de figuras

Figura 1. Reconstrucción de la cápside del CCMV por medio de cryo-TEM	2
Figura 2. Reconstrucción del Bacteriófago P22.....	4
Figura 3. Estructura química representativa del glutaraldehído (C ₅ H ₈ O ₂).....	5
Figura 4. Plantas de caupí después de la siembra.....	9
Figura 5. Plantas después de aproximadamente 15 días de haberse sembrado.....	9
Figura 6. Hojas de caupi antes y después de la infección.....	10
Figura 7. Proceso de molienda.....	11
Figura 8. Filtrado mezclado con cloroformo.....	12
Figura 9. Separación de las partículas virales mediante colchón de sacarosa.....	12
Figura 10. Mapa génico del plásmido de la proteína de cápside del CCMV en <i>E. coli</i> ..	16
Figura 11. Gradiente de sacarosa.....	25
Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida de proteína de cápside del CCMV...	27
Figura 13. Micrografías electrónicas de transmisión de cápsides (vacías).....	27
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de cápsides expuestas a 42°C y entrecruzadas mediante el protocolo 1.....	28
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de cápsides expuestas a 42°C y entrecruzadas mediante el protocolo 2.....	29
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de cápsides expuestas a 42, 50 y 60°C y entrecruzadas mediante el protocolo 2.....	30
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de cápsides expuestas a 60°C y entrecruzadas mediante el protocolo 2.....	31
Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de cápsides expuestas a 42°C y entrecruzadas mediante el protocolo 3.....	32

Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa de cápsides expuestas a 60°C y entrecruzadas mediante el protocolo 3.....	33
Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa de cápsides expuestas a 90°C y entrecruzadas mediante el protocolo 3.....	34
Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa de cápsides expuestas a 60°C y entrecruzadas mediante el protocolo 3 y 4 (TL y TC respectivamente).....	35
Figura 22. Micrografías electrónicas de transmisión de cápsides del CCMV entrecruzadas por el método TL (Protocolo 3) y por el método TC (Protocolo 4).....	35
Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa de muestras entrecruzadas y expuestas a diferentes pHs: 4.5, 6 y 7.....	36
Figura 24 Electroforesis en gel de agarosa de CCMV entrecruzado con el protocolo 5 y expuesto a 70°C.....	37
Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa de CCMV entrecruzado con el protocolo 5 y expuesto a 75°C.....	38
Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa de CCMV entrecruzado con el protocolo 5 y expuesto a pH 7.....	38
Figura 27. Electroforesis en geles de agarosa de CCMV entrecruzado con el protocolo 5 y 6, y expuestos a pH 7.5.....	39
Figura 28. Electroforesis en geles de agarosa de CCMV entrecruzado con el protocolo 5 y 6, y expuestos a pH 8.....	40
Figura 29. Electroforesis en geles de agarosa de CCMV entrecruzado con el protocolo 5, y expuestos a pH 9.....	40
Figura 30. Electroforesis en geles de agarosa de CCMV entrecruzado con el protocolo 5 y 6, y expuestos a pH 7.5 con 0.5 y 1M de cloruro de sodio (NaCl).....	41
Figura 31. Micrografías electrónicas de partículas tipo virus (VLPs) con L-Asparaginasa como cargo.....	42
Figura 32. EMSA y micrografías electrónicas de transmisión de CCMV nativo, NLS, NLS CPT y partículas con NLS y NLS CPT.....	43

Figura 33. Micrografías electrónicas de transmisión de partículas entrecruzadas de NLS
CPT..... **43**

Figura 34. Resumen de resultados más relevantes.....**45**

Tabla de contenido

Resumen español.....	ii
Resumen inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	vi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	5
1.2 Justificación.....	6
1.3 Hipótesis	7
1.4 Objetivo general	7
1.4.1 Objetivos particulares	7
Capítulo 2. Desarrollo experimental	8
2.1. Producción de CCMV en su huésped natural	8
2.1.1. Inoculación de plantas para la producción de CCMV	8
2.2 Purificación del virus	10
2.2.1 Molienda de la hoja.....	10
2.2.2 Separación de los componentes celulares.	11
2.2.3 Colchón de sacarosa.	12
2.2.4 Separación de los agregados de proteínas y partículas virales.....	13
2.2.5 Remoción de sacarosa.	13
2.3 Expresión de la proteína de la cápside del CCMV en <i>E. coli</i>	15
2.3.1 Células competentes	15
2.3.2 Transformación de células competentes	15
2.3.3 Inducción de células transformadas.....	16
2.3.4 Purificación de la proteína de la cápside de CCMV	17
2.4 Encapsidación de liposomas con camptotesina como cargo	18
2.5 Entrecruzado de cápside del CCMV	19
2.6 Estabilidad de las cápsides entrecruzadas a diferentes temperaturas.....	21
2.7 Estabilidad de las cápsides entrecruzadas a diferentes rangos de pH	21
2.8 Estabilidad de las cápsides entrecruzadas a diferentes rangos de fuerza iónica..	22

2.9 Gel desnaturizante SDS-PAGE.....	22
2.9.1 Preparación del gel concentrador	23
2.9.2 Preparación del gel separador (15%)	23
2.10 Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA).....	23
2.11 Microscopía electrónica de transmisión	24
Capítulo 3. Resultados.....	25
3.1 Purificación de CCMV	25
3.2 Expresión de la proteína de cápside del CCMV.....	26
3.3 Estabilidad de las cápsides entrecruzadas a diferentes temperaturas.....	28
3.4 Estabilidad de las cápsides entrecruzadas a diferentes rangos de pH	38
3.5 Estabilidad de las cápsides entrecruzadas a diferentes rangos de fuerza iónica..	41
3.6 Entrecruzado de partículas tipo virus con L-Asparaginasa como cargo.....	42
3.7 Encapsidación y entrecruzado de partículas conteniendo liposomas con camptotesina como cargo	43
3.8 Resumen de resultados más relevantes	44
Capítulo 4. Discusión.....	46
Capítulo 5. Conclusiones.....	51
Capítulo 6. Perspectivas	53
Glosario.....	54
Lista de referencias bibliográficas	55

Capítulo 1. Introducción

Los virus son entidades submicroscópicas infecciosas que en el caso más simple constan solamente de material genético protegido por una capa de proteínas llamada cápside, los cuales se replican utilizando la maquinaria metabólica de la célula huésped. Los virus pueden ser encontrados en todos los reinos de la vida, desde bacterias, hasta protozoarios, plantas, hongos, animales y humanos. Las proteínas que constituyen la cápside de algunos virus poseen la capacidad de autoensamblarse en cápsides idénticas al virus nativo, permitiéndolo de esta manera la síntesis de novedosas nanoestructuras bien definidas, con características similares a los virus del cual provienen. Estas nanoestructuras derivadas de los virus que también son llamadas partículas tipo virus (VLPs, por sus siglas en inglés) son formadas a partir de las proteínas de la cápside de un virus y pueden contener en su interior alguna molécula de interés o estar vacías; asimismo, éstas pueden ser aprovechadas por ejemplo en la industria farmacéutica para el desarrollo de novedosos vehículos para la entrega de fármacos.

Las cápsides de las VLPs, con geometría icosaédrica, tienen un amplio rango de diámetros internos que pueden ser desde menos de 20 nm hasta más de 1000 nm, oscilando su tamaño en la mayoría de los casos entre los 20 - 300 nanómetros. Esto permite el confinamiento de un amplio rango de materiales en su interior. Aunado a esto, las cápsides virales poseen poros que permiten la difusión de moléculas pequeñas del exterior hacia el interior y viceversa. Esta característica permite su uso como bionanorreactores, es decir, como estructuras de protección para reacciones catalíticas cuando se tienen enzimas como carga, de tal manera que por medio de poros se hace posible la entrada de sustrato y la salida del producto, y al mismo tiempo confiere protección a la enzima cargo de posibles agresiones del medio en el que se encuentra. Para esto, son de principal interés los virus no envueltos, es decir, aquellos que se encuentran conformados solo por una cápside de proteínas y material genético como lo son el bacteriófago P22 y el virus del moteado clorótico del frijol caupí (CCMV, por sus siglas en inglés).

Éstos dos virus han despertado gran interés en el área de biotecnología dado la diversidad de aplicaciones potenciales de su cápside proteica, que van desde su uso como bionanorreactores mediante el confinamiento de enzimas dentro de las cápsides (Patterson, Prevelige y Douglas, 2012) hasta su uso como nanovehículos para el envío, liberación y expresión de genes en células de mamíferos (Azizgolshani et al., 2013).

El CCMV (Fig. 1) es un virus sencillo conformado de ARN de sentido positivo protegido por una cápside de 28 nm de diámetro formada de 180 subunidades estructurales idénticas. El CCMV infecta a plantas (principalmente a especies del género *Vigna*) causando marcas o manchas amarillas en las hojas. Asimismo, el alto rendimiento de expresión en plantas (~0.2 – 0.4 mg por gramo de hoja) ha permitido su estudio desde hace 50 años a partir de su aislamiento por Bancroft en los años sesenta.

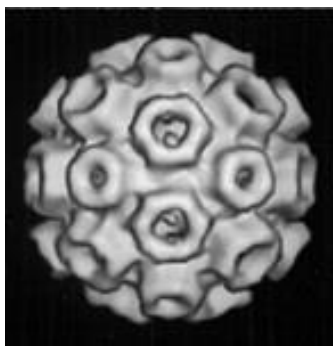


Figura 1. Reconstrucción de cápside del CCMV por medio de cryo-TEM (Fox, et al. 1998)

Estos estudios han revelado propiedades especiales del CCMV, particularmente una de gran interés biotecnológico, como la capacidad de la proteína de su cápside de autoensamblarse en ausencia de su ARN (Fig. 1) bajo ciertas condiciones de pH y fuerza iónica (Bancroft, Hiebert, and Bracker 1969), y entonces permitiendo el empaquetamiento de distintos cargos. Además, estudios *in vivo* han mostrado una amplia distribución del CCMV en tejidos y su rápida remoción en mamíferos (Kaiser et al., 2007). En el caso de, estudios realizados por Minten y colaboradores (2011), con VLPs derivadas del CCMV y contenido una enzima, revelaron que es posible

encapsidar más de una enzima por cápside, efecto que puede incrementar la actividad enzimática del bionanoreactor. Asimismo, en el trabajo de Sánchez-Sánchez et al. (2014) realizado sobre la activación de pro-fármacos mediante enzimas encapsidadas en VLPs derivadas del CCMV y en el realizado por Comellas-Aragonés et al. (2007) sobre la encapsidación de una enzima peroxidasa, demostraron que la encapsidación de enzimas no interrumpe su actividad catalítica y permite el paso del sustrato hacia el interior de la cavidad de la cápside, su transformación y difusión del producto hacia afuera de la misma, demostrando el potencial de las cápsides virales como transportadores de actividad catalítica

Otro de los virus estudiados para la producción de nanocontenedores es el P22. Este es un bacteriófago constituido por ADN de doble hebra y de aproximadamente 63 nm de diámetro, y a diferencia de los virus mencionados anteriormente presenta un complicado proceso de ensamblaje ya que *in vivo* requiere de la co-polimerización de 415 proteínas de la cápside, de 60-300 proteínas de andamiaje para el ensamblaje de la cápside.

Además, requiere de un complejo de proteínas que forma el portal para el empaquetamiento de ADN y finalmente las proteínas de expulsión para la producción de una estructura precursora llamada "procápside" (Fig. 2). Pero a pesar de presentar un complejo sistema de ensamblaje, la utilización de este virus para el empaquetamiento de cargos no se ha visto afectada, como lo demuestran O'Neil et al. (2013) que utilizando el P22 para el encapsidamiento de una enzima (fosfotriesterasa), probaron su protección y actividad enzimática después de su exposición a altas temperaturas y proteasas. También recientemente, Sanchez-Sánchez et al. (2015) demostraron el encapsulamiento de un citocromo P450 en donde se logró encapsular 110 moléculas de enzima en cada capsida de P22.

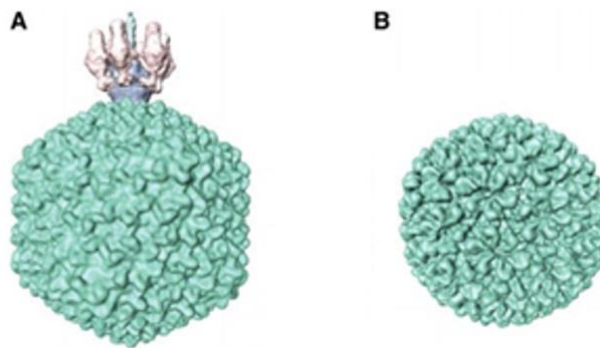


Figura 2. Reconstrucción del Bacteriófago P22. A) Partícula infecciosa; B) Procápside (Chang, Weigele, and King 2006)

El principal problema del uso de una cápside viral como un bionanorreactor es su estabilidad en las condiciones que se desea utilizar. En este trabajo se considera que el entrecruzado de las proteínas que conforman las cápsides de los virus, puede permitir el uso de nanoestructuras no sólo como vehículos o nanorreactores, sino como protectores de su cargo manteniendo su integridad contra condiciones desfavorables para la cápside nativa.

Una de las moléculas utilizadas comúnmente para el entrecruzado de proteínas, es el glutaraldehído (Fig. 3, con fórmula química $C_5H_8O_2$), el cual ha sido utilizado desde hace más 50 años en un amplio número de aplicaciones, que van desde fijador de tejidos para microscopía electrónica (Sabatini, Bensch y Barnett, 1963), agente entrecruzante para la polimerización de proteínas (Payne, 1973) o hasta desinfectante de instrumentos quirúrgicos en hospitales (Smith y Wang, 2006). Sin embargo, a pesar de ser el fijativo de preferencia, es difícil obtener información sobre el estado estructural químico que presenta al momento de la reacción. Por ejemplo, en algunos estudios realizados sobre el glutaraldehído se ha encontrado que actúa con hasta 13 diferentes estructuras químicas, dependiendo de las condiciones de la solución en la que se encuentre, así como su reacción con diversos grupos funcionales de proteínas como grupos amino, tiol, fenol e imidazol, lo que hace difícil determinar en qué estado se encuentra, la manera en que realiza el entrecruzado y cuáles aminoácidos específicamente son los que se encuentran afectados (Migneault et al., 2004).

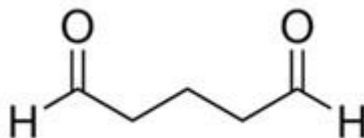


Figura 3. Estructura química representativa del glutaraldehído (C₅H₈O₂). Imagen tomada de www.sigmaaldrich.com.

A pesar de ser una molécula dinámica, se ha seleccionado este reactivo para realizar las reacciones de entrecruzado en el presente trabajo debido a su relativo bajo costo y baja toxicidad en comparación con otras moléculas (como el DCC), facilidad de uso y su función en un rango de pH desde 5 a 9 (Migneault et al. 2004).

1.1 Antecedentes

Dado que en ocasiones las terapias o tratamientos médicos requieren de la administración de fármacos vía fluidos vitales como la sangre, que presenta un pH de entre 7.3 y 7.4 las cuales son condiciones desfavorables para la integridad de algunos los virus como el CCMV (rango de estabilidad de pH 3 – pH 6, Bancroft et al. 1969), por lo tanto, la estabilización de VLPs representa un paso imprescindible para su utilización en el tratamiento de enfermedades en donde se requiera el uso de bionanorreactores.

El entrecruzado de las subunidades proteicas de la cápside del CCMV mediante glutaraldehído fue utilizado en la estabilización de cápsides funcionalizadas con maleimida, para su estudio mediante espectroscopía de resonancia de electrones, en donde encontraron que los viriones estabilizados mediante glutaraldehído mantienen su integridad en condiciones de desensamble del virus (Vriend et al., 1984). Asimismo, estudios realizados por Ng et al., (Ng, Liu y Perry, 2000) determinaron que una concentración de glutaraldehído de 5 μ M es capaz de mantener la estabilidad de mutantes del virus del mosaico del pepino (CMV) cuando es expuesto a condiciones desnaturizantes (hasta 7 molar de urea). Esta estabilización se realizó colocando la concentración de GA con el virus y dializando por 24 horas en amortiguador de borato (borato 5 mM, pH 0.9 y EDTA 0.5 mM) conteniendo 5 μ M de glutaraldehído y realizando

otras tres diálisis para retirar el exceso de glutaraldehído. La reacción se detuvo con glicina la cual se removió posteriormente.

Por otro lado, estudios han reportado que VLPs formadas a partir de la cápside de CCMV no se mantienen íntegras dentro de una célula de mamífero, dejando disponible su cargo dentro de la misma (Azizgolshani et al., 2013), fenómeno indeseable en la producción de VLPs para su utilización como bionanorreactores.

1.2 Justificación

Diferentes grupos de investigación han mostrado el potencial de las cápsides virales para su uso como bionanorreactores, sin embargo uno de los problemas fundamentales es su estabilidad en las condiciones que se desean utilizar, y que pueden ser muy desfavorables ocasionando el desensamble de la cápside. Además, actualmente en el laboratorio del Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN) de la UNAM, se están realizando investigaciones para la utilización de cápsides virales como bionanorreactores para el tratamiento de diversas enfermedades, entre éstas se encuentra la encapsulación de L-Asparaginasa en VLPs de CCMV para el tratamiento de leucemia linfocítica aguda (LLA), y la funcionalización y direccionamiento de VLPs del bacteriófago P22 con actividad catalítica citocromo P450 (CYP P450) para la activación de pro-fármacos en el tratamiento de cáncer de mama.

Para resolver este problema, se ha propuesto en el presente estudio la utilización de agentes entrecruzantes de proteínas (moléculas para la unión de una proteína con otra) como el glutaraldehído, para la estabilización a través de la unión covalente de las subunidades proteicas que componen las cápsides del CCMV, de VLPs formadas a partir de la proteína de cápside del CCMV, y de VLPs de CCMV con L-Asparaginasa como cargo, para promover su estabilización, integridad y actividad catalítica en condiciones fisicoquímicas no permisibles para el virus nativo. Además, incrementar el tiempo de vida de la enzima encapsulada, disminuir su posible toxicidad y protegerla de proteasas o cualquier otro agente que comprometa su actividad catalítica.

1.3 Hipótesis

Las cápsides virales pueden ser estabilizadas por medio de agentes entrecruzantes de proteínas, y serán capaces de funcionar como bionanorreactores manteniendo su actividad catalítica en condiciones no favorables para el virus nativo, usando como modelo al CCMV y como agente entrecruzante al glutaraldehído

1.4 Objetivo general

Estabilizar las cápsides y VLPs derivadas del CCMV mediante el entrecruzado con glutaraldehído, y estudiar su estabilidad, integridad y funcionalidad en diferentes condiciones fisicoquímicas (pH, fuerza iónica, temperatura).

1.4.1 Objetivos particulares

Entrecruzar las subunidades proteicas de las cápsides del CCMV con glutaraldehído a diferentes concentraciones.

- Estudiar la estabilidad de las cápsides entrecruzadas en diferentes condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) y mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- Establecer un protocolo para el entrecruzado de cápsides virales.
- Estabilizar VLPs derivadas del CCMV por medio del entrecruzado con glutaraldehído.

Capítulo 2. Desarrollo experimental

En este capítulo se describen los procedimientos utilizados durante la realización del presente trabajo, como la producción de CCMV, su purificación, reacciones de entrecruzado y su exposición a diferentes condiciones fisicoquímicas.

2.1. Producción de CCMV en su huésped natural

2.1.1. Inoculación de plantas para la producción de CCMV

Para obtener CCMV silvestre, se realizó la amplificación del virión en su huésped natural *Vigna unguiculata* (frijol caupí, Cowpea California Blackeye No. 5), adquirido de la compañía Burpee, USA. La siembra se llevó a cabo en el invernadero del Departamento de Fitopatología en las instalaciones del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), utilizando tierra para invernaderos enriquecida con fertilizantes. Se sembraron a una profundidad aproximada de 2.5 cm y se regaron cada dos días (Fig. 4). A los 6 días de crecimiento (Fig. 4 B) las plantas fueron traspasadas a macetas más grandes, colocando 5 plantas por maceta (Fig. 4 C).

La inoculación de las plantas se realizó a las dos semanas de crecimiento, cuando la segunda generación de hojas comenzara a surgir (Fig. 5). Para facilitar la infección, se realizaron ligeras heridas en las hojas utilizando circuitos integrados (Fig. 5 A).



Figura 4. Plantas de caupí. A) 4 días después de haberse sembrado. Tamaño aproximado 6 cm de largo; hojas aproximadamente 3 cm de largo. B) Plantas después de 6 días de plantación, tamaño aproximado 6 cm de largo; hojas 4 cm de largo. C) Plantas trasplantadas, 5 por maceta.

Enseguida, con una micropipeta a cada hoja se le colocó una gota de 10 μL de CCMV a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y se esparció (utilizando guantes de látex) por las heridas causadas en la hoja.

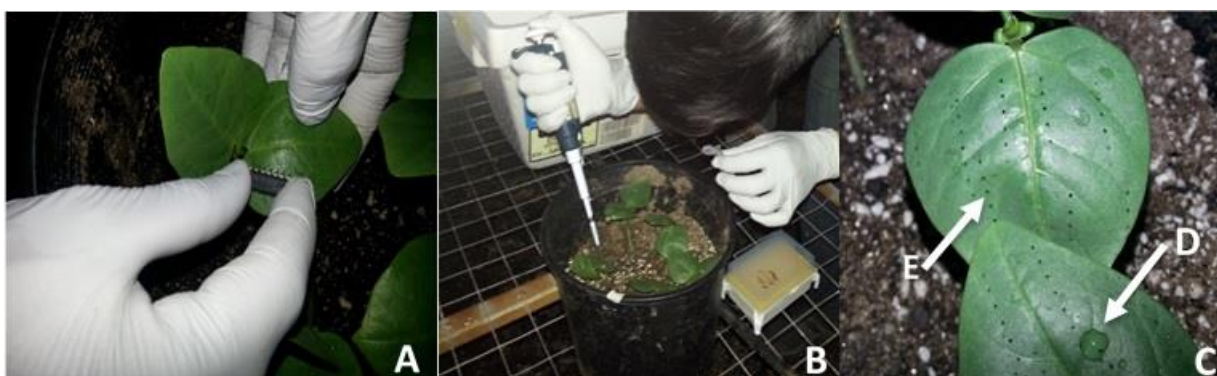


Figura 5. Plantas después de aproximadamente 15 días de haberse sembrado. A) Ligera abrasión de las hojas mediante circuitos integrados. B) Inoculación de hojas de caupí con CCMV. C) Hojas ligeramente dañadas e inoculación con CCMV. D) Gota de CCMV (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). E) Heridas en las hojas primarias para su posterior inoculación con el virus.

2.1.2 Cosecha de las hojas infectadas

Después de aproximadamente 2 semanas de inoculación, las hojas comenzaron a presentar los síntomas de la infección viral, que consisten en clorosis (manchas amarillas, Fig. 6) en partes o en toda la hoja. Las hojas fueron cortadas sin el tallo y almacenadas a -80°C .

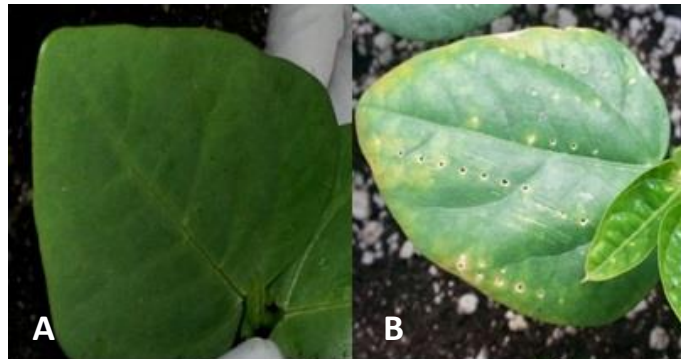


Figura 6. Hojas de caupí antes y después de la infección. A) Hojas con dos semanas de crecimiento, sin infección. B) Hojas después de 2 semanas de inoculación, presentando síntomas de la infección viral (clorosis).

2.2 Purificación del virus

La metodología de extracción utilizada en el presente proyecto fue tomada del protocolo desarrollado por Cadena-Nava y Comas-García (2009) para la purificación del CCMV, con algunas modificaciones, y se describe a continuación:

2.2.1 Molienda de la hoja.

El objetivo de este punto es liberar el virus mediante lisis de las células vegetales con la ayuda de arena acidificada y esterilizada para maximizar la cantidad de virus obtenido.

Se tomaron las hojas infectadas que se almacenaron a -80°C y se colocaron en un mortero de cerámica junto con amortiguador de extracción de virus (acetato de sodio 0.5 M y acetato de magnesio 0.08 M, pH 4.5) con 1% (v/v) de β -mercaptoetanol y arena de mar acidificada. El β -mercaptoetanol ayuda a reducir los enlaces disulfuro de las

células vegetales incrementando la recuperación del virus. La molienda de la hoja se llevó a cabo dentro de una campana de extracción (Fig. 6).

De la pasta obtenida se filtraron 160 mL utilizando gasa fina (Fig. 7 B) de aproximadamente 20x20 cm. El material sólido en la estopilla se regresó al mortero con el resto de la solución, y se repitió el proceso.

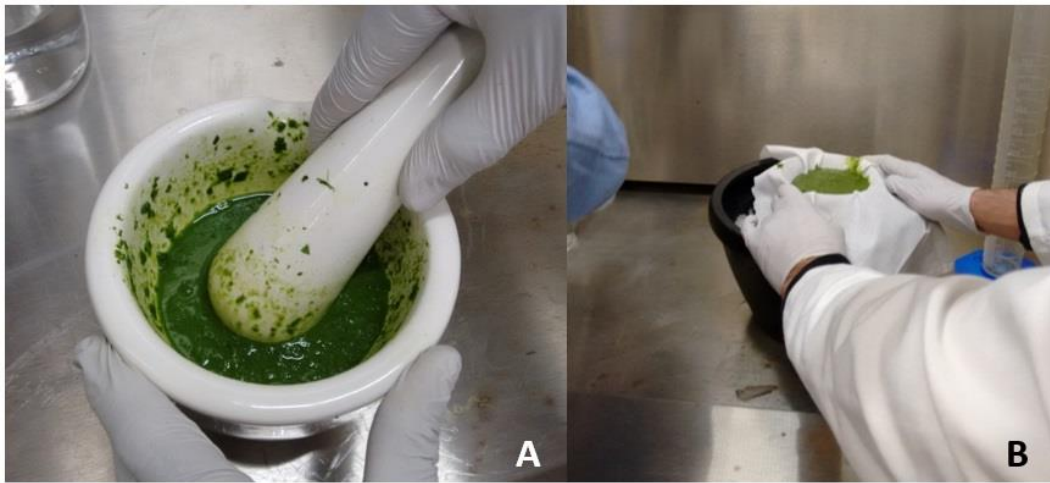


Figura 7. A) Se muestra el proceso de la molienda de hoja utilizando arena de mar acidificada en un mortero. B) Filtrado de la solución utilizando estopilla (gasa fina).

2.2.2 Separación de los componentes celulares.

En esta etapa se utiliza cloroformo para la separación de componentes celulares durante la centrifugación.

El filtrado obtenido se vertió en un vaso de precipitado de 1L y se les colocó un volumen igual de cloroformo, manteniéndose en agitación constante durante 4 horas (Fig. 8 A). Esta solución se vació inmediatamente en tubos de teflón para centrífuga, los cuales son resistentes al cloroformo (Fig. 8 B), y fueron centrifugados a 12,000 x g (10,000 rpm), a 4°C durante 15 minutos en una centrífuga marca Beckman modelo J2-21. Después de centrifugar, la fase superior fue colectada y se transfirió a un vaso de precipitado, manteniéndose en agitación lenta durante 2 horas a 4°C para evaporar el resto de cloroformo.

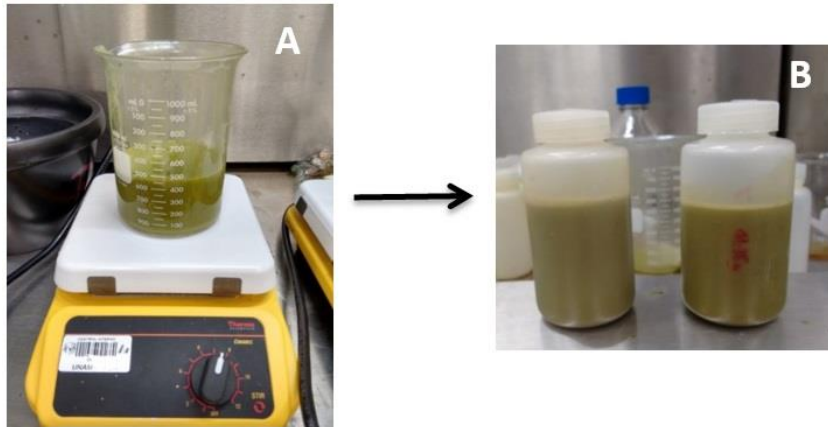


Figura 8. Filtrado mezclado con cloroformo. A) En agitación; B) En tubos de teflón para centrifuga.

2.2.3 Colchón de sacarosa.

El colchón de sacarosa al 10% se utiliza para separar moléculas con densidad menor al virus por ultra-centrifugación. La solución resultante del paso anterior se colocó en tubos para ultracentrífuga de 38.5 mL marca Beckman Coulter, utilizando una pipeta Pasteur de 20 cm de largo, se colocó un volumen de 5 mL de sacarosa al 10% (w/v) en el fondo del tubo, distinguiéndose fácilmente ambas fases como se muestra en la Figura 9. Posteriormente los tubos se balancearon y se colocaron en el rotor de ángulo variable SW-32Ti, y se centrifugaron a 30,000 rpm (163,809.36 x g) durante 130 minutos a 4 °C en una ultracentrífuga marca Beckman modelo Optima XPN-100.

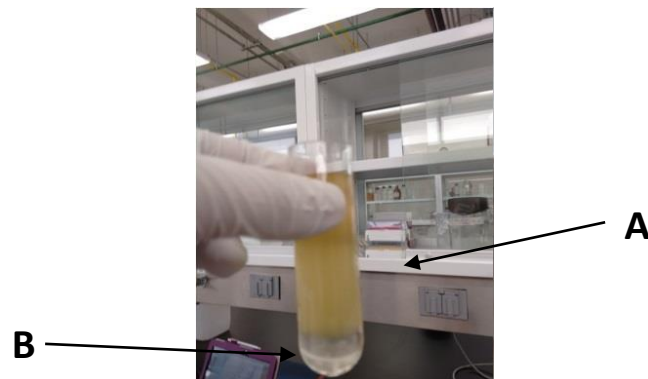


Figura 9. Separación de las partículas virales mediante colchón de sacarosa. A) Muestra (particulares virales CCMV y otros restos celulares); B) Colchón de sacarosa

Al finalizar la ultracentrifugación, y se recuperara el pellet, el sobrenadante fue desechado y se le colocaron enseguida 100 μ L de amortiguador de suspensión (acetato de sodio a 50 mM, acetato de magnesio a 8 mM, pH 4.5).

2.2.4 Separación de los agregados de proteínas y partículas virales

Durante el proceso, en tubos para rotor Sw32Ti (Beckman) previamente esterilizados, se colocaron 30 mL de sacarosa al 25%, se congelaron por una hora a - 80 °C y después se descongelaron a 4 °C por 8 horas, repitiendo el ciclo de congelado/descongelado dos veces para generar un gradiente continuo de sacarosa de aproximadamente del 5 al 40%.

Después de haber preparado el gradiente de sacarosa, el virus recuperado del colchón de sacarosa se colocó con una micropipeta en la parte superior del gradiente de sacarosa. Se agregaron 3 mL de solución del virus a cada tubo y se colocaron en el rotor de ángulo variable SW-32Ti y se centrifugaron durante 130 minutos a 30,000 rpm (163,809.36 x g) a 4°C en una ultra-centrifuga marca Beckman modelo Optima XPN-100.

Terminada la ultracentrifugación, en un cuarto oscuro, utilizando una linterna de luz blanca, se localizaron las bandas de color azul correspondientes al virus. Las bandas fueron extraídas cuidadosamente con una pipeta Pasteur y se colectaron en un tubo estéril de 15 ml.

2.2.5 Remoción de sacarosa.

La última parte del procedimiento de purificación del CCMV consiste en eliminar la sacarosa.

El material recolectado del paso anterior, franja azul, se colocó en tubos marca Beckman de 3.2 mL para el rotor de ángulo fijo tipo 90 Ti. Los tubos con la muestra se

balancearon y se centrifugaron a 45,000 rpm (173,192.18 x g) por 100 minutos a 4 °C. Después de finalizar la ultracentrifugación se desechó el sobrenadante, quedando un pellet de color café en el fondo del tubo (Fig. 15). Cada pellet fue resuspendido con 200 µL de amortiguador de suspensión de virus.

La concentración y pureza se determinó utilizando un espectrofotómetro UV-VIS modelo Nanodrop de la marca Thermo Scientific y se hicieron alícuotas de concentración de 1mg/mL de virus en tubos de 1.5 mL, y finalmente se congelaron a -80 °C.

Para determinar la concentración del virión, se utilizó el método de Warburg y Christian (1983). El cual consiste en obtener el espectro UV del virión, y usar dos absorbancias de referencia; A_{260} y A_{280} . El pico principal de absorbancia A para un virus, debe encontrarse a una longitud de onda de 260 nm, debido a los ácidos nucleicos, en este caso ARN para el CCMV, y éste tiene una contribución de hasta 25 veces mayor que la de la proteína (en relación a su peso). De acuerdo a Trevor Douglas y Mark Young (2004) el coeficiente de extinción molar es $27,013,000 M^{-1}cm^{-1}$ y $b = 1 cm$ (longitud del camino óptico a través de la solución). De esta manera utilizando la ley de Lambert-Beer se obtiene la concentración en mol/L, como se describe en la ecuación (2.1):

$$c = \frac{A_{260}}{b(\text{cm}) \cdot \epsilon(M^{-1}cm^{-1})} [=] \frac{\text{mol}}{\text{l}}. \quad (2.1)$$

Para obtener la concentración del virión en mg/ml, el resultado de la ecuación (2.1) se multiplica por el peso molecular del virión, $4.6 \times 10^6 g/mol$, obteniendo la ecuación (2.2) que nos determina la concentración del virus en mg/ml:

$$C = A_{260} / 5.8 \quad (2.2)$$

La pureza del virus CCMV, está relacionada con la proporción de ácidos nucleicos y de proteína en la muestra, es decir, la razón A_{260}/A_{280} debe estar en un rango de 1.5 a 1.7, para ser considerada como pura y apta para realizar experimentos.

2.3 Expresión de la proteína de la cápside del CCMV en *E. coli*

2.3.1 Células competentes

Las células *E. coli* BL21 (DE3) se cultivaron en medio LB (1% Triptona, 0.5% extracto de levadura y 1% cloruro de sodio) durante 2 horas a una temperatura de 37°C a 180 rpm, hasta una densidad óptica de 0.4 a una longitud de onda de 600 nm y se centrifugaron a 4,600 rpm a 4°C durante 10 minutos en una centrífuga marca Beckman modelo J2-21. El pellet obtenido fue resuspendido en medio 2xYT-CC frío (60% medio 2xYT, .7% NaCl, 10% PEG 8,000, 10% glicerol al 100%, 5% DMSO, 1M de MgCl₂, 1M de MgSO₄ y agua destilada, filtrada y esterilizada) y separado en alícuotas de 100 µL, las cuales fueron almacenadas a -80°C.

2.3.2 Transformación de células competentes

Se tomaron 25 µL de células competentes, se adicionaron 25 µL de amortiguador KCM (100 mM KCl, 30 mM CaCl₂ y 50 mM MgCl₂) y 10 µL del plásmido pSB1C3-BBa_CP (CCMV), provisto por el Dr. Kees Van Ark (Laboratorio de Microbiología, Wageningen UR, Países Bajos) el cual contiene la información para la expresión de la proteína de cápside del CCMV (Fig. 10). La mezcla se mantuvo en hielo durante 30 minutos, se transformaron mediante un choque térmico a 42°C durante 2 minutos y se le adiciono 400 µL de medio SOC (2% triptona, .5% extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20mM de glucosa). Se dejaron incubar a 180 rpm durante una hora a 37°C y el cultivo obtenido se esparció mediante un asa bacteriológica en placas de agar en medio LB con cloranfenicol a una concentración de 34 µg/mL para determinar la eficiencia de la transformación.

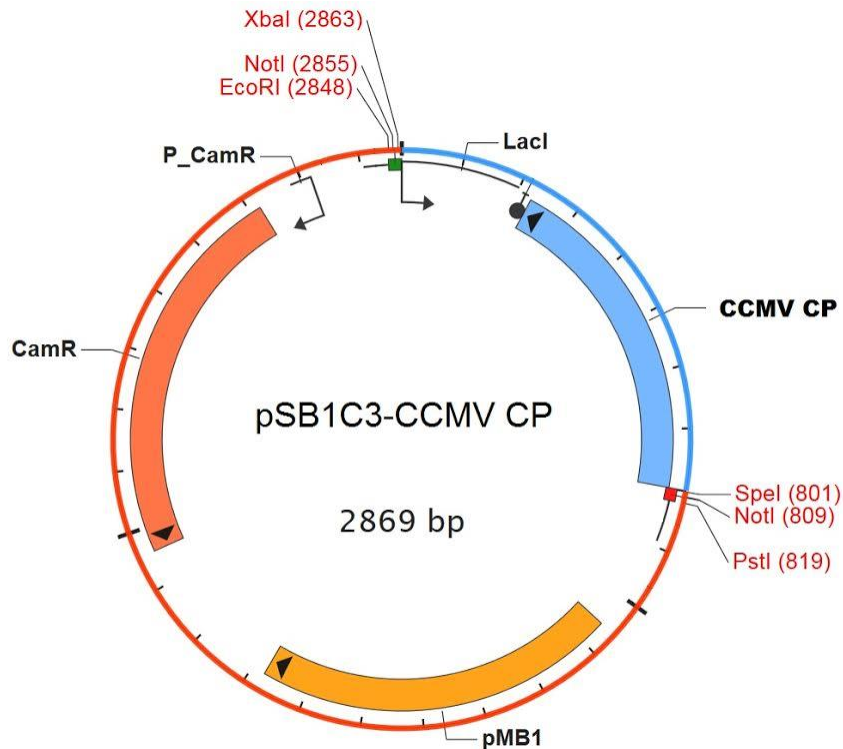


Figura 10. Mapa genético del plásmido de la proteína de cápside del CCMV en *E. coli*.

2.3.3 Inducción de células transformadas

Después de haber transformado las células con el plásmido, se realizó un pre-cultivo de las células crecidas en la placa de agar, seleccionando una colonia, inoculándola en medio LB con cloranfenicol (34 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubándola durante 8 horas, a 37°C y 180 rpm. De éste pre-cultivo se tomaron 40 mL para inocular 2 litros de medio LB con cloranfenicol (34 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 1.25 mM de glucosa para aumentar la producción de la proteína, dejando incubar a 37°C y 180 rpm, hasta tener una densidad óptica de 0.4 (aproximadamente 4 hrs.), para posteriormente inducir la expresión de la proteína con IPTG a una concentración de 1.25 mM. El cultivo se incubó con el inductor durante 50 horas a una temperatura de 30°C, tomando alícuotas de 500 μL a las 12, 17, 24, 36, 40 y 50 horas para estimar la expresión de la proteína mediante geles SDS-Poliacrilamida al 15%.

2.3.4 Purificación de la proteína de la cápside de CCMV

El cultivo obtenido después de las 48 horas, fue centrifugado a 4,700 rpm durante 18 minutos y el pellet resuspendido en amortiguador de desensamble (500 mM de CaCl_2 , 50 mM tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8, 1 mM DTT y 0.5 mM PMSF). La disrupción de las células fue realizada con un procesador ultrasónico de micropunta SONICS, con un pulso de 7.0, amplitud del 30% y ciclo de 1 minuto con intervalos de 30 segundos. El lisado obtenido fue centrifugado en frío a 4,700 rpm durante 18 minutos, descartando el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en amortiguador de desensamble con urea a 8 M para posteriormente ser diluido con 15 mL de amortiguador de desensamble sin urea, manteniendo una temperatura menor a 25°C y centrifugado a 7,500 rpm durante 40 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue concentrado utilizando una celda de ultrafiltración Amicon® (8050 System) con una membrana de 10,000 kDa bajo 20 psi de presión con nitrógeno y dializado dos, veces utilizando una membrana de diálisis de 14,000 kDa en amortiguador de desensamble durante 4 horas y posteriormente dializado nuevamente dos veces por 4 horas cada una, en amortiguador de reensamble (1 M NaCl, 50 mM acetato de sodio pH 4.8, 1 mM EDTA y 1 mM DTT). Las muestras obtenidas después de las diálisis se fraccionaron en tubos ultra-clear para el rotor SW-41 Ti para la ultracentrífuga OptimaXPN-100 (Beckman Coulter®) y se les colocó un colchón de sacarosa al 20%, posteriormente fueron centrifugadas a 40,000 rpm durante 285 minutos a 4°C. Finalmente, los pellets obtenidos fueron resuspendidos en amortiguador de virus (10 mM acetato de sodio y 1 mM EDTA, pH 4.8).

Para eliminar cualquier contaminación por ácidos nucleicos después de la purificación, la muestra fue dializada en amortiguador de desensamble durante 24 horas a 4°C, para posteriormente centrifugarlas a 50,000 rpm durante 8:36 horas a 4°C. Finalmente, el sobrenadante fue dializado en amortiguador de ensamble para cápsides vacías (1 M NaCl, 50 mM acetato de sodio pH 4.8 y 1 mM EDTA).

2.4 Encapsidación de liposomas con camptotesina como cargo

Con el objetivo de proteger y mantener su estabilidad, se realizó la encapsidación de liposomas (NLS) conteniendo camptotesina (CPT), un fármaco altamente hidrofóbico con actividad anticancerígena. Los liposomas fueron elaborados y otorgados por el grupo del Dr. Jaime Ruíz del Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Para encontrar las condiciones idóneas para la encapsidación de liposomas cargados con camptotesina (NLS-CPT), se encapsidaron liposomas (NLS, sin camptotesina) a cuatro diferentes condiciones. Primero, 1.07 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de partículas con NLS fueron diluidas con amortiguador de desensamble de proteínas (1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH = 7.2, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) a tres diferentes proporciones: 1:1000, 1:100 y 1:10. Después 4 μL de las alícuotas de las diluciones fueron mezcladas con 9 μg de proteína de cápside del CCMV, y finalmente dos alícuotas de 4 y 20 μL de partículas de NLS sin diluir fueron mezcladas con 9 μg de proteína de cápside del CCMV cada una. Todas las cinco diferentes encapsidaciones fueron aforadas a un volumen final de 50 μL y dializadas durante la noche contra amortiguador de ensamble de virus (50 mM Tris-HCl pH = 7.2, 50 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2). La correcta encapsidación de los liposomas fue analizada mediante ensayos de movilidad electroforética (EMSA), comparándolas con CCMV nativo. La encapsidación de partículas con NLS CPT fue llevada a cabo utilizando las condiciones exitosas de la encapsidación de las partículas con NLS (sin camptotesina), las cuales consistieron en mezclar 20 μL de NLS CPT (1.07 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) con 9 μg de proteína de cápside de CCMV.

2.5 Entrecruzado de cápside del CCMV

Con la finalidad de obtener los mejores resultados de estabilidad, se realizaron 6 ensayos distintos para el entrecruzado de la cápside del CCMV con glutaraldehído, los cuales se describen a continuación:

Protocolo 1

La primera reacción de entrecruzado se basó en la metodología de Carter M. J. (Carter 1996) la cual consistió en adicionar directamente 10 mM, 3 mM y 1 mM de glutaraldehído (GA) al CCMV (en amortiguador de virus; acetato de sodio 0.01 M, EDTA 0.001 M, pH 4.5) a una concentración final de virus de 0.16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La muestra se dejó reaccionar a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) durante una hora y por medio de los ensayos de movilidad electroforética en geles nativos de agarosa se estudió la estabilidad de su cápside.

Protocolo 2

En el segundo procedimiento, la reacción de entrecruzado fue un modificado del procedimiento anterior; al terminar la reacción de entrecruzado las muestras se dializaron en buffer de virus (acetato de sodio 10 mM, EDTA 1 mM, pH 4.5) durante 12 horas a 4°C y se procedió a realizar los ensayos de movilidad electroforética.

Protocolo 3

En el tercer método, la reacción de entrecruzado fue basada en el procedimiento de Ng, J. *et al.* (2000), la cual se llevó a cabo a 4°C , a una concentración final de virus de 0.16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en amortiguador de virus (pH 4.5) con 0.5 μM de GA y dializado con 0.5 μM de GA en amortiguador de virus (pH 4.5) durante 24 horas. El GA fue removido después de las 24 horas mediante diálisis en amortiguador de virus. Posteriormente la reacción de entrecruzado se detuvo dializando la muestra en amortiguador de virus con glicina al 0.2 M durante 8 horas, seguido por una diálisis en amortiguador de virus.

Protocolo 4

El cuarto procedimiento es una adaptación del protocolo de Ng, J. y colaboradores (2000). Para el entrecruzado, se realizó una mezcla de CCMV a una concentración final de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en amortiguador de virus (pH 4.5) y 0.5 μM de GA. Esta mezcla se dejó reaccionar durante media hora a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) y posteriormente la muestra se incubó a 10°C durante cuatro horas para después adicionarle glicina a una concentración final de 0.2 M.

Protocolo 5

En este procedimiento, se realizó un entrecruzado de las cápsides de CCMV en dos condiciones de amortiguador de fosfatos (0.1 M fosfato monosódico, 0.1 M fosfato disódico): pH 6 y 7, con GA a una concentración final de 0.5 μM . Se dejó reaccionar durante 4 horas a temperatura ambiente, para después agregarle una concentración final de glicina de 0.2 M. Se seleccionó el amortiguador de fosfatos con pH de 6 para realizar tres más reacciones de entrecruzado utilizando la misma metodología, pero con diferentes concentraciones de GA: 0.5, 1, 3 y 5 μM .

Protocolo 6

Finalmente, se entrecruzaron cápsides de CCMV, VLPs de CCMV con L-asparaginasa como cargo y VLPs de CCMV conteniendo nanolipoesferas (liposomas) con camptotesina (NLS CPT), dializándolas durante 6 horas a temperatura ambiente contra amortiguador de fosfatos pH 6 con 50 mM de glutaraldehído. Posteriormente se dializaron durante aproximadamente 18 horas contra solo amortiguador de fosfatos pH 6 para remover el exceso de GA, y finalmente se adicionó 0.2 M de glicina y se mantuvo en diálisis durante 6 horas. Las muestras fueron almacenadas a -20°C .

2.6 Estabilidad de las cápsides entrecruzadas a diferentes temperaturas

A partir de las muestras obtenidas mediante los protocolos 1 (basado en la metodología de Carter M. J., 1996), 2 (Modificado de Carter M. J., 1996) y 3 (Ng J. et al., 2000) de entrecruzado se realizaron diferentes alícuotas para su exposición a dos diferentes temperaturas (42°, 60°C) durante una, dos y tres horas para cada una de las temperaturas, y las que fueron entrecruzadas con el protocolo 4 fueron expuestas a 90°C por una hora, utilizando una placa de baño seco marca *Fischer Scientific* modelo *Isotemp*.

Las muestras obtenidas de la reacción de entrecruzamiento realizadas con los protocolos 5 y 6 en amortiguador de fosfatos a pH 6, a diferentes concentraciones de GA, fueron expuestas 70° y 75°C durante una hora, utilizando una placa de baño seco marca *Fischer Scientific* modelo *Isotemp*.

2.7 Estabilidad de las cápsides entrecruzadas a diferentes rangos de pH

Las cápsides entrecruzadas mediante el protocolo 5 y cápsides nativas sin tratamiento (sin GA) fueron dializadas en amortiguador de fosfatos (0.1 M fosfato monosódico, 0.1 M fosfato disódico) pH 7, 7.5, 8 y 9. De igual manera, las entrecruzadas mediante el protocolo 6 y cápsides nativas sin tratamiento (sin GA) fueron dializadas contra amortiguador de fosfatos a pH 7.5 y 8. Todo lo anterior se realizó durante 8 horas y a temperatura ambiente, tomando en cuenta que el pH fisiológico y en particular el sanguíneo es de 7.3 a 7.4. Las muestras resultantes se analizaron mediante EMSA y TEM.

2.8 Estabilidad de las cápsides entrecruzadas a diferentes rangos de fuerza iónica.

Las cápsides entrecruzadas con 0.5 y 1 μ M de GA utilizando el protocolo 5, y aquellas mediante el protocolo 6 fueron dializadas contra amortiguador de fosfatos (0.1 M fosfato monosódico, 0.1 M fosfato disódico, pH 7.5) con dos concentraciones diferentes de cloruro de sodio: 0.5 y 1 M, durante 8 horas cada una a temperatura ambiente, mediante diálisis y en agitación constante.

2.9 Gel desnaturalizante SDS-PAGE

Los geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) representan una manera fácil y relativamente rápida de caracterizar el peso molecular e integridad de las proteínas al comparar su movilidad electroforética con la de alguna proteína de peso molecular ya conocido. El alto poder de resolución que presenta esta técnica se deriva del empleo de un sistema de geles discontinuo, es decir, que se encuentra formado por dos geles de distinta porosidad y pH. El primero se encarga de compactar las muestras (gel concentrador) y el segundo de separarlas (gel separador). En este último, la separación de las proteínas o su movilidad electroforética se encuentra determinada por el tamaño del poro, el cual varía según la concentración de monómeros de gel. De tal manera que si se pretende analizar proteínas de alto peso molecular, conviene utilizar geles de bajo porcentaje (5 – 10%), mientras que para proteínas con bajo peso molecular es necesario preparar un gel separador de mayor concentración (15 – 20%).

En el presente estudio, se utilizó ésta técnica para monitorear el resultado de la expresión y purificación de la proteína de cápside del CCMV. Los geles se realizaron mediante la siguiente metodología:

2.9.1 Preparación del gel concentrador

Para la preparación del gel concentrador, a 2.176 mL de agua destilada se le adicionan 538 μ L de acrilamida-Bis acrilamida 30/0.8 (30% acrilamida, 0.8% Bis-acrilamida, 100 mL agua destilada) y 403 μ L de Tris-HCl 0.5M (50 mL de agua destilada, 6.02g Tris-HCl, 0.4g SDS, pH 6.8). Al final se le vierte a la mezcla 5.12 μ L de TEMED (Tetrametiletilendiamina) y 32 μ L de PSA (persulfato de amonio) al 10%.

2.9.2 Preparación del gel separador (15%)

En el gel separador se mezclan 1.42 mL de agua destilada con 3.2 mL de acrilamida-Bis acrilamida 30/0.8 y 1.6 mL de Tris-HCl 1.5M (50 mL de agua destilada, 18.2g Tris-HCl y 0.4g de SDS, pH 8.8). Finalmente se le agrega a la mezcla 64 μ L de PSA al 10% y 5.12 μ L de TEMED.

2.10 Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

Este método se utiliza para estudiar los complejos de proteínas interaccionando con ácidos nucleicos. Además, por medio de EMSA, en el presente proyecto también se determinará si los agentes de entrecruzado no han obstruido o sellado los poros de las cápsides, característica imprescindible para su utilización como bionanorreactores, y para observar su integridad. En el ensayo clásico, las soluciones de proteína y ácido nucleico son combinados y la mezcla resultante se somete a una electroforesis bajo condiciones nativas en un gel de agarosa, de tal manera que se coloca en un pozo la proteína libre, en otro el ácido nucleico libre y en otro nuestra mezcla (R. D. Cadena-Nava et al., 2012). Después de la electroforesis se determina la distribución de especies conteniendo ácidos nucleicos, de tal manera que si se observa que la mezcla migra de manera más lenta que sus correspondientes elementos libres, significa que hay una interacción entre éstos (Hellman and Fried, 2009). La preparación del ensayo se llevó a cabo como en Cadena-Nava et al (2012)., en donde a las muestras a analizar se les adiciona glicerol al 100%, de tal manera que se tenga 15% en volumen.

Posteriormente, se cargan en un gel de agarosa al 1%, y como buffer de electroforesis es usado el amortiguador de virus (Acetato de sodio 0.01M, EDTA 0.001M, pH 4.5).

Después de finalizar la electroforesis, el gel obtenido se tiñe durante una hora con bromuro de etidio (o *Gel Red*) a una concentración final de 0.1 µg/mL, para posteriormente teñirlo con 20 mL de *Instant Blue*TM para observar los ácidos nucleicos y las proteínas respectivamente. De esta manera, la visualización del ARN, en el caso del CCMV nativo, después del entrecruzado nos permite verificar que la cápside es funcional para su uso como bionanorreactores. Debido a la porosidad de la cápside evidenciada mediante la entrada del bromuro de etidio para el marcaje del ARN. Los geles fueron documentados utilizando un transiluminador SmartView Pro Imager System modelo 1100 marca Major ScienceTM.

2.11 Microscopía electrónica de transmisión

Posterior al tratamiento de las cápsides con glutaraldehído y la exposición a diferentes rangos de temperatura, pH y fuerza iónica las muestras (con y sin glutaraldehído), las muestras fueron analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión para determinar la integridad de las cápsides virales.

La preparación de las muestras se llevó a cabo como fue descrito por Cadena-Nava et al. (2012). Se aplicaron 6 µL de muestra de cápsides a una rejilla de soporte Formvar/Carbon de 400 mallas de cobre (TedPella). La muestra se mantuvo en la rejilla por 1 minuto, y se retiró el exceso de la muestra con papel filtro marca Whatman® y enseguida se cubrió con 6 µL de acetato de uranilo al 2% durante 1 minuto. El exceso de acetato de uranilo fue removido con papel filtro. Las muestras fueron almacenadas en un desecador y posteriormente analizadas en el microscopio electrónico de transmisión marca Jeol, modelo JEM-2010, usando un voltaje de 200 Kv y equipado con una cámara digital Gatan, las imágenes fueron tomadas y grabadas usando el software DigitalMicrography. Finalmente las imágenes fueron analizadas usando el software ImageJ del NIH.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Purificación de CCMV

Como parte del presente proyecto, la obtención de nuestro sistema modelo (CCMV) para realizar los estudios de estabilización de bionanorreactores es de suma importancia. En este trabajo, la producción de CCMV se realizó en su huésped natural *Vigna unguiculata* (Frijol caupi) durante los meses de verano, época que favorece el crecimiento de hojas del frijol caupi. Después de seguir el procedimiento de purificación descrito en la sección experimental, en la Fig. 11 se muestra la imagen de la banda de color azul que corresponde al CCMV después de la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. Los resultados de la extracción y purificación del CCMV, fueron caracterizados mediante espectroscopía UV-VIS para determinar su pureza y concentración, obteniendo un rendimiento total de 1 mg de CCMV por 230 g de hoja, el cual es mucho menor al reportado hasta la fecha para su huésped natural, que es de 0.2 a 0.4 mg por gramo de hoja (C. Lane 1974).

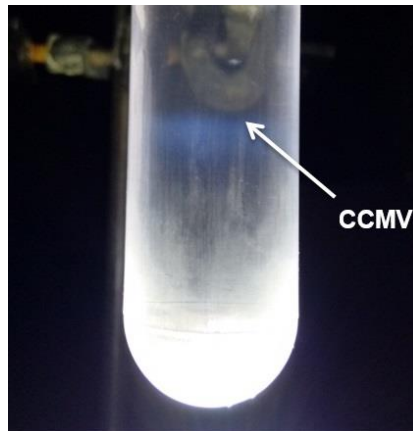


Figura 11. Gradiente de sacarosa, en donde se muestra la franja azul que contiene el virus de CCMV después de la ultracentrifugación.

3.2 Expresión de la proteína de cápside del CCMV

Las partículas tipo virus (VLPs) representan un novedoso y atractivo sistema principalmente en nanomedicina, para el empaquetamiento y envío de diversos cargos, ya que exhiben un alto potencial para la protección y prevención de degradación de su cargo. Estas VLPs pueden ser sintetizadas a partir de virus nativo (producido en su hospedero natural) o mediante síntesis a partir de la proteína viral producida de manera heteróloga en sistemas de expresión de manera rápida, continua y en grandes cantidades. Sin embargo, algunos de los protocolos actuales para la expresión heteróloga de la proteína de cápside del CCMV no han dado buenos resultados (*Pichia pastoris* 0.05 – 0.5 mg/L, Brumfield et al. 2004).

En el presente estudio, la modificación de protocolos ya existentes resultó ser un procedimiento eficiente para aumentar el rendimiento de la producción de la proteína recombinante de la cápside del CCMV utilizando *E. coli* BL21 (DE3) como sistema de expresión, ya que en el análisis realizado mediante geles SDS-PAGE del extracto de proteína obtenido a diferentes tiempos (Fig. 12 A) es posible observar un aumento de intensidad en la banda correspondiente a la proteína de cápside del CCMV conforme se aumenta el tiempo de incubación con el inductor (Tiempos de 12 a 50 horas). Asimismo, se hace evidente la eficacia de la purificación de la proteína heteróloga del CCMV al observar los resultados obtenidos del análisis por SDS-PAGE del extracto obtenido (sin purificar, Fig. 12 A), el cual presenta numerosas bandas que corresponden a restos proteicos de diferentes tamaños moleculares ajenos a nuestra proteína de interés, y compararlos con los obtenidos para la proteína después de la purificación (Fig. 12 B), en donde se obtuvo una sola banda que coincide con el peso molecular del CCMV nativo característico para la proteína de la cápside pura, obteniendo un rendimiento total de 0.265 mg/mL de proteína pura. Esto se convalida al analizar las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión, en donde es posible observar las partículas presentando morfología y tamaño idénticos al virus nativo (Fig. 13), así como excelente calidad de pureza y una alta concentración de partículas.

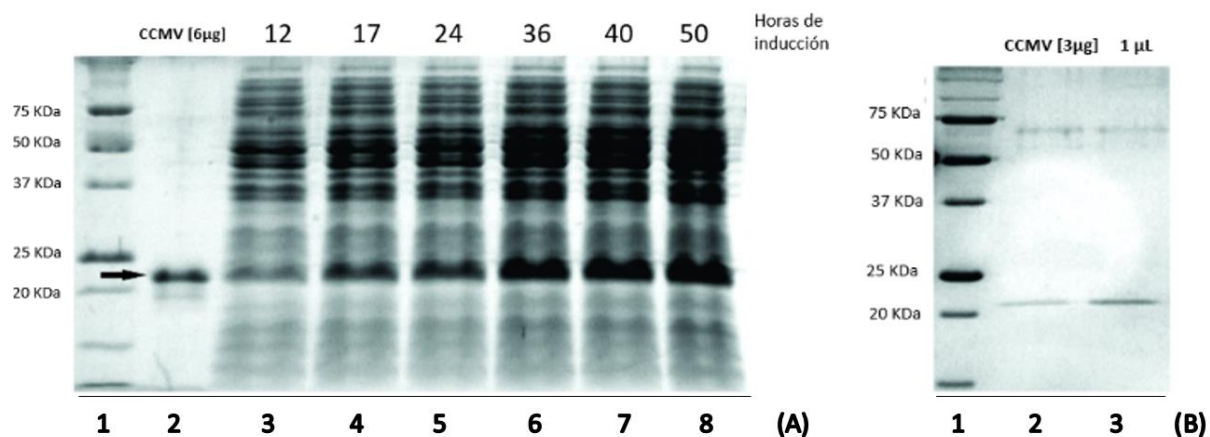


Figura 12. Electroforesis en geles SDS-PAGE al 15%. A) Extractos de proteína sin purificar a diferentes tiempos de inducción. 1: Marcador molecular. 2: Proteína de CCMV nativo. 3-8: Extractos a diferentes tiempos de inducción. B) Extracto de proteína recombinante de CCMV purificada. 1: Marcador molecular. 2: Proteína de CCMV nativo. 3: Extracto de proteína recombinante después de purificar.

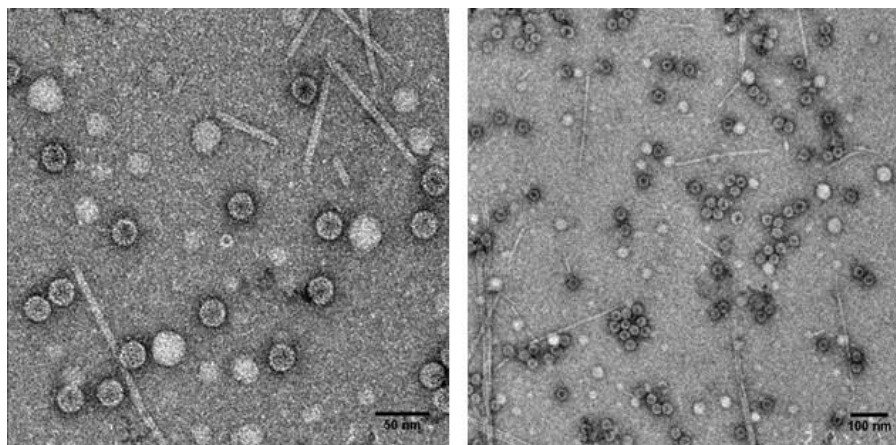


Figura 13. Micrografías electrónicas de transmisión de cápsides (vacías) formadas por la proteínas recombinantes de la cápside del CCMV expresadas en *E. coli* (BL21 DE3).

3.3 Estabilidad de las cápsidas entrecruzadas a diferentes temperaturas

El análisis por EMSA en geles nativos de agarosa al 1% de las primeras muestras entrecruzadas mediante el protocolo 1 (basado en la metodología por Carter M. J. (1996), el cual consistió en adicionar directamente la concentración de GA y sin remover el exceso o detener la reacción de GA, muestra que los viriones no emigraron (Fig. 14 pozos 2-5), es decir, se quedaron en el pozo a comparación del virus nativo sin tratamiento (Fig.14, banda 1).

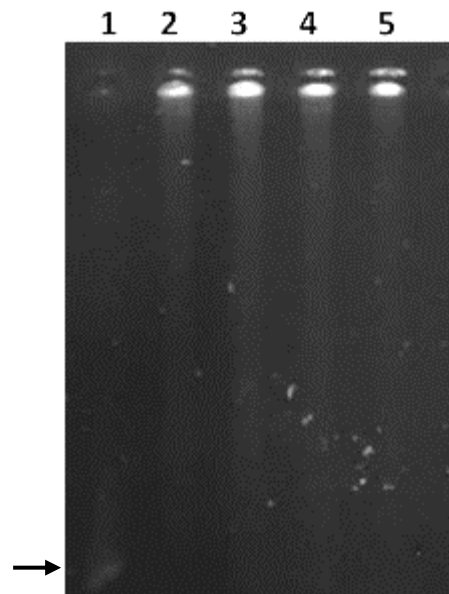


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Protocolo 1. Tinción con Bromuro de Etidio. Banda 1 (flecha) corresponde a CCMV nativo sin tratamientos. 2 corresponde a CCMV con GA 10 mM, expuesto a 4°C durante 30 minutos. 3 corresponde a CCMV con GA 10 mM, expuesto a 25 °C durante 30 minutos. 4 corresponde a CCMV con GA 10 mM, calentado a 37 °C durante 30 minutos y 5 corresponde a CCMV con GA 10 mM, calentado a 42°C durante 30 minutos. Reacción de entrecruzado basada en la metodología por Carter M. J.

En la segunda reacción de entrecruzado (Protocolo 2, con diálisis pero sin glicina), a comparación de la anterior en donde solamente se coloca la concentración de GA directamente en la muestra, el exceso de GA fue removido del medio mediante diálisis. Dando como resultado en el análisis por EMSA, partículas que si presentan movilidad electroforética (Fig. 15, pozos 2-4) a comparación del ensayo anterior (Fig. 14).

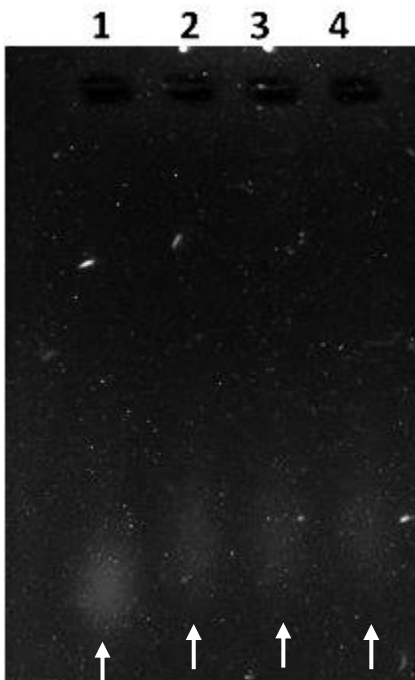


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Tinción con Bromuro de Etidio. Flechas indicando las bandas. 1 corresponde a CCMV nativo sin tratamientos. 2 corresponde a CCMV con GA 1 mM, calentado a 42 °C durante 30 minutos. 3 corresponde a CCMV con GA 3 mM, calentado a 42 °C durante 30 minutos y 4 corresponde a CCMV con GA 10 mM, calentado a 42 °C durante 30 minutos. Reacción de entrecruzado realizada con el protocolo 2, basado en la metodología por Carter M. J. y desactivando el GA.

En Figura 16 se muestra lo esperado para los viriones CCMV completos. Estos resultados indican sorprendentemente que el CCMV nativo es resistente a temperaturas de al menos 42°C durante 1 hora y que el CCMV conjugado con GA mediante el protocolo 2 (con diálisis, sin glicina) a una concentración de 1 mM es resistente a temperaturas de hasta 60°C con un tiempo de exposición de 1 hora. Asimismo, la movilidad electroforética de las muestras es menor en comparación del virus nativo (Fig. 16, pozos 1 y 2) lo que indica un aumento en el peso molecular de las muestras tratadas con GA o una disminución en la carga negativa del virus. De éstas, las cápsides con menor concentración de GA (1 mM, pozos 3, 5, 7 y 9) presentan ligeramente una mayor movilidad electroforética a comparación de las cápsides con 3 mM de GA (Fig.16, pozos 4, 6, 8 y 10).

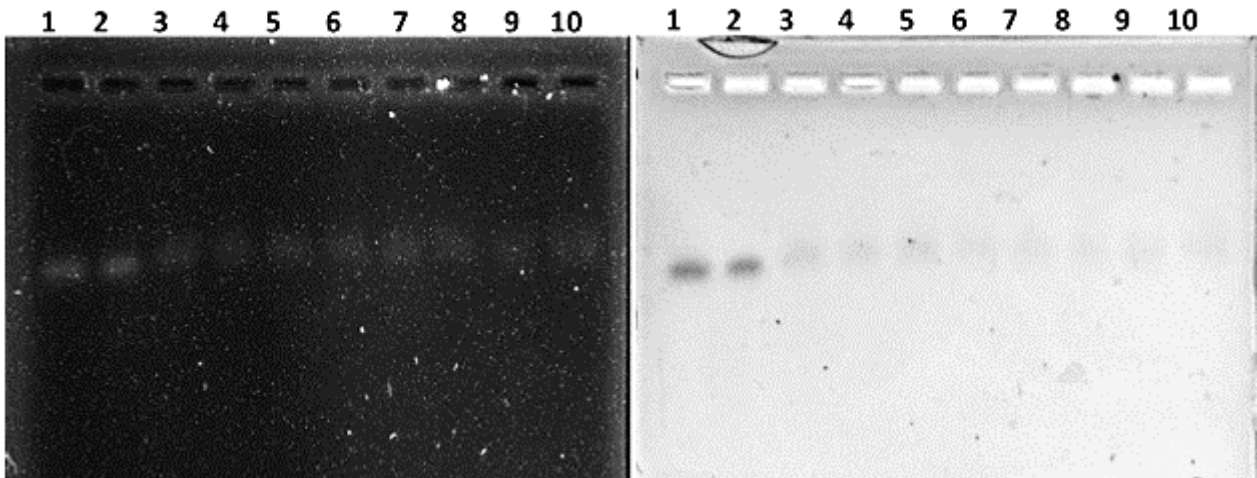


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Protocolo 2. A) Tinción con Bromuro de Etidio. B) Tinción con Instant Blue. Banda 1 corresponde a CCMV nativo sin tratamientos. 2 corresponde a CCMV nativo, calentado a 42 °C durante 1hr. 3 corresponde a CCMV con GA 1 mM, calentado a 42°C durante 30 minutos. 4 corresponde a CCMV con GA 3 mM, calentado a 42°C durante 30 minutos. 5, CCMV con GA 1 mM, calentado a 42°C durante 30 minutos y recalentado a 42°C durante 1 hr. 6, CCMV con GA 3 mM, recalentado a 42°C durante 1 hr. 7, CCMV con GA 1 mM, recalentado a 50°C durante 1 hr. 8, CCMV con GA 3 mM, recalentado a 50°C durante 1 hr. 9, CCMV con GA 1 mM, recalentado a 60°C durante 30 minutos y 10, CCMV con GA 3 mM, recalentado a 60°C durante 1 hr.

En otro ensayo de cápsidas entrecruzadas mediante el protocolo 2 (con diálisis, sin glicina), la electroforesis resultante muestra solamente 7 bandas, de las cuales la primera corresponde al virus nativo sin tratamiento alguno. En los siguientes pozos que corresponden a la temperatura de 60°C (Fig. 17, pozos 2-4) ya no es posible observar ninguna banda. a comparación de los pozos 5 al 10, en donde si se observan bandas. Asimismo, es posible observar un ligero cambio en la movilidad electroforética al comparar las cápsidas nativas con las cápsidas conjugadas con GA, de tal manera que las que presentan la mayor concentración de entrecruzante (Fig. 17, pozos 5 y 6) muestran una movilidad electroforética menor que aquellas con 1 mM de GA (Fig. 17 Pozos 7 al 10).

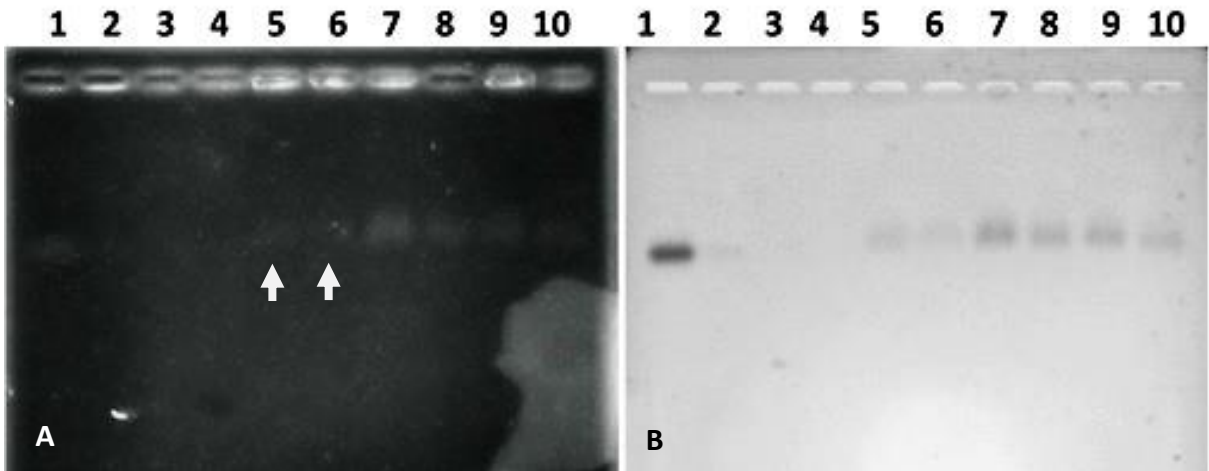


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Protocolo 2; A) Tinción con Bromuro de Etidio. B) Tinción con Instant Blue. Banda 1 corresponde a CCMV nativo sin tratamientos. 2 corresponde a CCMV nativo, calentado a 60°C durante 1hr. 3 corresponde a CCMV, calentado a 60°C durante 2 horas. 4 corresponde a CCMV sin GA, calentado a 60°C durante 1 hora. 5, CCMV con GA 3 mM, calentado a 60°C durante 3 horas. 6, CCMV con GA 10 mM, calentado a 60°C durante 2 horas. 7, CCMV con GA 1 mM, sin recalentar. 8, CCMV con GA 1 mM, calentado a 60°C durante 1 hora. 9, CCMV con GA 1 mM, calentado a 60°C durante 2 horas y 10, CCMV con GA 1 mM, calentado a 60°C durante 3 horas.

En la electroforesis obtenida de la reacción de entrecruzado utilizando el protocolo 3 basada en la metodología de Ng J. y colaboradores (Ng, Liu, and Perry, 2000, en amortiguador de virus pH 4.8, con diálisis y con glicina), para las muestras expuestas a 42°C se observó una movilidad electroforética similar para todas las muestras (Fig. 18, pozos 4-9) y aun con el CCMV nativo sin tratamiento (Fig. 18, pozos 4, 6 y 8), demostrando que el virus nativo es estable a 42°C durante 3 horas. (Fig. 18, tinción con bromuro de etidio).

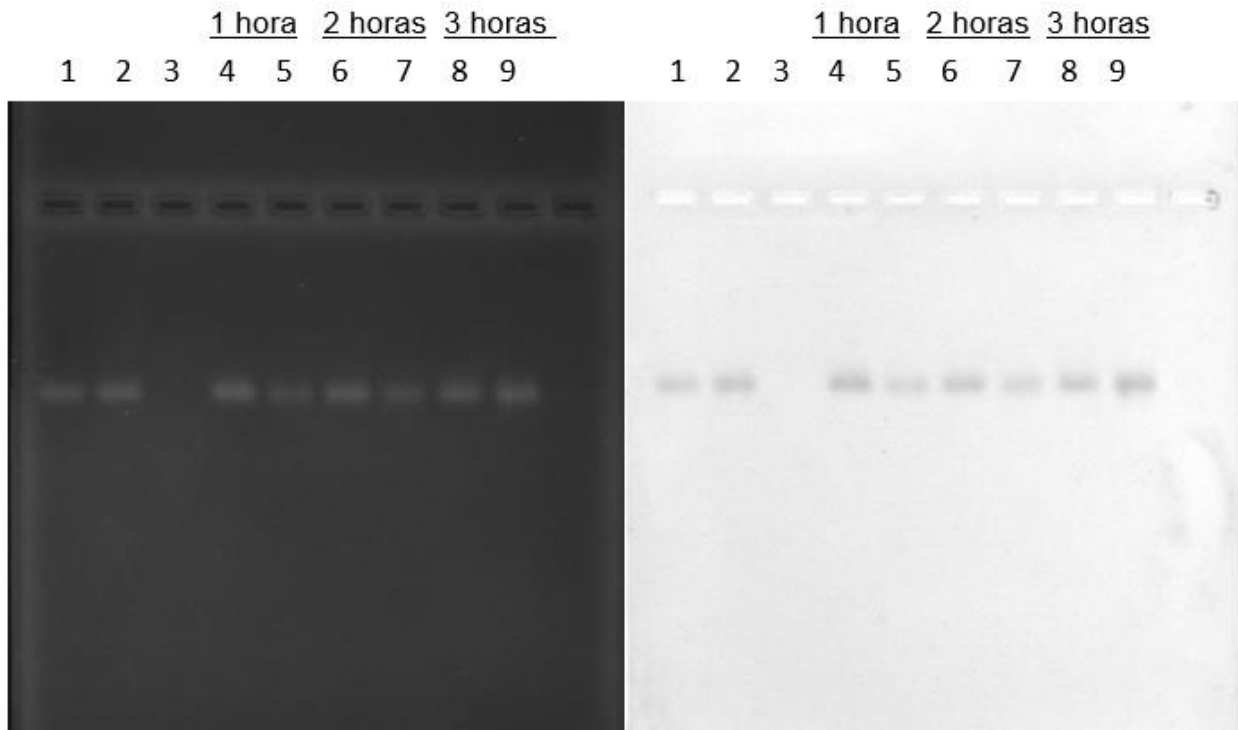


Figura 18. Muestras entrecruzadas con $0.5\mu\text{M}$ de glutaraldehído (protocolo 3) y tratadas durante 1, 2 y 3 horas a 42°C . A) Tinción con bromuro de etidio y B) Tinción con Instant Blue. 1) CCMV nativo sin tratamiento. 2) CCMV entrecruzado con GA, sin calentar. 3) Pozo vacío. 4) CCMV nativo sin entrecruzamiento. 5) CCMV entrecruzado con GA. 6) CCMV nativo sin entrecruzamiento. 7) CCMV entrecruzado con GA. 8) CCMV nativo sin entrecruzamiento y 9) CCMV entrecruzado con GA. Electroforesis de gel de Agarosa 1%, en frío a 44V durante 4 horas, usando como buffer de electroforesis el amortiguador de virus pH 5, con cambios de amortiguador cada hora.

A diferencia de las muestras expuestas a 42°C , en la electroforesis obtenida para las cápsidas nativas y para las entrecruzadas con el protocolo 3 (en amortiguador de virus pH 4.5, con diálisis y con glicina) que fueron expuestas a 60°C , no se logran apreciar las muestras correspondientes a las cápsidas de CCMV sin entrecruzamiento (sin GA. Fig. 19, pozos 3, 5 y 7). Sin embargo, si es posible observar las cápsidas tratadas con GA (protocolo 3) en la electroforesis (Fig. 19), lo cual fue confirmado mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM) (Fig. 19 C). Este resultado muestra que el GA puede estabilizar la cápside a temperaturas a las cuales son desfavorables para el virus nativo sin tratamiento

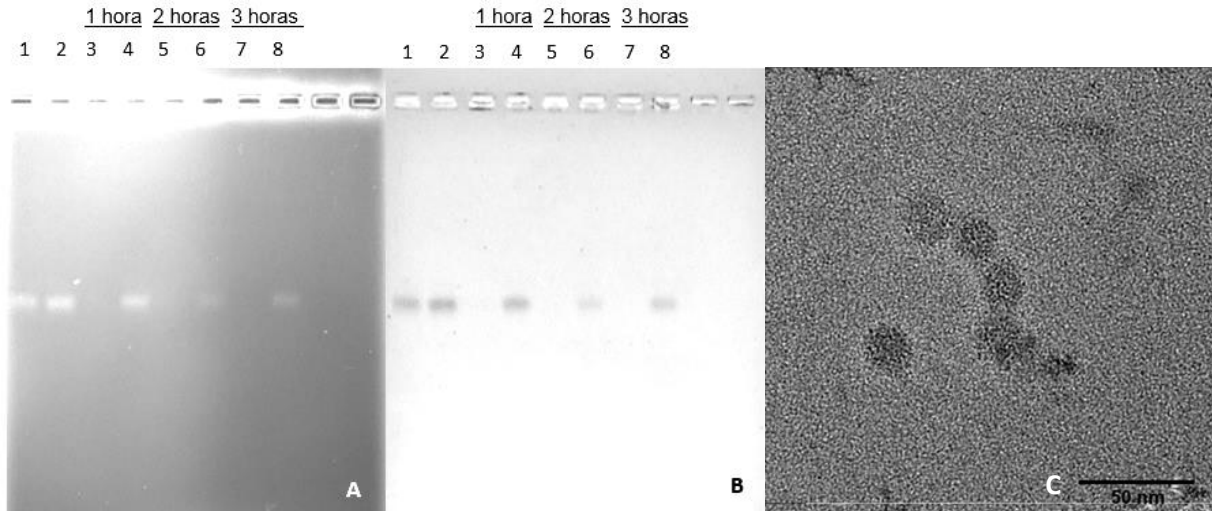


Figura 19. CCMV entrecruzado con 0.5μM de glutaraldehído (protocolo 3) y tratados a una temperatura de 60°C durante 1, 2 y 3 horas. A) Tinción con bromuro de etidio. B) Tinción con Instant Blue. 1) CCMV nativo sin tratamiento. 2) CCMV entrecruzado con GA, sin calentar. 3) CCMV nativo sin entrecruzamiento. 4) CCMV entrecruzado con GA. 5) CCMV nativo sin entrecruzamiento. 6) CCMV entrecruzado con GA. 7) CCMV nativo sin entrecruzamiento. 8) CCMV entrecruzado con GA. Electroforesis en Agarosa 1%, en frío a 44V durante 4 horas, usando el amortiguador de virus pH 5 como buffer de electroforesis. C) Micrografía electrónica de transmisión de cápsides del CCMV entrecruzadas con GA a una concentración de 0.5 μM y calentadas a 60°C durante 3 horas.

En contraste con los ensayos anteriores, en los resultados obtenidos para las muestras entrecruzadas con 0.5 μM de GA (Protocolo 3. En amortiguador de virus pH 4.5, con diálisis y con glicina) y expuestas a 90°C durante 1, 2 y 3 horas, no es posible observar ninguna banda que corresponda a las muestras expuestas a esa temperatura (Fig. 20, pozos 4-9), a comparación de la banda de CCMV entrecruzado con GA (Fig. 20, pozo 2) y del virus nativo sin tratamiento alguno (Fig. 20, pozo 1).



Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa de CCMV entrecruzado con 0.5 μ M de glutaraldehído (protocolo 3) y tratado a una temperatura de 90°C durante 1, 2 y 3 horas. A) Tinción con bromuro de etidio. B) Tinción con Instant Blue 1) CCMV nativo sin tratamiento. 2) CCMV entrecruzado con GA, sin calentar. 3) pozo sin muestra. 4) CCMV nativo sin entrecruzamiento. 5) CCMV entrecruzado con GA. 6) CCMV nativo sin entrecruzamiento. 7) CCMV entrecruzado con GA. 8) CCMV nativo sin entrecruzamiento y 9) CCMV entrecruzado con GA.

Finalmente, por medio del método de la reacción de entrecruzado basada en la metodología de Ng et al., que presenta un tiempo de desarrollo de aproximadamente 3 días (con diálisis, protocolo 3; TL= Tiempo largo) y el modificado, con una duración de un día (sin diálisis, con glicina. Amortiguador de virus pH 4.8: protocolo 4; TC= Tiempo corto), fue posible observar que en las bandas correspondientes a las muestras entrecruzadas con 5 μ M de GA con TC y calentado a 60°C (Fig. 21, pozo 4) y aquellas entrecruzadas con 0.5 μ M de GA en TC y TL y expuestas a 60°C (Fig. 21, pozos 6 y 8) no es posible observar diferencia alguna con las nativas sin tratamiento, y las nativas expuestas a 60°C (Fig. 21, pozos 1 y 2 respectivamente). Es importante notar la ausencia de cambio en la movilidad electroforética sin importar el método de la reacción de entrecruzado (TC o TL) o la concentración de GA (0.5 o 5 μ M).

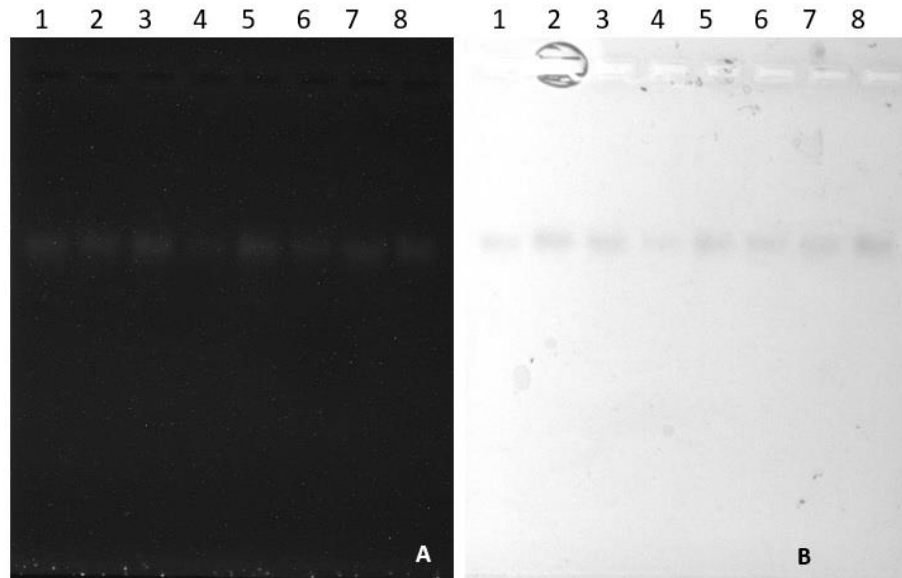


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de muestras entrecruzadas obtenidas por métodos TC y TL a concentraciones diferentes de GA. A) Tinción con bromuro de etidio. B) Tinción con Instant Blue. Pozos: 1) CCMV nativo sin tratamiento. 2) CCMV nativo y calentado a 60°C 1 hr. 3) CCMV con GA 5 μ M TC. 4) CCMV con GA 5 μ M TC, 60°C 1 hr. 5) CCMV con GA 0.5 μ M TC. 6) CCMV con GA 0.5 μ M TC, 60°C 1 hr. 7) CCMV con GA 0.5 μ M TL y 8) CCMV con GA 0.5 μ M TL y calentado a 60°C por una hora.

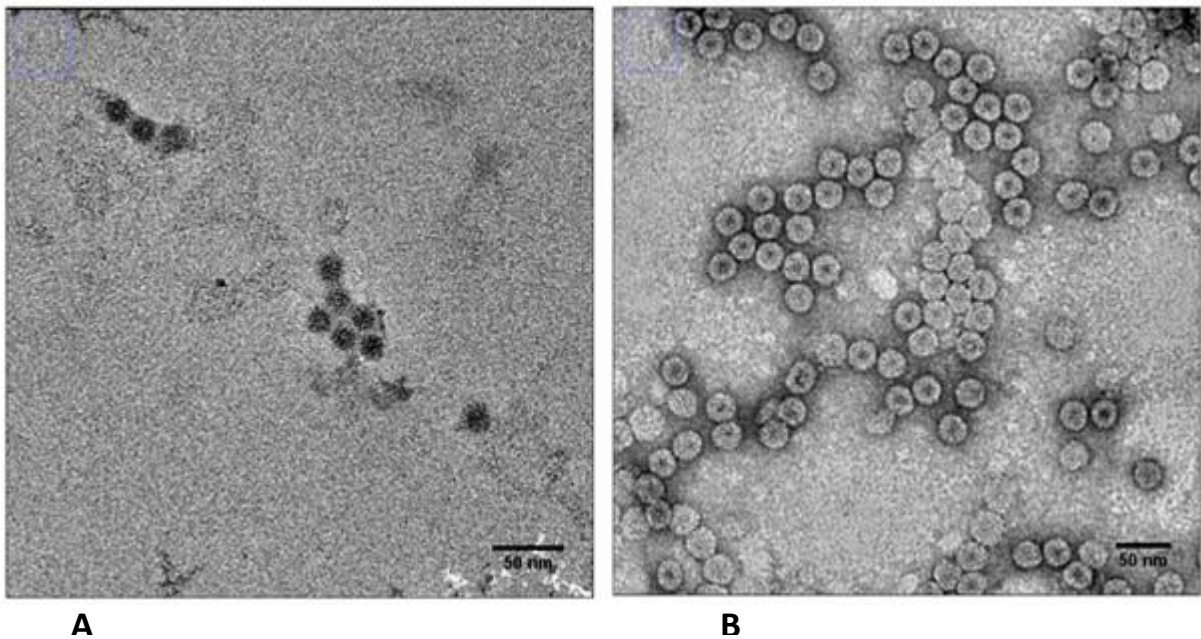


Figura 22. Micrografías electrónicas de transmisión de cápsides del CCMV entrecruzadas por el método TL (Protocolo 3, A) y por el método TC (Protocolo 4, B).

Sin embargo, es posible observar notables diferencias entre las micrografías electrónicas de las cápsides entrecruzadas por el método TL (con diálisis, Protocolo 3; Fig. 22 A), en donde los viriones muestran un poco de agregación, menor tamaño y teñidos positivamente, y las cápsides entrecruzadas por el método TC (sin diálisis, Protocolo 4; Fig. 22 B), las cuales se observan en un estado similar al que se esperaría para las cápsides nativas, con tinción negativa y un tamaño regular (~28 nm).

Cuando la reacción de entrecruzado del CCMV se lleva a cabo a tres diferentes pHs: 4.5 (amortiguador de virus), 6 y 7 (Protocolo 5, amortiguador de fosfatos, sin diálisis y con glicina), se observa una diferencia en el análisis por EMSA, ya que en las muestras que fueron tratadas a 70°C (Fig. 23, pozos 3) sólo es posible observar una banda muy débil cuando la muestra es entrecruzada a pH 6, aunque no igual que las muestras sin calentar (Fig. 23 pozos 1, nativo y 2, 0.5 µM de GA) a diferencia de los otros pHs en los cuales la banda correspondiente es menos apreciable.

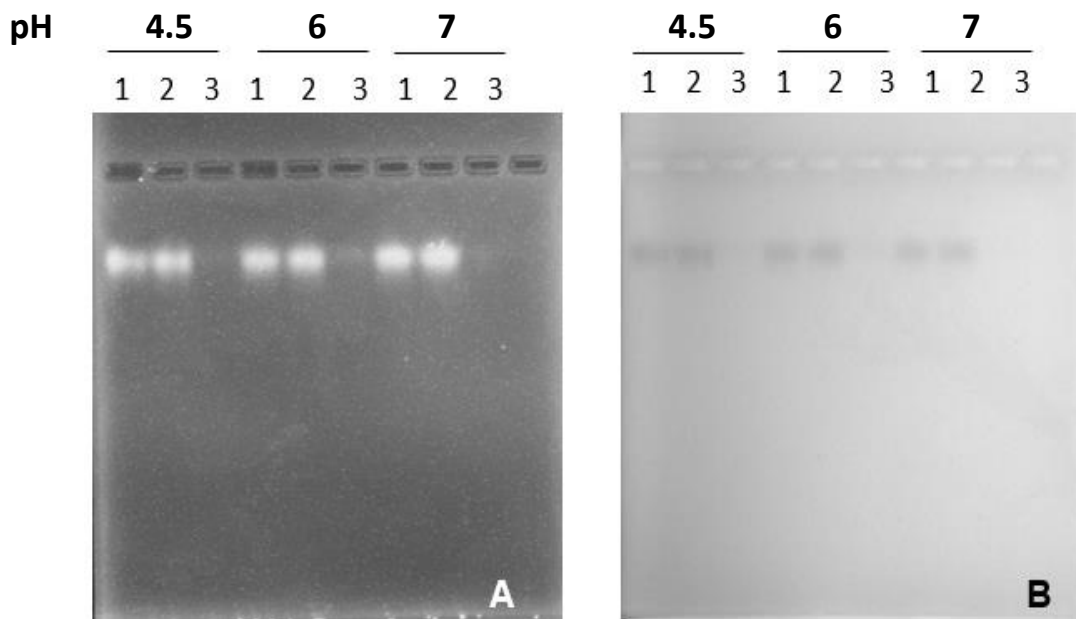


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de muestras de entrecruzado a diferentes pHs: 4.5, 6 y 7. A) Tinción con *Red Gel*. B) Tinción con *Instant Blue*. 1, CCMV nativo. 2, CCMV con GA 0.5 µM. 3, CCMV con GA 0.5 µM y calentado a 70°C. Izquierda, tinción con Gel Red y derecha,

Del ensayo anterior mostrado en la figura 23, se seleccionó el pH 6 (Fig. 23, pozo 3, pH 6) para realizar diferentes ensayos de entrecruzado (en amortiguador de fosfatos, sin diálisis y con glicina, Protocolo 5) a las siguientes concentraciones de GA: 0.5, 1, 3 y 5 μM ; y en un ensayo aparte, se realizó otro entrecruzado con las mismas condiciones de pH pero con 50 mM de GA y con diálisis (Protocolo 6).

Las muestras entrecruzadas mediante el protocolo 5, a pH 6 con 0.5, y, 3 y 5 μM de GA cuales fueron tratados con 70°C y de acuerdo al análisis por EMSA, muestran una mejor visibilidad en las bandas conforme aumenta la concentración de GA (Fig. 24, muestras con 5 μM de GA). Sin embargo, en los ensayos de movilidad electroforética de muestras entrecruzadas bajo las mismas condiciones y expuestas a 75°C, no es posible observar ninguna banda incluso en muestras que fueron entrecruzadas con 50 mM de GA mediante el protocolo 6 con diálisis (Fig. 25 C y pozo etiquetado con el número 2).

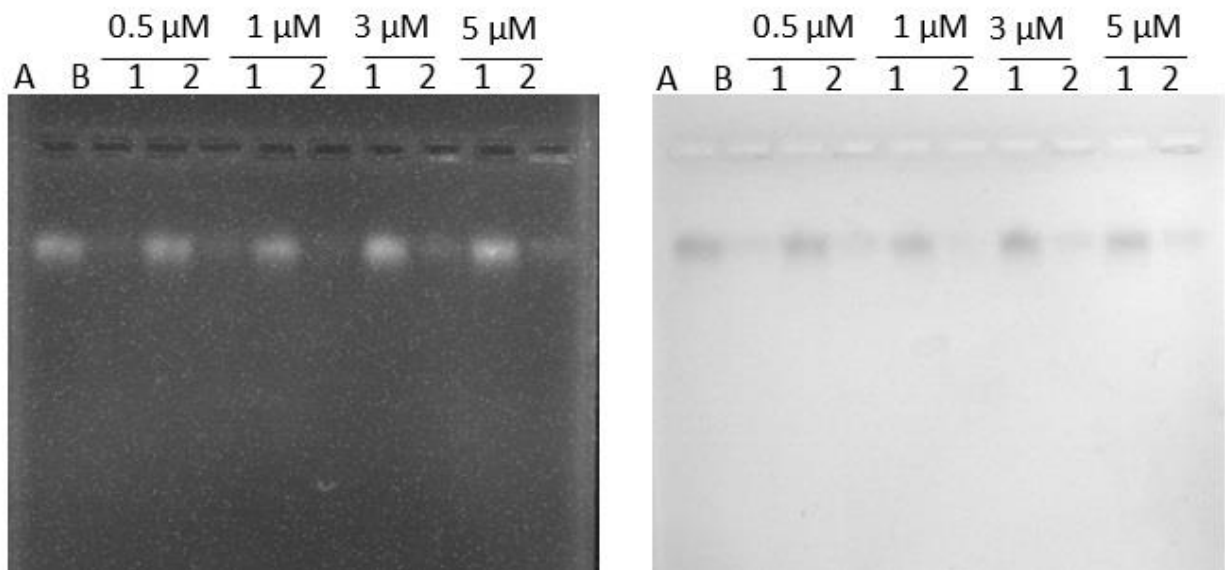


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de CCMV entrecruzado con el protocolo 5 a diferentes concentraciones de GA: 0.5, 1, 3 y 5 μM , en amortiguador de fosfatos (pH 6). A) CCMV nativo. B) CCMV nativo a 70°C. D) Tinción con bromuro de etidio. E) Tinción con Instant Blue. 1) CCMV entrecruzado. 2) CCMV entrecruzado y expuesto a 70°C.

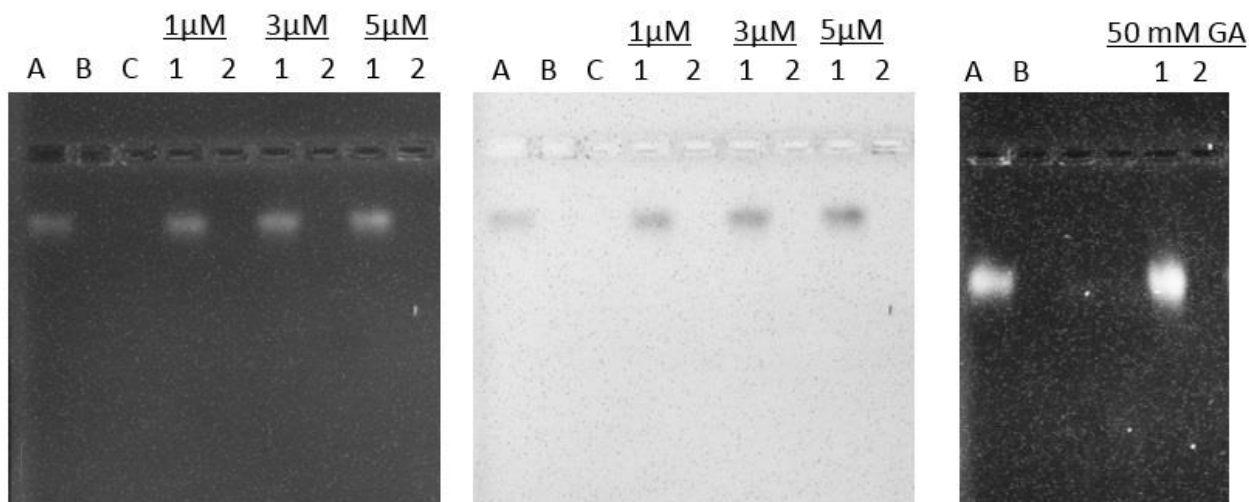


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de muestras de entrecruzado a diferentes concentraciones de GA a pH 6. A) CCMV nativo. B) CCMV nativo a 75°C. C) CCMV entrecruzado con 0.5 μM de GA y expuesto a 75°C. 1) Sin calentar. 2) Calentado a 75°C.

3.4 Estabilidad de las cápsides entrecruzadas a diferentes rangos de pH

Las muestras que fueron entrecruzadas a diferentes concentraciones de GA (0.5, 1, 3 y 5 μM) mediante el protocolo 5, sin diálisis, en amortiguador de fosfatos pH 6 y que fueron expuestas a un pH 7 en el mismo amortiguador, muestran un grado de inestabilidad, evidenciado por el barrido en las bandas correspondientes (Fig. 26, pozos 2), al igual que el CCMV nativo que fue expuesto a las mismas condiciones.

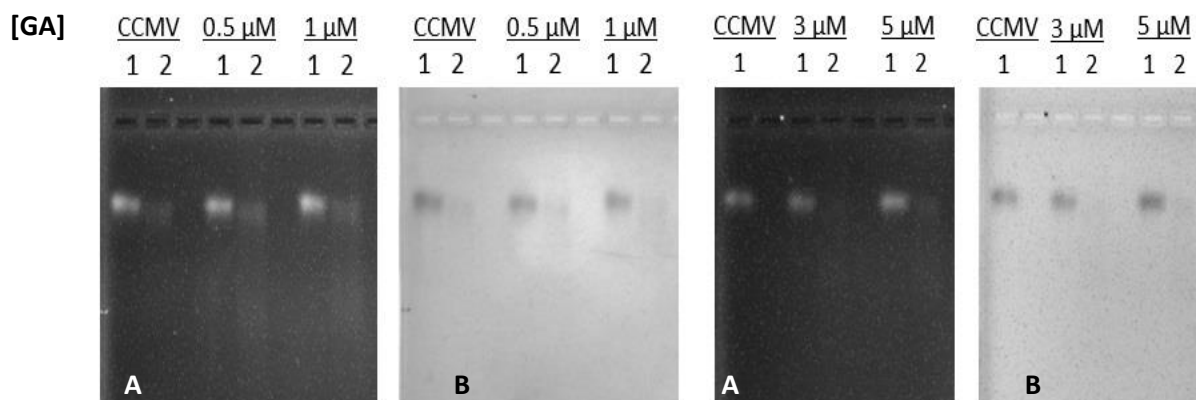


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de CCMV entrecruzado a diferentes concentraciones de GA en amortiguador de fosfatos pH 6 (Protocolo 5). 1) Sin exposición a pH 7. 2) Expuestas a pH 7. A: Tinción con Red Gel™. B: Tinción con Instant Blue™

De las muestras que fueron entrecruzadas con diferentes concentraciones de GA en amortiguador de fosfatos pH 6, se tomaron sólo las de menor concentración (0.5 y 1 μ M, entrecruzado sin diálisis, protocolo 5) y las de mayor concentración (50 mM, entrecruzado con diálisis, protocolo 6) para ser expuestas a amortiguador de fosfatos con un pH de 7.5. En el análisis EMSA de éstas muestras, sólo es posible observar bandas bien definidas y con alta intensidad correspondientes a la concentración de 50 mM GA, es decir, aquellas entrecruzadas mediante el protocolo 6, por lo que con este procedimiento es posible mantener integras las cápsides virales a esa condición de pH (Fig. 27, 50 mM, pozo 2), al contrario de las cápsides de CCMV nativas y de aquellas que fueron entrecruzadas con el protocolo 5 y por lo tanto contenían una menor concentración de GA (Fig. 27, CCMV, 0.5 y 1 μ M, pozos 2).

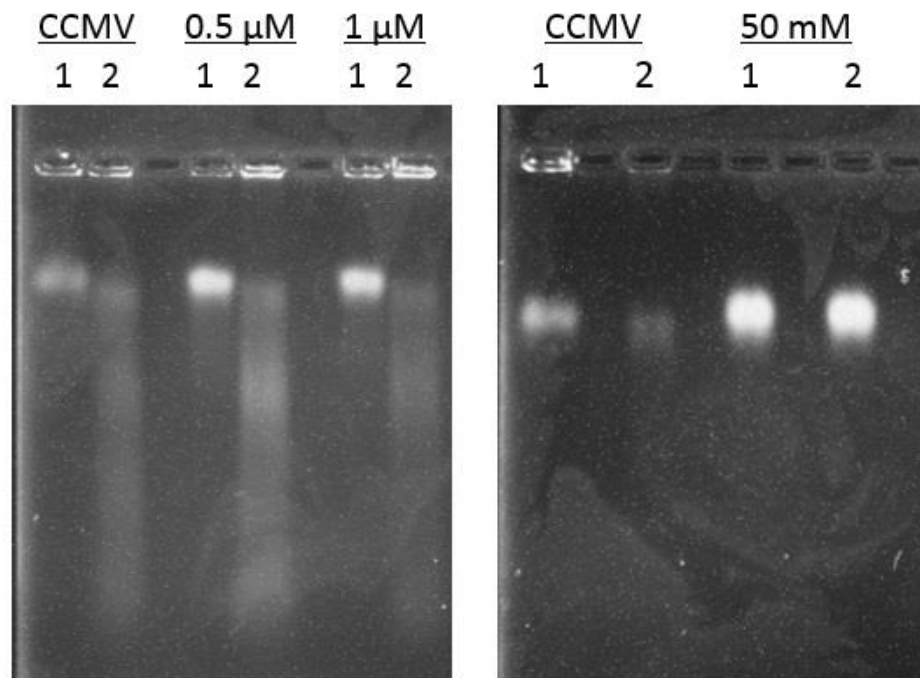


Figura 27. Electroforesis en geles de agarosa al 1% de CCMV entrecruzado a diferentes concentraciones de GA en amortiguador de fosfatos pH 6 (Protocolos 5 y 6). 1) Sin exposición a pH 7.5. 2) Expuestas a pH 7.5.

Los resultados obtenidos en los ensayos de movilidad electroforética para las muestras expuestas a un pH 8 en amortiguador de fosfatos, muestran que sólo un entrecruzado con una concentración de GA de al menos 50 mM (Protocolo 6) son capaces de mantener los viriones de CCMV estables (Fig. 28 , 50 mM de GA, pozo 2), al contrario del virus nativo sin entrecruzamiento y de aquellas cápsides que fueron entrecruzadas con 5 μ M de GA o menos (Fig. 28, Protocolo 5; CCMV y concentraciones de 0.5 a 5 μ M, pozos 2). De igual manera, las cápsides nativas y entrecruzadas con una concentración de GA de 0.5 a 5 μ M, no fueron capaces de mantener su estabilidad a un pH de 9 (Fig. 29, pozos etiquetados con el número 2).

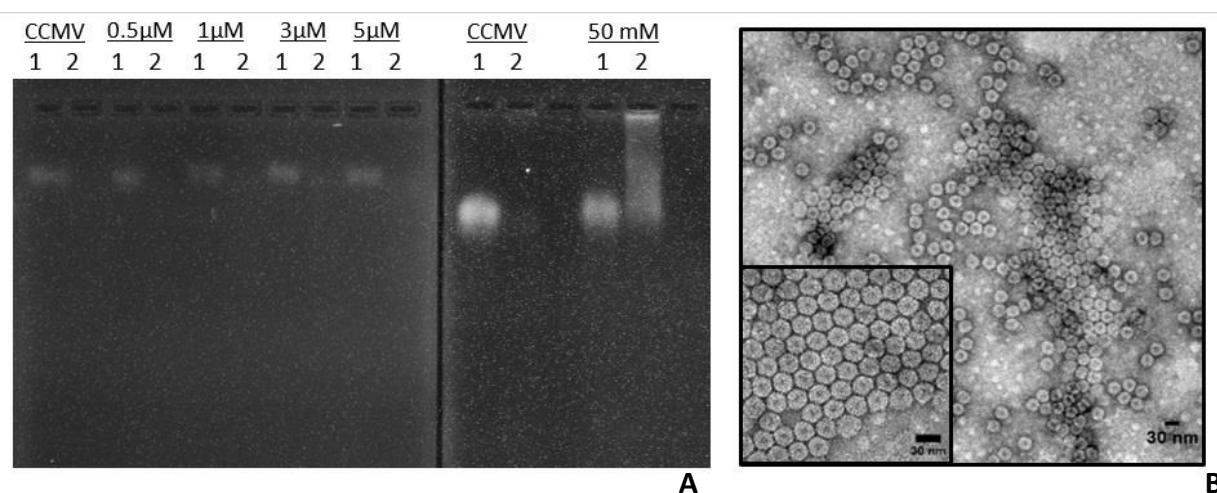


Figura 28. A) Electroforesis en geles de agarosa al 1% de CCMV entrecruzado a diferentes concentraciones de GA en amortiguador de fosfatos pH 6. 1) Sin exposición a pH 8. 2) Expuestas a pH 8. Tinción con bromuro de etidio (izquierda) y Red Gel (derecha) para ácidos nucleicos. B) Micrografía electrónica de transmisión de muestras entrecruzadas con 50 mM de GA y expuestas a pH 8 en amortiguador de fosfatos.

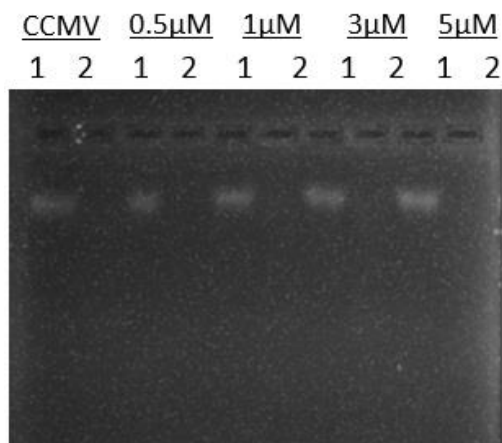


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de muestras entrecruzadas a diferentes concentraciones de GA en amortiguador de fosfatos pH 6. 1) Sin exposición a pH 9. 2) Expuestas a pH 9.

3.5 Estabilidad de las cápsides entrecruzadas a diferentes rangos de fuerza iónica

En las muestras obtenidas en un ensayo para determinar la estabilidad de las cápsides a pH 7.5 y concentraciones de 0.5 y 1M de cloruro de sodio, se hace evidente la incapacidad del CCMV nativo y de los viriones de CCMV entrecruzados con 0.5 y 1 μ M de GA (Protocolo 5, en amortiguador de fosfatos pH 6, sin diálisis) para mantener su integridad a cualquiera de estas dos condiciones, al contrario del CCMV entrecruzado con 50 mM de GA (Protocolo 6, en amortiguador de fosfatos pH 6, con diálisis), del cual si es posible observar claramente bandas en ambas condiciones (Fig. 30 A, pozos 2 y 3 con 50 mM de GA), así como su forma y tamaño típicos evidenciados en la micrografía electrónica (Fig. 30 B, muestras entrecruzadas con 50 mM de GA y expuestas a 1M de cloruro de sodio en pH 7.5).

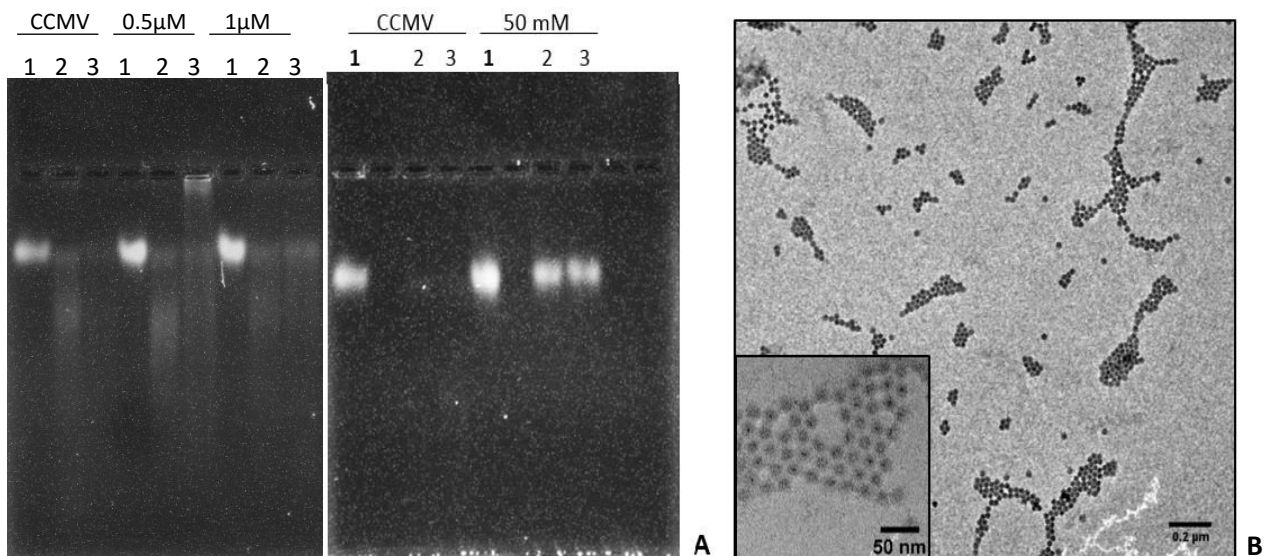


Figura 30. A) Izquierdo con 3 horas de corrida, derecho con 4 horas de corrida. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de CCMV nativo y CCMV entrecruzado mediante los protocolos 5 (0.5 y 1 μ M GA) y 6 (50 mM de GA) en amortiguador de fosfatos pH 6. 1) Sin exposición a ninguna condición. 2) Expuestas a pH 7.5 con 0.5 M de NaCl. 3) Expuestas a pH 7.5 con 1 M de NaCl. Tinción con Red Gel para ácidos nucleicos. B) Micrografía electrónica de muestras entrecruzadas con 50 mM de GA (con diálisis) y expuestas a 1M de cloruro de sodio en pH 7.5.

3.6 Entrecruzado de partículas tipo virus de CCMV con L-Asparaginasa como cargo

De acuerdo a los ensayos realizados para las cápsides de CCMV nativo, se determinó que la condición óptima para el entrecruzado de la cápside del CCMV con glutaraldehído es a una concentración de 50 mM (Protocolo 6, con diálisis), por lo cual el entrecruzado de las VLPs se realizó a esta concentración. Las partículas tipo virus con L-Asparaginasa como cargo fueron proporcionadas por el Biólogo Aldo Sánchez (Sánchez, 2015).

Las micrografías electrónicas por TEM de las partículas tipo virus conteniendo L-Asparaginasa como cargo sin entrecruzar (Fig. 31 A) y aquellas entrecruzadas con 50 mM de GA (Protocolo 6, Fig. 31 B) muestran VLPs con morfología característica del CCMV nativo, aunque con diferentes concentraciones. Esto último puede deberse a que las muestras de VLPs que obtuvieron un tratamiento con GA y fueron expuestas a un proceso con múltiples diálisis hayan aumentado de volumen, disminuyendo su concentración.

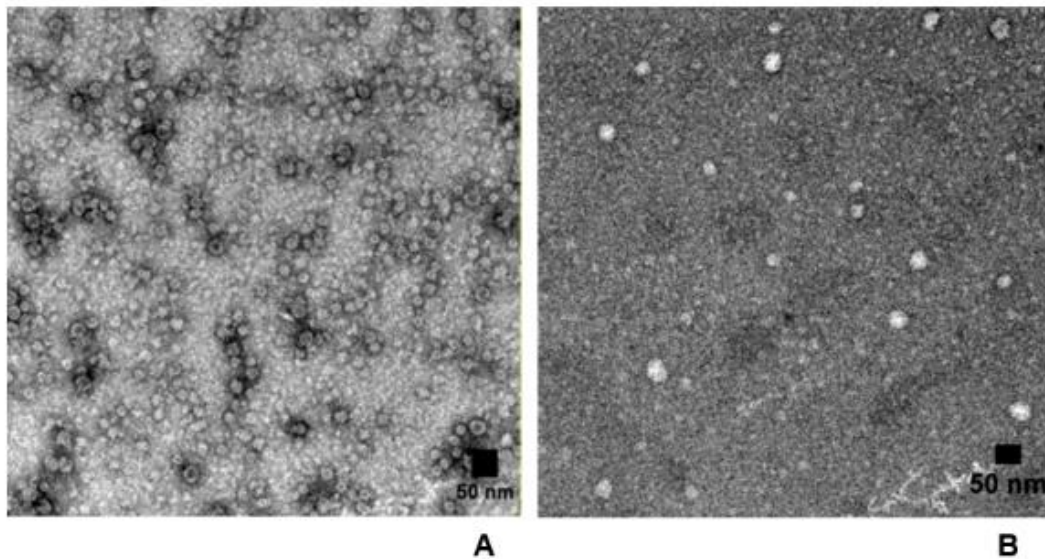


Figura 31. Micrografías electrónicas de partículas tipo virus (VLPs) con L-Asparaginasa como cargo. A: Antes de entrecruzado. B: Después de entrecruzado

3.7 Encapsidación y entrecruzado de partículas conteniendo liposomas con camptotesina como cargo

El análisis EMSA muestra que las partículas con NLS y partículas con NLS CPT migraron de la misma manera que el CCMV nativo, demostrando la correcta encapsidación del cargo. Asimismo, micrografías electrónicas de transmisión de las mismas partículas de NLS y NLS CPT encapsidadas, muestran cápsides con morfología idéntica a las cápsides de CCMV nativas (Fig. 32 B y D). Así como su integridad después de haber sido entrecruzadas con 50 mM de GA (Protocolo 6, Fig. 33).

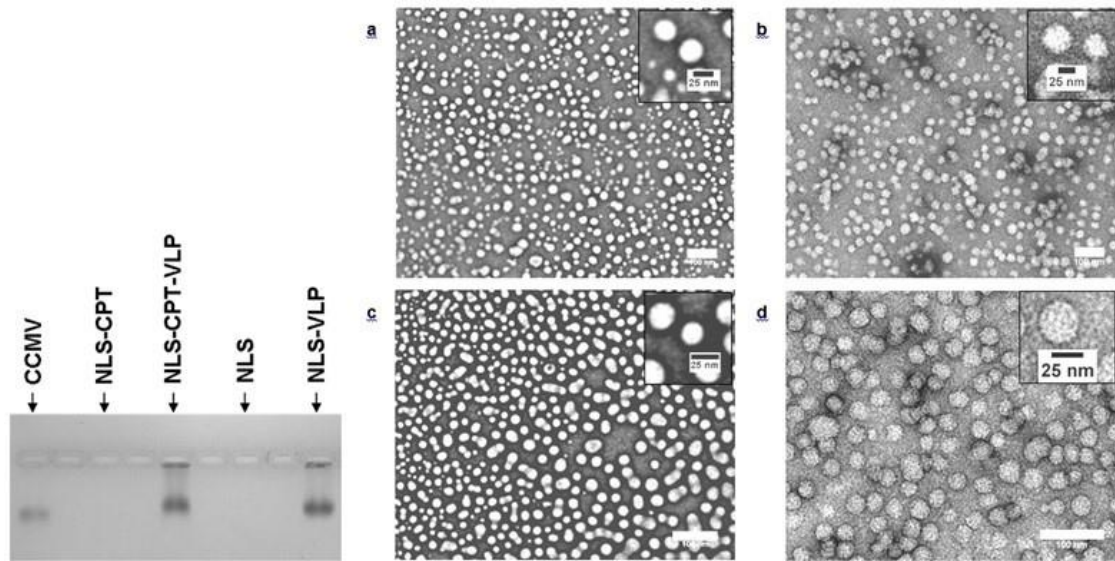


Figura 32. Izquierda: EMSA de CCMV nativo, NLS, NLS CPT y partículas con NLS y NLS CPT. Derecha: Micrografías electrónicas de NLS y NLS CPT (A y C respectivamente) y de partículas de CCMV con NLS y NLS CPT (B y D respectivamente).

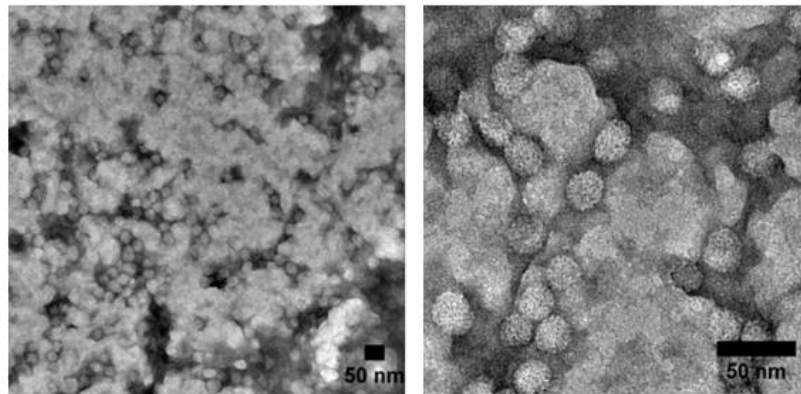


Figura 33. Micrografías electrónicas de transmisión de partículas NLS CPT

3.8 Resumen de resultados más relevantes

En la figura 34 A, se puede notar que las cápsides de CCMV nativas son estables hasta los 42°C con un tiempo de exposición de hasta 3 horas, por lo cual no se presentó ninguna diferencia significativa entre las cápsides nativas y aquellas entrecruzadas con GA hasta una concentración de 1 mM. Al aumentar la temperatura entre los 50° y 60°C el GA es capaz de estabilizar a las cápsides hasta con una concentración de 5 μ M de GA, efecto que se va debilitando conforme aumenta la temperatura, como se puede observar para las cápsides expuestas a 70°C, en donde el GA sólo realiza una estabilización parcial. Asimismo, éste efecto se observa claramente al exponer cápsides entrecruzadas con una mayor cantidad de GA (50 mM) a temperaturas de hasta los 75°C, en donde ya no es posible observar estabilidad alguna. Sin embargo, es necesario realizar estudios de cápsides entrecruzadas con 50 mM de GA y expuestas a 70°C para observar si existe una mejora en la estabilidad bajo estas condiciones y así establecer el rango de reacción del GA con el CCMV.

En los experimentos realizados para determinar la mejor condición de entrecruzado (Fig. 34 B), se observó que las cápsides que fueron entrecruzadas a un pH de 6 en amortiguador de fosfatos, presentaron la mejor estabilidad (aunque no completa) al ser expuestas a una temperatura de 70°C, lo cual coincide con las especificaciones del glutaraldehído, que aconsejan no realizar el entrecruzado a pH ácidos.

La importancia de la concentración de GA se hace clara al exponer cápsides nativas de CCMV y cápsides entrecruzadas con concentraciones que van de 0.5 a 50 mM a condiciones de desensamblaje (Fig. 34 C), es decir, con 0.5 y 1 M de cloruro de sodio a pH 7.5, siendo sólo las fueron entrecruzadas con una mayor concentración de GA las que lograron mantenerse estables bajo esas condiciones. De igual manera, en la figura 34 D se observa el mismo efecto de la concentración de GA, ya que solamente las cápsides entrecruzadas con 50 mM de GA fueron capaces de mantenerse intactas a pHs de 7.5 y 8, a comparación de las nativas y aquellas que fueron entrecruzadas con bajas concentraciones de GA (hasta 5 μ M). Asimismo, es necesario realizar un análisis

de cápsides entrecruzadas con 50 mM de GA y expuestas a pH de 9 o más, para determinar el límite en pH de estabilidad de las cápsides.

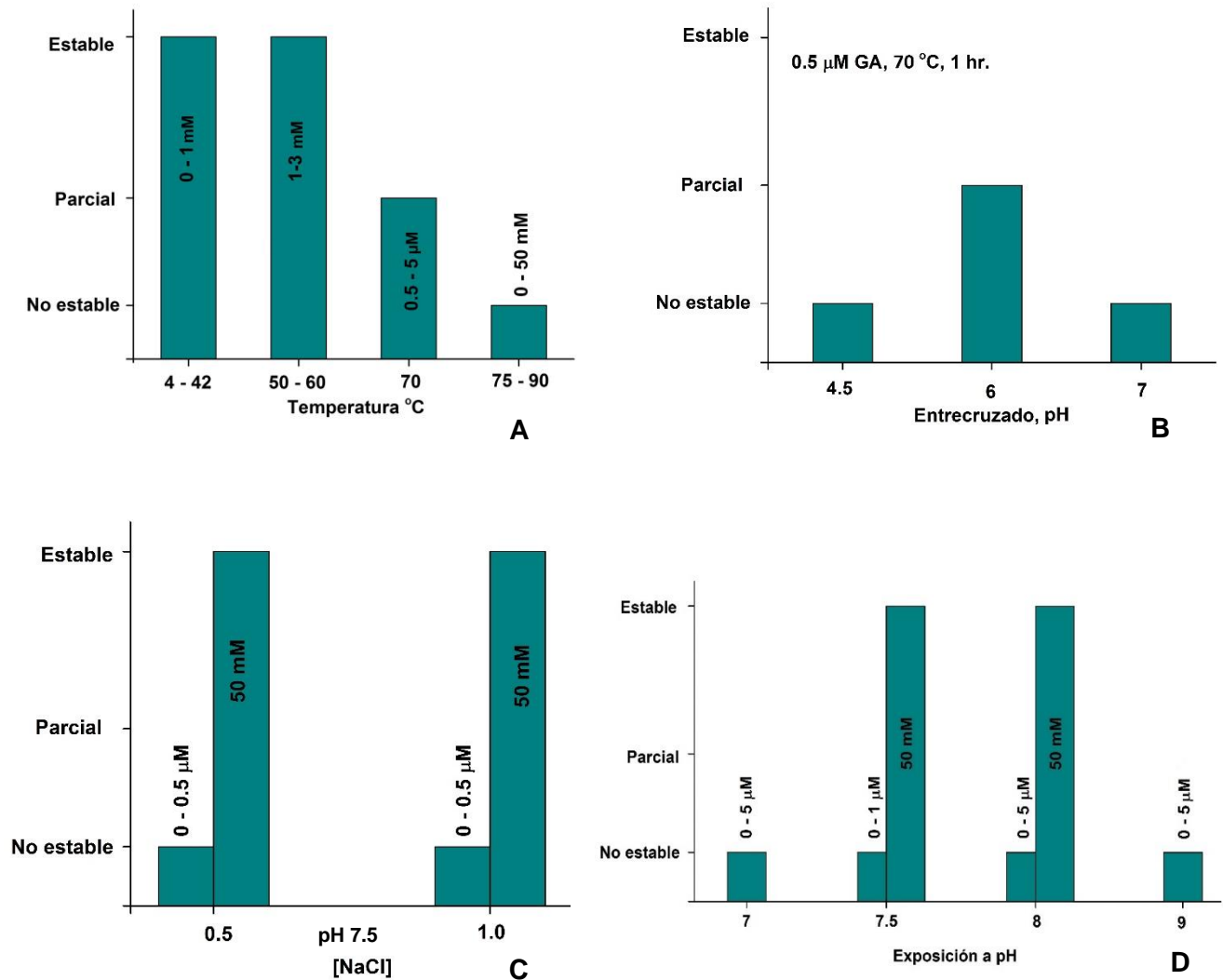


Figura 34. Resumen de resultados más relevantes. A: Cápsides de CCMV nativas y CCMV entrecruzadas a diferentes temperaturas. B: Ensayo de entrecruzado a diferentes pH y expuestos a 70°C durante una hora. C: Cápsides de CCMV nativas y CCMV entrecruzadas con diferentes concentraciones de GA y expuestas a pH 7.5 con 0.5 y 1M de cloruro de sodio. D: Cápsides de CCMV nativas y CCMV entrecruzadas con diferentes concentraciones de GA y expuestas a pH 7, 7.5, 8 y 9.

Capítulo 4. Discusión

Se ha demostrado con los trabajos realizados en VLPs de CCMV de Minten J. et al. (2011) sobre la encapsidación múltiple de enzimas, y con los estudios de Sánchez-Sánchez et al. (2014) relacionado a la activación de pro-fármacos mediante enzimas encapsidadas y de Comellas-Aragonés et al. (2007) entre muchos otros, el amplio potencial que presenta el CCMV para su utilización en biomedicina, ya sea como sólo vehículos, nanocontenedores o bionanorreactores. Debido a esto, la obtención de la proteína de cápside recombinante del CCMV de manera rápida, eficiente y lo más pura posible representa un paso imprescindible para la aplicación de éste virus en biomedicina.

Con base en lo anterior, en el presente estudio se desarrolló un procedimiento eficiente para la producción y purificación de la proteína de cápside del CCMV en el sistema de expresión de *E. coli*, el cual mostró un rendimiento considerable (2.65 mg/L) en comparación con los protocolos que actualmente se encuentran registrados, como *Pichia pastoris* (0.05 – 0.5 mg/L, Brumfield et al. 2004) y en comparación con el rendimiento registrado para la producción de CCMV en su planta nativa (0.2 – 0.4 mg por gramo de hoja; Lane L. C., 1974), realizando cambios en los tiempos de inducción y en presencia de glucosa. Con esto último, es importante recalcar que para poder obtener CCMV a partir de su planta nativa se requiere de instalaciones especiales con ambiente controlado (invernadero), recursos (agua) y aproximadamente 3 semanas (en la estación óptima) para poder obtener CCMV, contrastando con el corto tiempo en el método de expresión heteróloga presentado en este estudio.

Una de las desventajas que presenta el utilizar al glutaraldehído como medio para la estabilización de las cápsides es que a pesar de ser altamente estudiado, sus propiedades y método de acción son poco entendidos debido a su dinámico comportamiento en solución (Migneault et al., 2004). Así mismo, estudios realizados sobre la actividad de glutaraldehído en proteínas cristalizadas (Silva et al., 2004) demuestran la posible formación de oligómeros de GA si se adhiere toda la concentración en una sola dosis (Protocolos 1, 2, 4 y 5), lo que podría explicar el

cambio en la movilidad electroforética de algunas de las muestras analizadas mediante EMSA (Figs. 15 – 17). Asimismo, con base a lo observado en el presente estudio en las reacciones de entrecruzado realizadas mediante el protocolo 1 y 2, es necesario recalcar la importancia de detener la reacción (en este caso con glicina) del glutaraldehído ya que de lo contrario podría ser el causante de agregados de proteínas, evitando así la migración de las muestras en los ensayos de movilidad electroforética (comparación entre Figuras 14 y 15) y evitar su correcto análisis.

Con base en estos estudios realizados por Silva et al. (2004) y a los resultados obtenidos en este trabajo de investigación con respecto a las reacciones de entrecruzado basadas en la metodología de Ng J. y colaboradores (2000) (Protocolo 3), las cuales no muestran grandes cambios en la intensidad de las bandas a comparación de las nativas ni retraso en la movilidad electroforética (Fig. 18), es posible inferir que la diferencia en la intensidad de las bandas de las reacciones realizadas con el protocolo 2 (Fig. 17), su movilidad electroforética retardada en comparación con las nativas, correspondientes a las concentraciones de GA (a mayor concentración, menor intensidad de la banda y menor movilidad electroforética) y la falta de estabilidad de las cápsides entrecruzadas con este método y que han sido expuestas a condiciones de desensamblaje, se deba a la oligomerización propia del GA, minimizando la cantidad de GA libre disponible para el entrecruzamiento y posiblemente ocasionando la formación de agregados de cápsides proteicas. Es importante notar que este comportamiento también se observa al entrecruzar las cápsides con el método corto (protocolo 4, Fig. 21), comparando la concentración de GA de 5 μM , con la de 0.5 μM , ya que este método no considera la diálisis para incorporar de manera paulatina el GA. La utilización del protocolo 3 (Ng, Liu, and Perry, 2000) puede permitir el incremento de la disponibilidad de GA soluble en el medio en el que se encuentran las cápsides conforme aumenta el tiempo de diálisis, es decir, la incorporación paulatina del mismo, y obtener de esta manera un incremento en la concentración final de GA en la cápside mayor que la inicial.

Asimismo, las estabilizaciones realizadas a pH 6 en amortiguador de fosfatos (Protocolo 5, Fig. 23) y el incremento de la concentración de GA utilizado pudo haber sido un

factor importante en el aumento de la estabilidad de los viriones entrecruzados ya que al realizarse la estabilización a pH ácidos (Protocolos 1, 2, 3 y 4. pH 4.5) las cápsides se encuentran protonadas, efecto que podría retardar la acción del glutaraldehído para la estabilización, necesitando de mayores tiempos de diálisis. Y al contrario, cuando se realizó la estabilización a pH 7 (Protocolo 5, pH 7, Figs. 23-25) tampoco se obtuvo una buena estabilización, lo cual puede deberse a que a éste pH las cápsides se encuentran ensanchadas, efecto que es provocado por el aumento de la distancia entre aminoácidos, causando una disminución en aminoácidos entrecruzados. De la misma manera es importante determinar los componentes de los amortiguadores utilizados, ya que si se necesita utilizar amortiguador con TRIS o cualquier otro que presente aminas primarias es posible que el glutaraldehído no realice el efecto deseado, ya que podría reaccionar con las aminas primarias del amortiguador en lugar de reaccionar con las de la proteína de interés, disminuyendo su acción estabilizadora.

Por otro lado, las cápsides nativas de CCMV y entrecruzadas utilizando el protocolo 6 (Figs. 27 y 28) mostraron una alta estabilidad al ser expuestas a pH de 7.5 y 8, y a una fuerza iónica de 0.5 y 1M de NaCl (Fig. 30) en comparación de las cápsides nativas (es decir, sin GA) y de cápsides entrecruzadas con otras concentraciones de GA (Protocolo 5, de 0.5 a 5 μ M GA, Fig. 27 y 28). Asimismo, se hace evidente la eficacia del método de entrecruzamiento paulatino (Protocolo 6, diálisis durante 6 horas en amortiguador de fosfatos, pH 6 con 50 mM de GA) al momento de comparar el virus nativo con el virus entrecruzado de esta manera, ya que no presenta una disminución en la intensidad de las bandas, ni cambios en la movilidad electroforética. Esto último, aunado a las imágenes obtenidas por medio de microscopia electrónica de transmisión, que muestran las cápsides individuales y en su forma típica, obtenidas para las cápsides entrecruzadas con ese mismo protocolo (y sin ningún otro tratamiento) prueban que éste método es adecuado si se requiere estabilizar el CCMV para ser utilizado o expuesto a condiciones desfavorables que puedan desensamblarlo. Es importante mencionar que el CCMV nativo se desensambla a pH 7.5, con una fuerza iónica 0.5 NaCl, y a 4°C.

Sin embargo, en los ensayos de movilidad electroforética y en las micrografías electrónicas de las muestras entrecruzadas mediante el protocolo 6 (50 mM de GA, Fig. 28 B) y expuestas a un pH 8, se observa un grado de “agregación” de las cápsides virales. Dado que las cápsides nativas de CCMV no son capaces de mantener su integridad (en absoluto) a estas condiciones de pH, es posible adjudicar este efecto de agregación al GA. No obstante, es necesario realizar más ensayos para determinar si es por una unión covalente de sitios activos del GA (que no se haya detenido la reacción debidamente) o si es por interacciones electroestáticas de las proteínas de la cápside a este pH (de lo cual no hay evidencia alguna ya que no es posible estudiar el CCMV nativo bajo estas condiciones).

Así mismo, estos estudios demuestran el potencial del GA como estabilizador de cápsides virales para ser utilizados como bionanorreactores, por ejemplo para VLPs del P22 con actividad enzimática CYP 450 para la activación del pro-fármaco Tamoxifen y el CCMV con actividad enzimática L-Asparaginasa con Asparagina como sustrato, ya que al permitir el paso del bromuro de etidio (peso molecular de 394.3 Da) al interior de las cápsides entrecruzadas con GA, es posible que también permita el paso a moléculas como el tamoxifen (371.51 Da) y asparagina (132.11 Da).

Por otro lado, los ensayos de temperatura indican que el virus nativo de CCMV (es decir, sin tratamiento con GA) es resistente a temperaturas hasta los 42°C (Figs. 15, 16 y 18). Sin embargo, cuando se expone a temperaturas de 60°C la integridad del virus se ve afectada en comparación del virus entrecruzado con GA, el cual es posible observar que a esa temperatura mantiene gran parte de su integridad en comparación con el virus nativo (Figs. 17 y 19). En esto último, cabe mencionar que en el ensayo de temperatura en donde se obtuvo una banda clara para las cápsides nativas y calentadas a 60°C durante una hora (Fig. 21) se utilizó una cepa de CCMV purificada con magnesio (el resto de las muestras utilizadas no fueron purificadas con magnesio, y se les colocó EDTA), lo cual con base a lo establecido por Bancroft (1969) le provee una mayor estabilidad al virus nativo, efecto que pudo provocar su estabilidad a altas temperaturas en comparación de aquellas que fueron purificadas en presencia de EDTA (agente quelante que secuestra iones metálicos).

Al aumentar la concentración de GA a 50 mM y realizar un entrecruzado con estas condiciones, y al exponerlas a una temperatura de 70°C no fue posible observar una banda intensa, aunque si es posible observar una muy ligera con 5 uM de GA a 70 °C (Fig. 23 y 24), indicando una pérdida de la integridad en la gran mayoría de los viriones, por lo que es posible que el glutaraldehído tenga un límite de estabilidad térmica que se encuentra cercano a los 70°C.

En este punto es importante notar que si bien las cápsides entrecruzadas son capaces de mantenerse estables cerca de éstas temperaturas (70°C) es altamente probable que pueda mantenerlas durante más tiempo (posiblemente días) a temperatura ambiente, característica importante para el almacenamiento de vacunas u otro tipo de fármacos (sin embargo es necesario realizar los estudios correspondientes antes de asegurarlo).

Las VLPs de CCMV conteniendo L-Asparaginasa (Fig. 33) y aquellas conteniendo liposomas con camptotesina (Fig. 32) que fueron entrecruzadas con 50 mM de GA (Protocolo 6) al observarlas en las micrografías electrónicas, no muestran ningún tipo de aberraciones morfológicas (fracciones de cápsides incompletas) o agregación, indicando que es posible el entrecruzado de partículas tipo virus con cargo. Sin embargo, en las micrografías electrónicas obtenidas para las VLPs conteniendo NLS-CPT se observan estructuras de mayor tamaño que asemejan una masa amorfa que cubre la mayor parte de las micrografías. Esto puede deberse a que durante la encapsidación de los liposomas con camptotesina hayan quedado liposomas libres, permitiendo su fusión y la formación de éstos agregados.

Capítulo 5. Conclusiones

-La expresión y purificación de la proteína recombinante de la cápside del CCMV en *E.coli* es un excelente sistema para obtener un alto rendimiento de proteína, de mejor calidad (sin contaminantes) y con un alto potencial para la síntesis de VLPs, en comparación con los métodos que se han publicado hasta el momento.

- El entrecruzado de la cápside del CCMV realizado a bajas concentraciones (0.5 a 5 μ M) de GA, no es capaz de proteger al CCMV contra condiciones de pH de 7.5 a 8, y de fuerza iónica de 0.5 y 1M de cloruro de sodio (NaCl) en amortiguador de fosfatos pH 7.5.

-Las estabilizaciones realizadas en el presente estudio, utilizando métodos de incorporación del glutaraldehído mediante diálisis, representan el mejor procedimiento para realizar el entrecruzado de las proteínas de cápside del CCMV, debido a que al incorporar de manera paulatina el glutaraldehído es posible que se evite la formación de oligómeros del mismo.

-Los entrecruzados realizados con 50 mM de glutaraldehído de manera paulatina, son capaces de proteger la integridad de las cápsides de CCMV contra condiciones desfavorables para el virus nativo, es decir, pH 7.5 y 8, y de fuerza iónica de 0.5 y 1M de cloruro de sodio (NaCl) en pH 7.5.

-La metodología utilizada para la estabilización de las cápsides de CCMV con 50 mM de glutaraldehído (sin ningún otro tratamiento) permite el entrecruzado de las proteínas que componen la proteína de cápside del CCMV nativo y de VLPs con cargo (en este caso L-Asparaginasa y liposomas con camptotesina) sin originar agregados que podrían provocar alguna aflicción médica.

-En este trabajo se obtuvo un método para la estabilización de cápsides virales utilizando una concentración de glutaraldehído al 50 mM, capaz de proteger las cápsides de CCMV a altas temperaturas, indicando un límite de al menos 70°C.

-De los métodos de entrecruzado analizados en el presente estudio, las estabilizaciones realizadas mediante el protocolo 6, que consiste en dializar las cápsides contra 50 mM de GA en amortiguador de fosfatos, para posteriormente remover el exceso de glutaraldehído y detener la reacción (en este estudio, mediante glicina), representa un procedimiento óptimo para la estabilización de cápsides de CCMV. Por lo tanto, este protocolo exhibe un alto potencial para la obtención de bionanorreactores estables basados en diferentes virus (P22, VP1, entre otros).

Capítulo 6. Perspectivas

-Es necesario realizar un estudio de inmunogenicidad y/o toxicidad de cápsides entrecruzadas con altas concentraciones de glutaraldehído, ya que dentro de sus potenciales aplicaciones esta su uso como vehículos terapéuticos, deberán proteger su cargo y evitar alguna reacción desfavorable hacia el tratamiento.

-Realizar pruebas de nanoindentación de microscopía de fuerza atómica que nos permita obtener información detallada sobre la resistencia (o dureza) de las cápsides nativas (sin glutaraldehído) en comparación de aquellas que fueron tratadas con 50 mM de glutaraldehído.

-Al utilizar las VLPs como vehículo de enzimas, es necesario verificar que el tratamiento con 50 mM de glutaraldehído no desactiva la capacidad catalítica de la enzima cargo. Por lo tanto será necesario realizar los ensayos de la actividad enzimática después del entrecruzado con glutaraldehído de la VLP que contenga la enzima de interés.

-Realizar el entrecruzado de las cápsides de otros virus con potencial uso en biomedicina (como el bacteriófago P22)

-Estudiar la estabilidad de las cápsides entrecruzadas y con enzimas como cargo bajo tratamientos con proteasas como tripsina, quimio tripsina y proteína K.

-Analizar el efecto estabilizador de cápsides virales del glutaraldehído en comparación con otros agentes entrecruzantes como el DCC (N,N'-Diciclohexilcarbodiimina), EDC (3-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimina), entre otros.

Glosario

CCMV: Virus del moteado clorótico del frijol caupí (Cowpea chlorotic mottle virus)

CPT: Camptotesina

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético (Ethylenediaminetetraacetic acid)

EMSA: Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (Electrophoretic movility shift assay)

Espectroscopía UV-VIS: Espectroscopía de luz ultravioleta-visible

GA: Glutaraldehído

KCM: Amortiguador de cloruro de potasio (KCl), cloruro de calcio (CaCl_2) y cloruro de magnesio (MgCl_2)

NLS-CPT: Nanolipoesferas conteniendo camptotesina

NLS: Nanolipoesferas (Nanolipospheres)

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis)

PSA: Persulfato de amonio

TEMED: Tetrametiletildiamina

VLPs: Partículas tipo virus (Virus-Like Particles)

Lista de referencias bibliográficas

- Azizgolshani, Odisse, Rees F. Garmann, Ruben Cadena-Nava, Charles M. Knobler, and William M. Gelbart. (2013). "Reconstituted Plant Viral Capsids Can Release Genes to Mammalian Cells." *Virology* 441 (1). Elsevier: 12–17.
- Bancroft, J B, E Hiebert, and C E Bracker. (1969). "The Effects of Various Polyanions on Shell Formation of Some Spherical Viruses." *Virology* 39 (4): 924–30.
- Brumfield, Susan, Deborah Willits, Liang Tang, John E. Johnson, Trevor Douglas, and Mark Young. (2004). Heterologous Expression of the Modified Coat Protein of Cowpea Chlorotic Mottle Bromovirus Results in the Assembly of Protein Cages with Altered Architectures and Function. *Journal of General Virology* 85 (4): 1049–53.
- C. Lane, Leslie. (1974). The Bromoviruses. *Advances in Virus Research* 19: 151–220.
- Cadena-Nava, R. D., M. Comas-Garcia, R. F. Garmann, a. L. N. Rao, C. M. Knobler, and W. M. Gelbart. (2012). Self-Assembly of Viral Capsid Protein and RNA Molecules of Different Sizes: Requirement for a Specific High Protein/RNA Mass Ratio. *Journal of Virology* 86 (6): 3318–26..
- Cadena-Nava, Ruben D, and Mauricio Comas-Garcia. (2009). CCMV Purification Protocol SOP for CCMV Purification, 15–18.
- Carter, J Mark. (1996). Conjugation of Peptides to Carrier Proteins via Glutaraldehyde. *The Protein Protocols Handbook*, no. 4: 679–87.
- Chang, Juan, Peter Weigele, and Jonathan King. (2006). Cryo-EM Asymmetric Reconstruction of Bacteriophage P22 Reveals Organization of Its DNA Packaging and Infecting Machinery, no. June: 1073–82.
- Comellas-Aragonès, Marta, Hans Engelkamp, Victor I Claessen, Nico a J M Sommerdijk, Alan E Rowan, Peter C M Christianen, Jan C Maan, Benedictus J M Verduin, Jeroen J L M Cornelissen, and Roeland J M Nolte. (2007). A Virus-Based Single-Enzyme Nanoreactor. *Nature Nanotechnology* 2 (10): 635–39.
- Fox, James M, Guoji Wang, Jeffrey A Speir, Norm H Olson, John E Johnson, Timothy S Baker, and Mark J Young. (1998). Comparison of the Native CCMV Virion with in Vitro Assembled CCMV Virions by Cryoelectron Microscopy and Image Reconstruction. 218: 212–18.
- Hellman, Lance M, and Michael G Fried. (2009). Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detecting Protein-Nucleic Acid Interactions 2 (8): 1849–61. doi:10.1038/nprot.2007.249.Electrophoretic.
- Kaiser, Coleen R., Michelle L. Flenniken, Eric Gillitzer, Ann L. Harmsen, Allen G. Harmsen, Mark a. Jutila, Trevor Douglas, and Mark J. Young. (2007). Biodistribution

Studies of Protein Cage Nanoparticles Demonstrate Broad Tissue Distribution and Rapid Clearance in Vivo. *International Journal of Nanomedicine* 2 (4): 715–33.

Migneault, Isabelle, Catherine Dartiguenave, Michel J. Bertrand, and Karen C. Waldron. (2004). Glutaraldehyde: Behavior in Aqueous Solution, Reaction with Proteins, and Application to Enzyme Crosslinking. *BioTechniques* 37 (5): 790–802.

Minten, Inge J., Victor I. Claessen, Kerstin Blank, Alan E. Rowan, Roeland J. M. Nolte, and Jeroen J. L. M. Cornelissen. (2011). Catalytic Capsids: The Art of Confinement. *Chemical Science* 2 (2): 358.

Ng, J C, S Liu, and K L Perry. (2000). Cucumber Mosaic Virus Mutants with Altered Physical Properties and Defective in Aphid Vector Transmission. *Virology* 276 (2): 395–403.

O'Neil, Alison, Peter E. Prevelige, and Trevor Douglas. (2013). Stabilizing Viral Nano-Reactors for Nerve-Agent Degradation. *Biomaterials Science* 1 (8): 881.

Patterson, Dustin P., Peter E. Prevelige, and Trevor Douglas. (2012). Nanoreactors by Programmed Enzyme Encapsulation inside the Capsid of the Bacteriophage P22. *ACS Nano* 6 (6): 5000–5009.

Payne, J W. (1973). Polymerization of Proteins with Glutaraldehyde. Soluble Molecular-Weight Markers. *The Biochemical Journal* 135 (4): 867–73.

Sabatini, D. D., K. Bensch, and R. J. Barrnett. (1963). Cytochemistry and Electron Microscopy. The Preservation of Cellular Ultrastructure and Enzymatic Activity by Aldehyde Fixation. *The Journal of Cell Biology* 17: 19–58.

Sánchez Díaz Aldo Efrén (2015). Encapsidación de L-Asparaginasa de *Escherichia coli* en partículas tipo virus del CCMV. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 40 p.

Sánchez-Sánchez, Lorena, Rubén D. Cadena-Nava, Laura a. Palomares, Jaime Ruiz-Garcia, Melissa S T Koay, Jeroen J M T Cornelissen, and Rafael Vazquez-Duhalt. (2014). Chemotherapy pro-Drug Activation by Biocatalytic Virus-like Nanoparticles Containing Cytochrome P450. *Enzyme and Microbial Technology* 60 (June). Elsevier Inc.: 24–31.

Sánchez-Sánchez L., Tapia-Moreno A., Juarez-Moreno K., Patterson D.P., Cadena-Nava R.D., Douglas T., and Vazquez-Duhalt R. (2015) Design of a VLP-nanovehicle for CYP450 enzymatic activity delivery. *J. Nanobiotechnol.* 13: 66.

Silva, Carla J S M, Fernanda Sousa, Georg Gübitz, and Artur Cavaco-Paulo. (2004). Chemical Modifications on Proteins Using Glutaraldehyde. *Food Technology and Biotechnology* 42 (1): 51–56.

- Smith, Derek R, and Rui-Sheng Wang. (2006). Glutaraldehyde Exposure and Its Occupational Impact in the Health Care Environment. *Environmental Health and Preventive Medicine* 11 (1): 3–10.
- Vriend, G, J G Schilthuis, B J M Verduin, and M A Hemminga. (1984). Saturation-Transfer ESR Spectroscopy on Maleimide Spin-Labeled Cowpea Chlorotic Mottle Virus. *Journal of Magnetic Resonance*.