



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Generación y caracterización de un sistema de nanoacarreo basado en nanopartículas de fructanas capaz de llegar al cerebro

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en ciencias

P R E S E N T A:

Biól. Maura Jennifer Martínez Morales

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Clarita Olvera Carranza
[Instituto de biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Leonor Pérez Martínez
[Instituto de biotecnología, UNAM](#)

Dr. Raymundo David Valdez Echeverría
[Instituto Nacional de Ciencias de la Salud y Nutrición Salvador Zubirán](#)

Ciudad de México. Junio, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Polímeros Biocompatibles y Nanotecnología adscrito al Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Clarita Olvera Carranza.

El proyecto fue financiado por la Universidad Nacional Autónoma de México por el programa **DGAPA-PAPIIT** a través del proyecto **IN227723** y por el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONAHCYT**) a través de la beca no. 1146371 y por el Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (**PAEP**).

DEDICATORIA

A mi familia

A mi madre, por motivarme a luchar por mis sueños y no rendirme, Gracias por ser mi guía, por todo tu amor y apoyo constante, este logro nos pertenece a ambas.

A mi hermana Jessica, por todo su apoyo incondicional, por estar siempre a mi lado y por darme palabras de aliento cuando todo parece difícil. Gracias por ser mi confidente y por ser una inspiración en mi vida.

A mi hermano Arturo, porque sé que, a pesar de la distancia, siempre estás para mí. Me has enseñado que la perseverancia y las ganas de superación no tienen edad.

A Adrián, César y Uriel, por su comprensión y apoyo. Gracias por ser parte de mi familia; su compañía y cariño ha sido muy importante en este camino.

A Ámbar por ser mi compañera, por desvelarse conmigo cuando debía trabajar hasta tarde en la computadora, y por darle alegría a mis días.

Con todo mi amor para ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Clarita Olvera Carranza por todo su apoyo durante mi formación académica, por transmitirme su pasión por la investigación, por creer en mí y dejar una gran huella en mi desarrollo académico y personal.

A la Dra. Marcela Ayala Aceves por sus valiosas aportaciones a mi trabajo, por su apoyo en todo momento y por formar parte de mi crecimiento académico desde que llegué a su grupo de investigación.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Leonor Pérez Martínez y Dr. Raymundo David Valdez Echeverría.

A los integrantes del jurado: Dr. Armando Hernández, Dra. Claudia Martínez, Dr. Gerardo Leyva, Dra. Wendy Xolalpa y Dr. Victor Bermudez, por sus comentarios y observaciones que enriquecieron este trabajo

A la Biól. Rosa Román Miranda por su orientación, tiempo y ayuda técnica.

A la Dra. Verónica Rojo, el Dr. Edgar Neri y al Biól. Alid, por su ayuda en los ensayos *in vivo*.

A Alina y al grupo de la Dra. Marcela por sus comentarios, aportaciones e ideas tan acertadas, gracias por el enriquecimiento a este trabajo.

A mis compañeros del grupo polímeros biocompatibles, a Joel, Ceci, Salvador, Gerardo, Miguel, Memo e Ingrid por su tiempo dedicado a las discusiones de resultados y seminarios y, por todas sus aportaciones a mi tesis de maestría.

A mis amigos Azeret y Emmanuel por todo su apoyo, por estar siempre conmigo y por compartir todos los buenos y malos momentos durante estos últimos tres años.

ÍNDICE

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| RECONOCIMIENTOS | 3 |
| AGRADECIMIENTOS | 4 |
| ÍNDICE | 5 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 7 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 9 |
| ABREVIATURAS | 10 |
| RESUMEN | 11 |
| INTRODUCCIÓN | 13 |
| 1 MARCO TEÓRICO | 15 |
| 1.1 NANOBIOTECNOLOGÍA | 15 |
| 1.2 NANOPARTÍCULAS | 15 |
| 1.2.1 <i>Nanopartículas poliméricas</i> | 17 |
| 1.2.1.1 Nanopartículas de fructanas y fructansacarosas | 19 |
| 1.2.1.2 Propiedades biológicas de las nanopartículas de fructanas | 24 |
| 1.3 CEREBRO Y LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA | 26 |
| 1.3.1 <i>Vías de transporte a través de la barrera hematoencefálica</i> | 27 |
| 1.4 NANOPARTÍCULAS COMO SISTEMA DE ADMINISTRACIÓN DE COMPUESTOS AL CEREBRO | 28 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 30 |
| JUSTIFICACIÓN | 31 |
| HIPÓTESIS | 32 |
| OBJETIVOS | 33 |
| OBJETIVO GENERAL | 33 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 33 |
| ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 34 |
| 2 METODOLOGÍA | 35 |
| 2.1 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS VERSIONES TRUNCADAS DE LEV5 DE <i>LEUCONOSTOC MESAENTEROIDES</i> | 35 |
| 2.1.1 <i>Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes</i> | 35 |
| 2.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA | 36 |
| 2.2.1 <i>Cuantificación de proteínas</i> | 36 |
| 2.2.2 <i>Ensayos de actividad enzimática</i> | 36 |
| 2.2.2.1 Determinación de las constantes cinéticas | 37 |
| 2.3 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN DE NPS | 38 |
| 2.4 CUANTIFICACIÓN DE LA CANTIDAD DE POLÍMERO DE ALTO PESO MOLECULAR POR HPLC | 38 |
| 2.5 OBSERVACIÓN DE NPS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM) | 38 |
| 2.6 DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LAS NPS DE FRUCTANAS | 39 |
| 2.7 MEDICIÓN DEL TAMAÑO DE NPS E ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS) | 40 |
| 2.8 IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS EMPLEANDO DLS Y NTA | 40 |
| 2.9 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA NPL-ICG | 40 |
| 2.9.1 <i>Cinética de atrapamiento del colorante ICG</i> | 41 |
| 2.9.2 <i>Determinación de la eficiencia de atrapamiento y la capacidad de carga</i> | 41 |
| 2.9.3 <i>Cinética de liberación del colorante ICG y estabilidad del sistema NPL-ICG</i> | 41 |
| 2.10 ANÁLISIS DE LA FLUORESCENCIA DE LAS NPL | 41 |

| | | |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.11 | ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS NPL..... | 42 |
| 2.12 | GENERACIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE FRUCTANAS | 42 |
| 3 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 43 |
| 3.1 | SELECCIÓN DE NPs DE FRUCTANAS BASADA EN SU PROCESO DE PRODUCCIÓN Y SU POTENCIAL PARA ATRAVESAR LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA..... | 43 |
| 3.1.1 | <i>Análisis de las características de las enzimas productoras de NPs de fructanas.....</i> | 43 |
| 3.1.2 | <i>Estudio del proceso de síntesis de las NPs de fructanas desarrollado por las enzimas ΔN85C y LevS Tn38</i> | 44 |
| 3.1.3 | <i>Análisis de la morfología de las NPs de fructanas sintetizadas por las enzimas ΔN85C y LevS Tn38</i> | 47 |
| 3.1.4 | <i>Determinación del tamaño de las NPs de fructanas sintetizadas por las enzimas IslA4 y LevS N70 Tn38</i> | 48 |
| 3.1.5 | <i>Determinación de la solubilidad de las NPs de fructanas</i> | 50 |
| 3.1.6 | <i>Selección del sistema de atrapamiento y liberación basado en NPs de fructanas</i> | 51 |
| 3.2 | ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LAS NPs DE FRUCTANAS PARA CRUZAR LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA MEDIANTE EL ANÁLISIS DE BIODISTRIBUCIÓN <i>IN VIVO</i> EN MODELOS MURINOS..... | 53 |
| 3.2.1 | <i>Síntesis del sistema de atrapamiento NPL-ICG</i> | 54 |
| 3.2.1.1 | Efecto de la adición del colorante ICG en la síntesis y características de las nanopartículas de levana | 54 |
| 3.2.1.2 | Estudio de la cinética de atrapamiento del colorante ICG en las nanopartículas de levana | 55 |
| 3.2.1.3 | Estudio de la cinética de liberación del colorante ICG y estabilidad del sistema NPL-ICG..... | 57 |
| 3.3 | ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LAS NPs DE LEVANA PARA LLEGAR AL CEREBRO | 59 |
| 3.3.1 | <i>Estudio de la fluorescencia de las NPs de levana para los estudios in vivo.....</i> | 59 |
| 3.3.2 | <i>Análisis de la biodistribución del colorante ICG libre en modelos murinos</i> | 62 |
| | CONCLUSIONES | 66 |
| | PERSPECTIVAS | 67 |
| | BIBLIOGRAFÍA..... | 68 |
| | ANEXOS..... | 73 |
| A. | IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE NPs EMPLEANDO DLS | 73 |
| B. | ESTABILIDAD DEL COLORANTE ICG A LA TEMPERATURA | 76 |
| A.B.1 | <i>Estabilidad del colorante ICG a la temperatura de inactivación enzimática</i> | 76 |
| C. | CINÉTICA DE FORMACIÓN DE NPs DE LEVANA..... | 76 |
| D. | DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS DE LAS FRUCTANSACARASAS Δ N85C Y LEVS N70 Tn38..... | 77 |
| E. | DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LAS NPL Y EL SISTEMA NPL-ICG POR DLS | 78 |
| F. | ANÁLISIS DE LA ABSORBANCIA DE LAS NANOPARTÍCULAS A DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA | 79 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1.I. REPRESENTACIÓN DE DIFERENTES TIPOS DE NANOPARTÍCULAS. MODIFICADO DE GESSNER & NEUNDORF, 2020; CHENG ET AL., 2022. | 16 |
| FIGURA 1.II. ESQUEMA DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA A TRAVÉS DE LA QUE SE DA LA SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE FRUCTANAS. | 20 |
| FIGURA 1.III. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS FRUCTANSACARASAS A) SACB H243L, B) ISLA4, C) ΔN85C Y D) LEVS N70 TN38. TOMADO DE RAGA-CARBAJAL ET AL., 2021; MERCADO, 2024. MODELOS REALIZADOS EN ALPHA FOLD A EXCEPCIÓN DE LA ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE SACB PDB: 6PWQ..... | 20 |
| FIGURA 1.IV. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS FRUCTANAS: A) LEVANA CON ENLACE B(2-6), Y B) INULINA CON ENLACE B(2-1), (DUŠEK, 2002). | 21 |
| FIGURA 1.V. MORFOLOGÍA DE LAS NANOPARTÍCULAS DE FRUCTANAS OBSERVADA POR TEM: A,B) INULINA, Y C) LEVANA. TOMADO DE JIMÉNEZ-SÁNCHEZ ET AL., 2019 Y QUIÑONES, 2015. | 23 |
| FIGURA 1.VI. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA FORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS: A) CADENAS DE FRUCTANAS, B) FORMACIÓN DE PUENTES DE HIDRÓGENO GLUCOSA-FRUCTOSA, Y C) FORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS. MODIFICADO DE MEDRANO, 2018 | 24 |
| FIGURA 1.VII. ANÁLISIS DE LA CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE FRUCTANAS DE ALTO PESO MOLECULAR: A) CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE INULINA EN EL CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS; B, C, Y D) CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE LEVANA; B) INDUCCIÓN EN LA ACTIVIDAD DE DEL FACTOR NF-KB CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NANOPARTÍCULAS DE LEVANAS, C) INDUCCIÓN EN LA ACTIVIDAD DEL FACTOR NF-KB EN PRESENCIA DE LPS BACTERIANO Y NANOPARTÍCULAS, Y D) PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS HaCAT EN PRESENCIA DE NANOPARTÍCULAS DE LEVANA. TOMADO DE VALDEZ-ECHEVERRÍA 2021 Y JIMÉNEZ-SÁNCHEZ ET AL., 2019. | 25 |
| FIGURA 1.VIII. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA Y COMPONENTES DE LA UNIDAD NEUROVASCULAR INCLUIDOS LOS ASTROCITOS Y MICROGLÍAS. MODIFICADO DE LACH ET AL., 2023..... | 27 |
| FIGURA 2.I. PROCESO DE ANÁLISIS Y OBTENCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE FRUCTANAS. LA DETERMINACIÓN DE TAMAÑO, POTENCIAL Z Y PDI SE REALIZÓ EN LA MEZCLA DE REACCIÓN, AL IGUAL QUE SU OBSERVACIÓN POR TEM. LOS ENSAYOS DE SOLUBILIDAD SE REALIZARON CON EL POLÍMERO PREVIAMENTE PRECIPITADO Y LIOFILIZADO. | 39 |
| FIGURA 3.I. REPRESENTACIÓN DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LAS FRUCTANSACARASAS BACTERIANAS UNIDOMINIO Y MULTIDOMINIO. VERDE: DOMINIO N-TERMINAL, MORADO: DOMINIO CATALÍTICO, ROSA: REGIÓN DE TRANSICIÓN. | 43 |
| FIGURA 3.II. EFECTO DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN EN LA SÍNTESIS DE POLÍMERO Y TAMAÑO DE NANOPARTÍCULA DE: A) ΔN85C, Y B) LEVS N70 TN38. CONDICIONES DE REACCIÓN A 30 °C, 300 RPM..... | 46 |
| FIGURA 3.III. CONTRIBUCIÓN DE LAS VARIABLES EN LA PRODUCCIÓN DE POLÍMERO DE: A) ΔN85C, Y B) LEVS N70 TN38. AQUELLAS INTERACCIONES QUE PRESENTAN SIGNIFICANCIA SON LAS BARRAS QUE SOBREPASAN LA LÍNEA ROJA. | 47 |
| FIGURA 3.IV. MICROGRAFÍAS DE NANOPARTÍCULAS DE LEVANAS SINTETIZADAS POR REACCIÓN ENZIMÁTICA: A, Y B) LEVS N70 TN38; C, Y D) ΔN85C..... | 48 |
| FIGURA 3.V. DISTRIBUCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE FRUCTANAS DETERMINADO POR NTA: A) DISTRIBUCIÓN TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE INULNA (ISLA4); B) DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE LEVANA (LEVS N70 TN38). | 49 |
| FIGURA 3.VI. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL VERDE DE INDOCIANINA (ICG). | 53 |
| FIGURA 3.VII. EFECTO DE LA ADICIÓN DEL COLORANTE VERDE DE INDOCIANINA EN LA MEZCLA DE REACCIÓN EN LA SÍNTESIS DE PAPM. | 54 |
| FIGURA 3.VIII. ESTUDIO DEL EFECTO EN EL TAMAÑO DE NANOPARTÍCULAS E ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD (PDI) AL ADICIONAR EL COLORANTE ICG A LA MEZCLA DE REACCIÓN DURANTE LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS. LÍNEAS PUNTEADAS REPRESENTAN EL ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD (PDI) Y LAS LÍNEAS CONTINUAS EL TAMAÑO (NM). | 55 |
| FIGURA 3.IX. CINÉTICA DE ATRAPAMIENTO DEL COLORANTE VERDE DE INDOCIANINA (ICG). | 56 |
| FIGURA 3.X. CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL COLORANTE VERDE DE INDOCIANINA (ICG) A CONDICIONES FISIOLÓGICAS 37°C, PH 7.4 DURANTE 12 HORAS Y DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE NANOPARTÍCULA DURANTE LA LIBERACIÓN DEL ICG A LAS MISMAS CONDICIONES. | 58 |
| FIGURA 3.XI. ESPECTRO DE FLUORESCENCIA DEL PBS Y LAS NPL DETERMINADO EN EL FLOUOMETRO A LAS CONDICIONES DE EX(480)-EM(535). NPICGEM: SISTEMA NPL-ICG CONDICIONES DE EMISIÓN; NPICGEXC: SISTEMA NPL-ICG CONDICIONES DE EXCITACIÓN; NPEXC: NPL CONDICIONES DE EXCITACIÓN; NPEM: NPL CONDICIONES DE EMISIÓN; PBSEXC: PBS CONDICIONES DE EXCITACIÓN; PBSEM: PBS CONDICIONES DE EMISIÓN. | 61 |

FIGURA 3.XII. ANÁLISIS DE LA BIODISTRIBUCIÓN DEL ICG LIBRE. AI: BIODISTRIBUCIÓN DEL ICG LIBRE; AII: BIODISTRIBUCIÓN DE LAS NPL. B: FLUORESCENCIA DE ÓRGANOS DE LOS RATONES INYECTADOS CON ICG LIBRE. CONDICIONES Ex(730)-EM (830). HÍGADO, II: RIÑONES, Y III:CEREBRO. 63

FIGURA 3.XIII. FLUORESCENCIA DE ÓRGANOS: A) ADMINISTRACIÓN DE PBS COMO CONTROL; B) ADMINISTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE LEVANA. CONDICIONES Ex(730)-EM(830). I: HÍGADO; II: RIÑONES; III: CEREBRO. 64

FIGURA 3.XIV. FLUORESCENCIA DE ÓRGANOS: A) ADMINISTRACIÓN DE PBS COMO CONTROL; B) ADMINISTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE LEVANA. CONDICIONES Ex(480)-EM(535). I: HÍGADO; II: RIÑONES; III: CEREBRO. 65

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABLA III.1. PARÁMETROS CINÉTICOS DE ISLA4, SACB H243L Y LAS VERSIONES TRUNCADAS DE LEVS (Δ N85C Y LEVS N70 TN38). CONDICIONES ESTÁNDAR DE REACCIÓN: 30° C, 300 RPM, 1 U/ML Y 100 G/L DE SACAROSA. MARTÍNEZ-MORALES, 2021 ^A ; MERCADO, 2022 ^B ; GUILLEN-TINOCO, 2022 ^C ; ESPINOSA, 2022 ^D ; PEÑA-CARDEÑA ET AL., 2015 ^E ; ORTIZ-SOTO ET AL., 2008 ^F | 44 |
| TABLA III.2. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS DE FRUCTANAS EN AGUA. CONDICIONES A LAS QUE SE DETERMINÓ LA SOLUBILIDAD DE LAS NPs: 40° C, 400 RPM DURANTE 40 MINUTOS. CONCENTRACIÓN INICIAL DE POLÍMERO = 150 MG/ML..... | 51 |
| TABLA III.3. PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE LEVANA E INULINA. *JIMÉNEZ-SÁNCHEZ ET AL., 2019. CONDICIONES ÓPTIMAS DE SÍNTESIS: A) 200 G/L DE SACAROSA, 2 U/ML, 30°C Y 350 RPM; B) 100 G/L DE SACAROSA, 1 U/ML DE ENZIMA, 37°C Y 350 RPM; C) 200 G/L SACAROSA, 2 U/ML | 51 |
| TABLA III.4. CARACTERIZACIÓN DE LA EFICIENCIA DE ATRAPAMIENTO Y CAPACIDAD DE CARGA DEL SISTEMA NPL-ICG. CONDICIONES DE REACCIÓN: 200 G/L DE SACAROSA, 2 U/ML, 30 °C Y 350 RPM. | 57 |
| TABLA III.5. CARACTERIZACIÓN LAS NANOPARTÍCULAS DE LEVANA Y DEL SISTEMA NPL-ICG..... | 59 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------|----------------------------------------------|
| NPs: | Nanopartículas |
| NPL: | Nanopartículas de levana |
| NPF: | Nanopartículas de fructanas |
| CAC: | Concentración crítica de agregación |
| LPS: | Lipopolisacárido |
| SNC: | Sistema nervioso central |
| UA: | Unidades de absorbancia |
| IPTG: | Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido |
| DLS: | Dispersión dinámica de luz |
| PDI: | Índice de polidispersidad |
| TEM: | Microscopía electrónica de transmisión |
| ICG: | Verde de indocianina |
| BHE: | Barrera hematoencefálica |
| nm: | nanómetros |
| mV: | milivoltios |
| DNS: | Ácido 3,5-Dinitrosalicílico |

RESUMEN

Las nanopartículas de fructanas están formadas por polímeros de fructosa unidos por enlaces glicosídicos, son esféricas con distribuciones homogéneas de entre 60 y 200 nm, y debido a su naturaleza química no presentan carga. Dependiendo del tipo de enlace que las une, se clasifican en nanopartículas de levana (β 2-6) y de inulina (β 2-1). Ambos tipos de nanopartículas son biodegradables, biocompatibles y estables, por lo que han sido propuestas para su aplicación como nanoacarreadores en sistemas biológicos, recubriendo diferentes fármacos y moléculas para ser empleadas en el área médica.

Con el objetivo de generar más información para la posible aplicación médica de estas nanopartículas, este trabajo de investigación se centró en el estudio de su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro. Para ello, se seleccionó un sistema de nanoacarreo que presentara altos rendimientos de producción respecto a la cantidad de polímero sintetizado y que cumpliera con características idóneas que le permitieran cruzar la barrera hematoencefálica, que incluían presentar un tamaño de entre 70 y 180 nm, que fueran neutras, monodispersas y solubles. En primera instancia, se analizó el rendimiento en la síntesis de las nanopartículas empleando como enzimas la levansacarasa SacB H243L, LevS N70 Tn38 y LevS Δ N85C y la inulosacarasa IsIA4. Se determinó que empleando las enzimas LevS N70 Tn38 y LevS Δ N85C se logran alcanzar rendimientos del 90 al 100 % en la conversión de sustrato en nanopartículas y que este se puede modificar al variar las condiciones de reacción, principalmente la concentración de sustrato y enzima.

Al analizar las características de las nanopartículas se encontró que las 4 presentaban tamaños de entre 71 y 112 nm, eran monodispersas y neutras, sin embargo, al analizar su solubilidad se encontró que las nanopartículas de LevS N70 Tn38, LevS Δ N85C e IsIA4 eran en promedio 3.9 veces más solubles que las de SacB H243L, por lo que estas últimas fueron excluidas del proceso de selección. Además, la selección del sistema se basó en las características de la enzima, en su eficiencia catalítica y sus rendimientos de expresión heteróloga, en este análisis se determinó que la enzima LevS N70 Tn38 presentaba la mayor expresión y eficiencia catalítica, por lo que fue elegida para la síntesis de nanopartículas que se estudiaron en este trabajo, pues además las nanopartículas cumplían con las características requeridas.

Empleando la enzima LevS N70 Tn38 se desarrolló un sistema atrapando el colorante verde de indocianina para monitorear su biodistribución en ratones y su acumulación en el cerebro. Se seleccionó este colorante debido a que, según la literatura, de manera libre no podía atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que solo empleando un nanoacarreador podría llegar al cerebro. Demostramos que el colorante es atrapado durante la síntesis de nanopartículas no modificó la cantidad de polímero sintetizado, ni las características fisicoquímicas de éstas. El sistema de NPL tuvo una capacidad de carga de 3.20 µg de colorante/mg de nanopartículas y permitió el 80 % de su liberación en las primeras 2 horas a condiciones fisiológicas. Al inyectar el colorante libre por vía intravenosa a los ratones se encontró que el colorante libre podía acumularse en el cerebro sin necesidad de ser acarreado por las nanopartículas, por lo que no fue posible estudiar la capacidad de las nanopartículas para llegar al cerebro empleando este sistema de atrapamiento. Posterior a esto, se analizó la fluorescencia de las nanopartículas de fructanas a distintas condiciones, encontrando que éstas emiten señal *in vivo* a Ex(480 nm)-Em(535 nm). Por lo tanto, se decidió estudiar la capacidad de las nanopartículas vacías para llegar al cerebro aprovechando su fluorescencia intrínseca. Por lo que se administraron las nanopartículas por vía intravenosa en ratones CD1 que presentan una gran diversidad genética, similar a la que se encuentra dentro y entre las poblaciones humanas y se realizó la extracción de hígado, riñón y cerebro. Los análisis de fluorescencia de estos órganos demostraron que las nanopartículas podían acumularse en el cerebro, lo que nos sugiere que pueden cruzar la barrera hematoencefálica. Estos hallazgos indican que este sistema podría utilizarse como nanoacarreador de fármacos y moléculas al cerebro.

INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas poliméricas han mostrado un enorme potencial en el área médica debido a sus propiedades como la facilidad de síntesis, biodegradabilidad y biocompatibilidad (Zhang *et al.*, 2021). Entre las nanopartículas poliméricas se encuentran las fructanas que son polisacáridos de fructosa unidos por enlaces glicosídicos, que son sintetizados por enzimas llamadas fructansacarasas. Las nanopartículas de fructanas (NPF) se clasifican en nanopartículas de levana (NPL) cuando los residuos de fructosa se encuentran unidos por enlaces β (2-6) y en inulinas cuando se encuentran unidos por enlaces β (2-1) (French, 1988). En los últimos años se encontró que las fructansacarasas bacterianas sintetizan fructanas de alto peso molecular, que se autoensamblan durante la síntesis enzimática generando nanopartículas (NPs) esféricas (Quiñones-Vázquez, 2015; Jiménez-Sánchez, 2019). Diversos trabajos han determinado que las nanopartículas de inulina y levana presentan una distribución de tamaño monodispersa y una carga cercana a la neutralidad, lo que permite obtener NPs homogéneas y estables (Jiménez-Sánchez, 2019; González-Garcinuño, 2020). Respecto a sus propiedades biológicas, se ha demostrado que las NPF no exhiben citotoxicidad y que además tienen propiedades antiinflamatorias y favorecen la proliferación celular incluso en ambientes inflamatorios (Valdez-Echeverría, 2021; Jiménez-Sánchez, 2019).

Debido a las propiedades que hasta ahora han mostrado las NPF, son un excelente candidato para abordar un problema de importancia médica a nivel mundial que es el tratamiento de enfermedades que afectan al cerebro (Sharma *et al.*, 2012). En las últimas décadas los sistemas de administración de fármacos como las NPs se han explorado ampliamente para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, uno de los grandes retos es la alta selectividad y baja permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) que limita la entrega de los agentes terapéuticos al cerebro. Diferentes estudios han reportado que las nanopartículas monodispersas, solubles y con tamaños de entre 70 y 200 nm logran atravesar esta barrera (Zhang *et al.*, 2021), por lo que las NPF presentan un gran potencial para su estudio en esta área, pues además de sus características estas presentan propiedades biológicas que podrían actuar como moduladores en la inflamación.

Por lo tanto, este trabajo se centra en analizar el proceso de síntesis de las NPL empleando diferentes enzimas, así como generar y caracterizar un sistema de NPL y biomarcador fluorescente verde de indocianina (ICG) con el propósito de estudiar su biodistribución en modelos murinos. Esto último tiene como meta identificar si las NPL son capaces de atravesar barreras biológicas, en particular, la BHE y sentar así las bases para la posible aplicación de las NPL en el tratamiento de enfermedades cerebrales.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Nanobiotecnología

La nanobiotecnología es una ciencia que se dedica al estudio y diseño de materiales, dispositivos y sistemas que se encuentran en una escala de longitud nanométrica de entre 1 y 100 nm, empleando métodos y técnicas para manipular sus propiedades fisicoquímicas, como el tamaño, la forma, la carga y la hidrofobicidad (Salata, 2004; Khan et al., 2019; Sim & Wong, 2021; Najahi-Missaoui et al., 2020). De esta manera, la nanobiotecnología permite diseñar nanomateriales con dimensiones y propiedades controlables que pueden ser aplicados en diferentes campos, incluidos la ingeniería, electrónica, medicina, industria farmacéutica, agroindustria, medio ambiente, entre otras. (Fakruddin et al., 2012; Smith et al., 2013; Silva, 2004; Patel et al., 2012). Los nanomateriales son sistemas que varían en tamaño, pueden fabricarse a partir de una variedad de sustancias y son de diferentes tipos, entre ellos nanocristales, nanofibras, nanocables, nanopartículas y nanotubos (Castro et al., 2013).

En la medicina los nanomateriales han sido empleados en el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades mediante su uso como nanosensores y como vehículos en la administración de fármacos (Castro et al., 2013; Silva, 2004). Además, han sido utilizados para generar implantes médicos biocompatibles en la reparación de tejidos (Qi et al., 2019; Gajewicz et al., 2012).

1.2 Nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) son estructuras de tamaño nanométrico de entre 10 y 100 nm y pueden transportar diferentes sustancias como fármacos, proteínas y ácidos nucleicos (Lehner et al., 2013). Las NPs se pueden clasificar según sus propiedades, formas, tamaños o el tipo de material que las constituyen, respecto a este último punto se pueden separar en nanopartículas orgánicas e inorgánicas (Figura I.1) (Gessner & Neundorf, 2020).

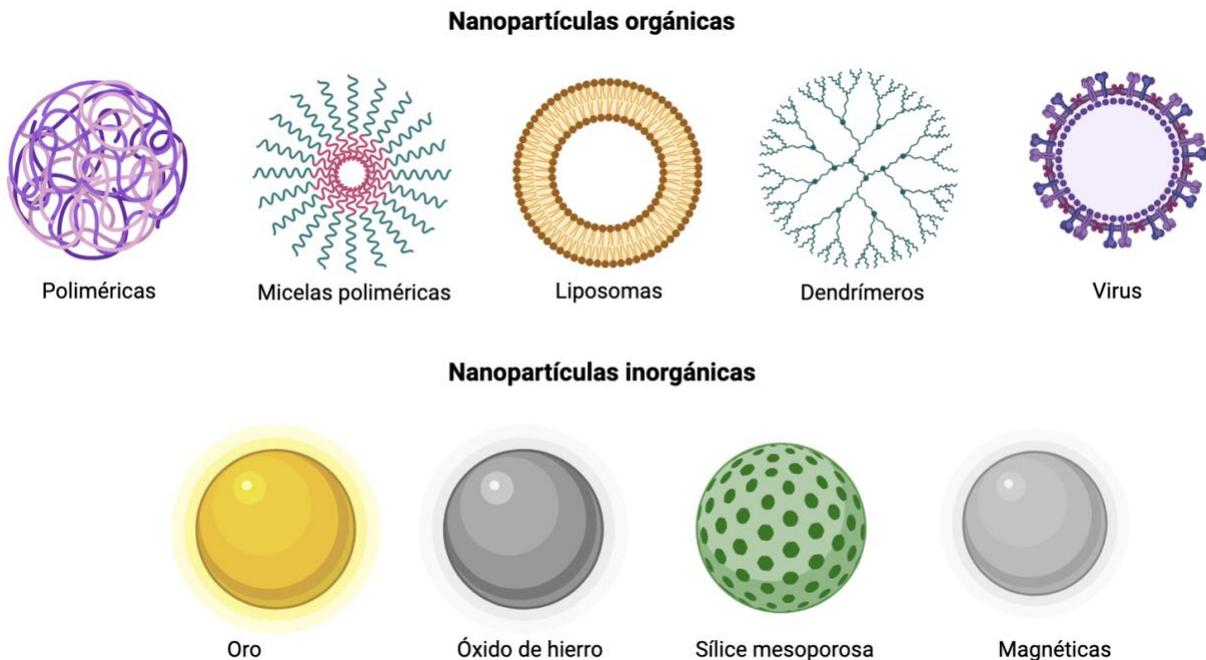


Figura 1.I. Representación de diferentes tipos de nanopartículas. Modificado de Gessner & Neundorf, 2020; Cheng et al., 2022.

Las nanopartículas inorgánicas más comunes son las nanopartículas de óxido de hierro, partículas de oro y nanotubos de carbono (Zhang et al., 2021). Las nanopartículas de óxido de hierro exhiben propiedades físicas y químicas únicas debido a su tamaño y una alta densidad de sitios de superficie (Gajewicz et al., 2012). Su uso en sistemas biológicos es limitado ya que se ha observado que inducen el aumento del nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular y la oxidación de biomoléculas, sin embargo, se utilizan para obtener imágenes de tejidos para aplicaciones de diagnóstico (Sahoo & Labhaseguerra, 2003; Yan et al., 2013). Las nanopartículas de oro pueden ser producidas en distintos tamaños y formas y pueden ser fácilmente funcionalizadas con ligandos como: anticuerpos, polímeros y fármacos (Mateo et al., 2013). Estas han sido empleadas en el área médica, en la administración de fármacos, en la entrega de ADNc que codifica proteínas funcionales con efecto terapéutico y en el diagnóstico de enfermedades (Ghosh et al., 2008). Por otro lado, los nanotubos de carbono son estructuras tubulares que constan de una hasta decenas y cientos de capas concéntricas de carbonos, son pequeños y presentan una disposición hexagonal que les confiere una resistencia física extrema, incluso diez veces más fuerte que el acero (Lehner et al., 2013). Un tipo de nanotubos de carbono son los fullerenos y tienen numerosas aplicaciones en productos para el cuidado personal, industria textil, microelectrónica, así como varios usos

potenciales en medicina como nanoacarreadores de fármacos, ácidos nucleicos, péptidos y anticuerpos (Gajewicz et al., 2012).

Por otro lado, las nanopartículas orgánicas más comunes son los liposomas, dendrímeros, cápsulas virales y nanopartículas poliméricas (Zhang et al., 2021). Los liposomas son pequeñas vesículas de forma esférica compuestas por fosfolípidos y esteroides, sus propiedades varían sustancialmente por su composición, tamaño, carga superficial y el método de preparación (Sahoo & Labhaseguerra, 2003). Debido a que su estructura de membrana es análoga a las membranas celulares son capaces de facilitar la incorporación de fármacos en las células (Patra et al., 2018). Por otra parte, los dendrímeros son macromoléculas fractales y ramificadas formadas alrededor de una molécula pequeña, tienen propiedades únicas relacionadas con su forma globular y la presencia de cavidades internas (Patra et al., 2018). Existen dendrímeros catiónicos de poli amidoamina y poli-1-lisina que han mostrado toxicidad. Por otro lado, se encuentran los dendrímeros cargados negativamente, como los dendrímeros sulfonados, carboxilados, fosfonados y por último los dendrímeros neutros, como los de poli-óxido de etileno, acetilo, carboxilo, manosa o grupos terminales de galactosa, que presentan menos toxicidad en comparación con los dendrímeros cargados positivamente (Kesharwani et al., 2017). En el espacio vacío de los dendrímeros se pueden encapsular agentes terapéuticos o bien estos se pueden adherir a grupos de la superficie de los dendrímeros (Abbasi et al., 2014; Zhu & Shi, 2013). Adicionalmente, las nanopartículas víricas son estructuras proteicas compuestas por la cápside de virus pero que carece de genoma, lo que la hace no infecciosas (Pokoski & Steinmetz, 2011). La forma y el tamaño de estas NPs facilitan su transporte vascular y captación celular (Chung et al., 2020). Para la aplicación de las NPs víricas en el área médica se han realizado esfuerzos para protegerlas del sistema inmunológico y una estrategia ampliamente utilizada es la unión de su superficie externa con cadenas de polietilenglicol (PEG) (Yildiz et al., 2011). Estas NPs se han empleado como diagnóstico, vacunas inmunoterapias y dispositivos terapéuticos dirigidos contra el cáncer (Pokoski & Steinmetz, 2011; Steinmetz, 2010; Chung et al., 2020).

1.2.1 Nanopartículas poliméricas

Finalmente, las nanopartículas poliméricas están compuestas de varios tipos de polímeros y son sintetizadas por una amplia variedad de técnicas de polimerización, estas NPs presentan diferentes

propiedades que se pueden ajustar de acuerdo con la aplicación deseada (Zhang et al., 2021; Crucho & Barros, 2017). Las nanopartículas poliméricas presentan un efecto terapéutico protegido, prolongado y dirigido, son versátiles y pueden administrar una amplia gama de fármacos mediante interacciones hidrófilas, hidrófobas o electrostáticas, y mediante enlaces covalentes (Zhang et al., 2021). En particular, las nanopartículas poliméricas basadas en carbohidratos presentan una baja propiedad inmunogénica, son biocompatibles y biodegradables (Verma et al., 2020; Zielinska et al., 2020), además presentan ventajas como son reducir la absorción de proteínas no específicas a su superficie después de su administración y prevenir su fagocitosis, mejorando así la circulación (Thattaru et al., 2021). Las nanopartículas poliméricas basadas en carbohidratos se derivan principalmente de biopolímeros de polisacáridos, por ejemplo, alginato, quitosano, ácido hialurónico y; por otro, las nanopartículas neutras de mananos, glucanos y fructanos (Verma et al., 2020; Vodyashkin et al., 2022; Joye & McClements, 2014).

Las nanopartículas de alginato están formadas de polisacáridos que constan de residuos α -L-ácido gulurónico (G) y β -D-ácido manurónico (M), unidos linealmente por enlaces 1,4-glicosídicos (Paques *et al.*, 2014). Estas nanopartículas tienen alta resistencia mecánica, y debido a su propiedad de gelificación y afinidad celular han sido empleadas para la administración de fármacos y en la ingeniería de tejidos (Severino et al., 2019; Catellano et al., 2019). Las nanopartículas de quitosano están formadas por una molécula de glucosamina y una molécula de N-acetilglucosamina unidos por un enlace glicosídico β -1,4 (Frank *et al.*, 2020; Buschmann et al., 2013). Este polisacárido ha sido ampliamente utilizado como encapsulador de biomoléculas como proteínas, DNA y RNA (Mohammed et al., 2017). Además, debido a su naturaleza catiónica, el quitosano presenta una mayor adhesión a la superficie mucosa cargada negativamente, lo que resulta en una mejora en la internalización del fármaco, adicionalmente se ha encontrado que estas NPs presentan propiedades antibacterianas, especialmente después de modificaciones químicas en su estructura (Li et al., 2013; Zhang et al., 2019; Verma et al., 2020). Las nanopartículas de ácido hialurónico presentan características como textura, biocompatibilidad e hidrofilia, por lo que se han convertido en excelente material en productos dermatológicos-cosméticos y para el cuidado de la piel (Rao et al., 2020; Choi et al., 2010). Las nanopartículas neutras de glucanos son microsferas huecas y porosas que están formadas de residuos de glucosa unidas por diferentes tipos de enlaces, son capaces de estimular el sistema inmunológico y se han empleado como estabilizadores para la administración de fármacos y para la entrega dirigida de ADN, proteínas,

moléculas y ARN pequeños de interferencia para silenciar la expresión de genes (Li & Cheung, 2019; Soto et al., 2013).

En general, las nanopartículas poliméricas basadas en carbohidratos se han empleado en el tratamiento de la diabetes, infecciones, alergias, cáncer e inflamación (Verma et al., 2020; Soto et al., 2013) por lo tanto, son una opción prometedora como sistema de administración de fármacos, debido a su estabilidad, baja toxicidad y biocompatibilidad (Patel et al., 2012; Kamaly et al., 2012). Además, las nanopartículas poliméricas con tamaños menores a 100 nm pueden penetrar a través de capilares más pequeños y ser captadas por las células, lo que permite una acumulación eficaz del fármaco (Farokhzad & Langer, 2009; Gagliardi et al., 2021). También tienen un mayor tiempo de circulación, son biodegradables y presentan una liberación sostenida del fármaco durante un período de días o incluso semanas (Sahoo & Labhaseguerra, 2003; Patel et al., 2012).

1.2.1.1 Nanopartículas de fructanas y fructansacarosas

Dentro de las NPs poliméricas se encuentran las fructanas que son polisacáridos de fructosa unidos por enlaces glicosídicos y son sintetizados por enzimas denominadas fructansacarosas (Olvera et al., 2007; Ritsema & Smeekens, 2003). La fructansacarosas utilizan moléculas de sacarosa como sustrato para la síntesis de las nanopartículas de fructanas (figura 1.II), la síntesis de NPs comienza cuando la enzima hidroliza el enlace glicosídico de la sacarosa y libera la glucosa al medio de reacción, posteriormente la fructosa es transferida a una molécula de sacarosa iniciadora o a una cadena de fructanas en crecimiento, estas enzimas pueden sintetizar productos de bajo peso molecular con grados de polimerización menores a 10 unidades de fructosa llamados fructooligosacáridos (FOS) o productos de alto peso molecular formados por más de 10,000 unidades de fructosa. Es durante la síntesis de polímero de alto peso molecular que este se autoensambla a través de puentes de hidrógeno y forma a las NPs de fructanas, por lo tanto, para la formación de NPs es importante que se cuente con polímero de alto peso molecular (Hestrin et al., 1956).

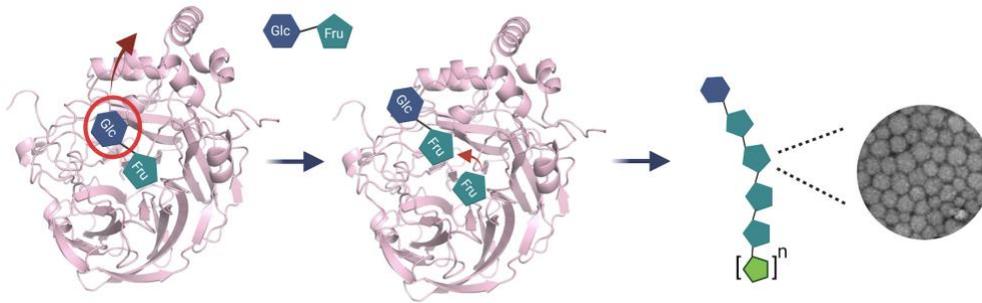


Figura 1.II. Esquema de la reacción enzimática a través de la que se da la síntesis de las nanopartículas de fructanas.

Entre las fructansacarosas que sintetizan NPs de fructanas se encuentra la enzima unidominio SacB H243L y las enzimas multidominio IslA4, Δ N85C y LevS N70 Tn38 (figura 1.III), estas enzimas son excelentes productoras de polímero de alto peso molecular que logra autoensamblarse y formar a las NPs de fructanas (Peña-Cardena et al., 2015; Ortiz-Soto et al., 2008; Martínez-Bahena, 2019; Martínez Morales, 2021). La enzima unidominio SacB H243L presenta solo el dominio catalítico, mientras que las enzimas IslA4, Δ N85C y LevS N70 Tn38 además del dominio catalítico presentan dominios adicionales en sus extremos N y C terminal.

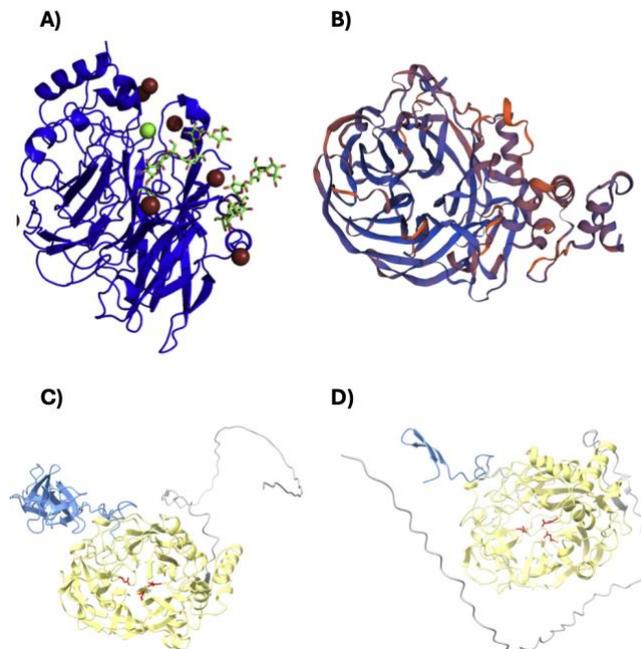


Figura 1.III. Estructura tridimensional de las fructansacarosas A) SacB H243L, B) IslA4, C) Δ N85C y D) LevS N70 Tn38. Tomado de Raga-Carbajal et al., 2021; Mercado, 2024. Modelos realizados en Alpha Fold a excepción de la estructura cristalográfica de SacB PDB: 6PWQ.

Las fructanas se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de enlace glicosídico que une a las fructosas (Figura 1.IV), si se encuentran unidas por enlaces β (2-6) en la cadena principal y con ramificaciones β (2-1) se les denomina levana, mientras que, cuando se encuentran unidas por enlaces β (2-1) en la cadena principal y con ramificaciones β (2-6) se denominan inulina (Dedonder, 1966; Vijn & Smeekens, 1999).

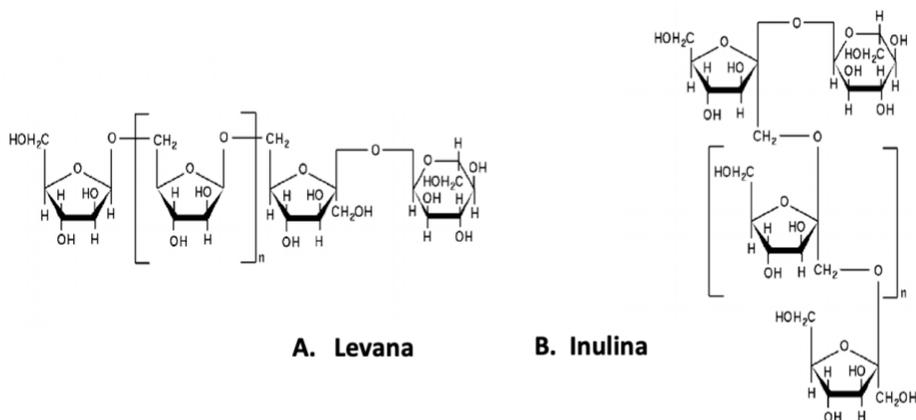


Figura 1.IV. Estructura química de las fructanas: a) Levana con enlace β (2-6), y b) Inulina con enlace β (2-1), (Dušek, 2002).

Las fructanas han sido aplicadas en la industria farmacéutica y cosmética gracias a sus propiedades texturizantes y/o estabilizantes se han utilizado como agentes encapsuladores y nanoacarreadores de fragancias, como sistema de liberación de fármacos, adyuvantes de vacunas y estabilizadores de proteínas (Gibson & Roberfroid, 1995; Hidaka et al., 1986; Jiménez-Sánchez et al., 2019). Debido a que estos polímeros tienen un amplio potencial biotecnológico en los últimos años ha surgido el interés de su estudio, esto con el fin de desarrollar procesos controlados para su producción y aplicación.

Por ejemplo, en 2019 González-Garcinuño y colaboradores, analizaron el tamaño de NPL sintetizadas por 2 sistemas: por bacterias y por sistemas libres de células. En este caso las levanas de origen microbiano sintetizaron NPs de 90 nm, mientras que las NPs obtenidas a partir de un sistema libre de células mostraron un diámetro de 110 nm, encontrando que el sistema utilizado para su síntesis determinaba el tamaño de NPs obtenido. Además, en ambos casos observaron que la concentración crítica de agregación (CAC) juega un papel importante en la agregación y

comportamiento de las NPs, ya que la CAC es la concentración por encima de la cual hay un proceso de autoensamblaje y las cadenas individuales se reorganizan para constituir nanopartículas. Es importante estudiar este parámetro ya que para administración sistémica cuando las NPs se introducen en el torrente sanguíneo, el gran volumen de sangre reduce la concentración de nanopartículas; y si éste es inferior al CAC, las cadenas que constituyen las partículas se disgregarán y el fármaco se liberará sin control (González-Garcinuño et al., 2019). Por otro lado, Charoenwongpaiboon y colaboradores en el mismo año, utilizando la inulosacarasa de *Lactobacillus reuteri* 121 encontraron que el tamaño de nanopartículas de inulina es dependiente de la concentración de sustrato y la temperatura de la reacción enzimática. Además, utilizaron a las nanopartículas para aumentar la biodisponibilidad y solubilidad de algunos flavonoides y se encontró que estas mejoraban su solubilidad (Charoenwongpaiboon et al., 2019).

Respecto al uso de las NPF para atrapar compuestos, en 2017, Sezer y colaboradores, utilizaron nanopartículas de levana para atrapar vancomicina. Los autores obtuvieron partículas con un tamaño de 0.404 a 1.276 μm y lograron alcanzar una capacidad de atrapamiento del 64 al 74 %. Asimismo, Sezer y colaboradores en 2011, atraparon suero de albúmina bovina en nanopartículas de levana y obtuvieron partículas con un tamaño de 200 a 537 nm (Sezer et al., 2011). Por otro lado, Kim y colaboradores en 2015 utilizaron nanopartículas de levana de bajo y alto peso molecular para atrapar el colorante verde de indocianina, y administraron el conjugado en modelos murinos, encontrando que el colorante se acumulaba en tumores, con estos resultados se propuso que las NPL probablemente presentaban una interacción específica entre los restos de fructosa y los transportadores GLUT-5 expresados en las células tumorales (Kim et al., 2015). En 2021 Cinan y colaboradores, obtuvieron nanopartículas de levana con un diámetro de 82 nm, mediante la técnica de atomización electro-hidrodinámica, atraparon resveratrol, un tipo de fenol natural y encontraron que la liberación del compuesto era gradual. Además, al realizar ensayos de biocompatibilidad *in vitro* con líneas celulares de fibroblastos dérmicos humanos se determinó que las nanopartículas son seguras y biocompatibles (Cinan et al., 2021).

Debido a que las fructanas presentan propiedades interesantes, diferentes trabajos en nuestro grupo de investigación se han enfocado en estudiar las propiedades de estos polisacáridos. Por ejemplo, se encontró que las fructansacarasa bacterianas sintetizan polímeros de fructosa, que se autoensamblan durante la síntesis enzimática generando nanopartículas esféricas y estables (Figura

1.V). El tamaño de las nanopartículas varía entre inulinas y levanas con tamaños de 101 a 203 nm y 62 a 180 nm, respectivamente (Quiñones-Vázquez, 2015; Jiménez-Sánchez, 2017).

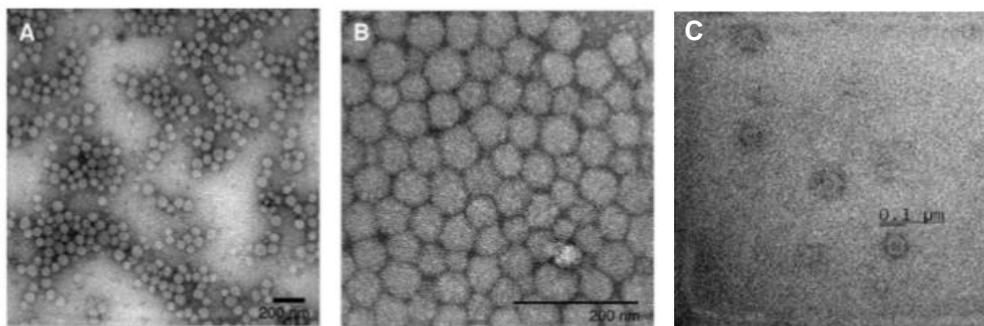


Figura 1.V. Morfología de las nanopartículas de fructanas observada por TEM: a,b) inulina, y c) levana. Tomado de Jiménez-Sánchez et al., 2019 y Quiñones, 2015.

El estudio de la formación de nanopartículas sugiere que estas se estructuran a través de puentes de hidrógeno entre los residuos de glucosa y fructosa presentes en las cadenas (Figura 1.VI) (Cooper et al., 2015). Se propone que estas interacciones se forman cuando se alcanza una concentración crítica de agregación (CCA) lo que provoca un reacomodo en el polímero (González-Garcinuño et al., 2020; Jiménez-Sánchez et al., 2019). Jiménez-Sánchez y colaboradores en 2019 determinaron que la CCA de las nanopartículas de inulina sintetizadas por la enzima IslA4 es de 15.7 g/L de NPs. Al estudiar el efecto de las condiciones de reacción sobre el tamaño de nanopartícula, los autores demostraron que la fuerza iónica no tiene una influencia significativa, sin embargo, la temperatura de reacción sí afecta el tamaño promedio de las nanopartículas, ya que disminuir la temperatura de reacción a 4°C se observaron partículas de 131 nm (35 % mayores).

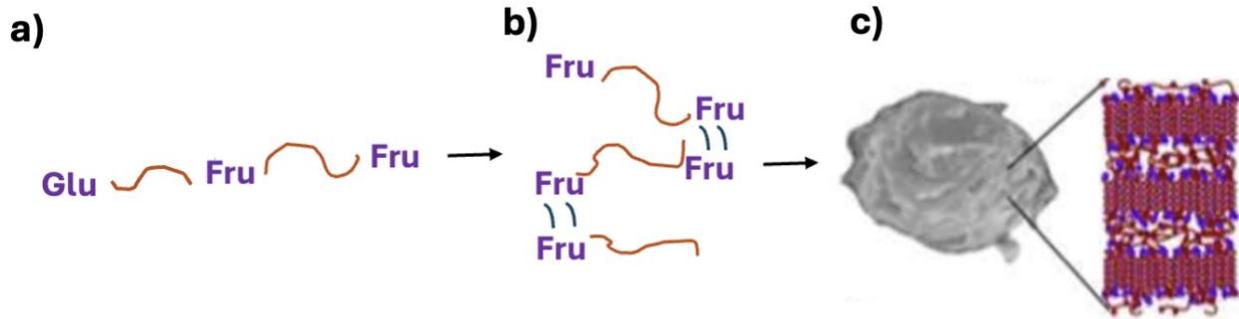


Figura 1.VI. Representación esquemática de la formación de nanopartículas: a) cadenas de fructanas, b) formación de puentes de hidrógeno glucosa-fructosa, y c) formación de nanopartículas. Modificado de Medrano, 2018

Respecto al índice de polidispersidad y potencial Z de las nanopartículas de fructanas, Hernández-Rodríguez en 2021, determinó que las nanopartículas de inulina de IslA4 presentan un índice de polidispersidad de 0.1, es decir, que la dispersión de tamaño de las nanopartículas es homogénea durante la reacción. Además, determinó que al utilizar 200 g/L de sacarosa y 2.0 U/mL de enzima durante 6 horas, se obtiene una mayor concentración de polímero (27.91 g/L) y que el tamaño de partícula disminuye conforme avanza la reacción (Hernández-Rodríguez, 2021). Por otro lado, Valdéz-Echeverría en 2021 reportó que las nanopartículas de levana también presentan una distribución de tamaño monodisperso, y un potencial Z de 0.1 mV, lo que indica que las nanopartículas cuentan con una ligera carga positiva, pero cercana a la neutralidad.

1.2.1.2 Propiedades biológicas de las nanopartículas de fructanas

Por otro lado, respecto a las propiedades biológicas de las nanopartículas de fructanas, Jiménez-Sánchez en 2017 al analizar la viabilidad celular después de adicionar diferentes concentraciones de nanopartículas de inulina a cultivos de linfocitos humanos demostró que estas nanopartículas no exhiben citotoxicidad usando una concentración de polímero de hasta 200 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 1.VIIA). Por otro lado, debido a que el factor de transcripción NF-kB induce la expresión de varios genes proinflamatorios, incluidos los que codifican citocinas y quimiocinas, Valdez-Echeverría en 2021 para estudiar las propiedades antiinflamatorias de las nanopartículas de levanas analizó la activación de este factor de transcripción (NF-kB) en células de macrófagos de ratón al ser expuestas a diferentes concentraciones de nanopartículas. Valdez-Echeverría encontró que desde una concentración de 0.40 mg/mL hay un aumento en la activación del factor NF-kB (Figura 1.VII B), sin embargo, en presencia de lipopolisacárido bacteriano, con 1 y 2.5 mg/mL de nanopartículas

se logra contener la inducción de NF-kB (Figura 1.VIIC), por lo tanto, se propuso que las nanopartículas de levana podrían modular la activación de una respuesta inflamatoria. Por otro lado, para estudiar el efecto de las nanopartículas en la proliferación celular, Valdez-Echeverría sometió células de queratinocitos a una concentración de 5 mg/mL de nanopartículas de levanas y demostró que se favoreció la proliferación celular incluso en un ambiente inflamatorio (Figura 1.VIID).

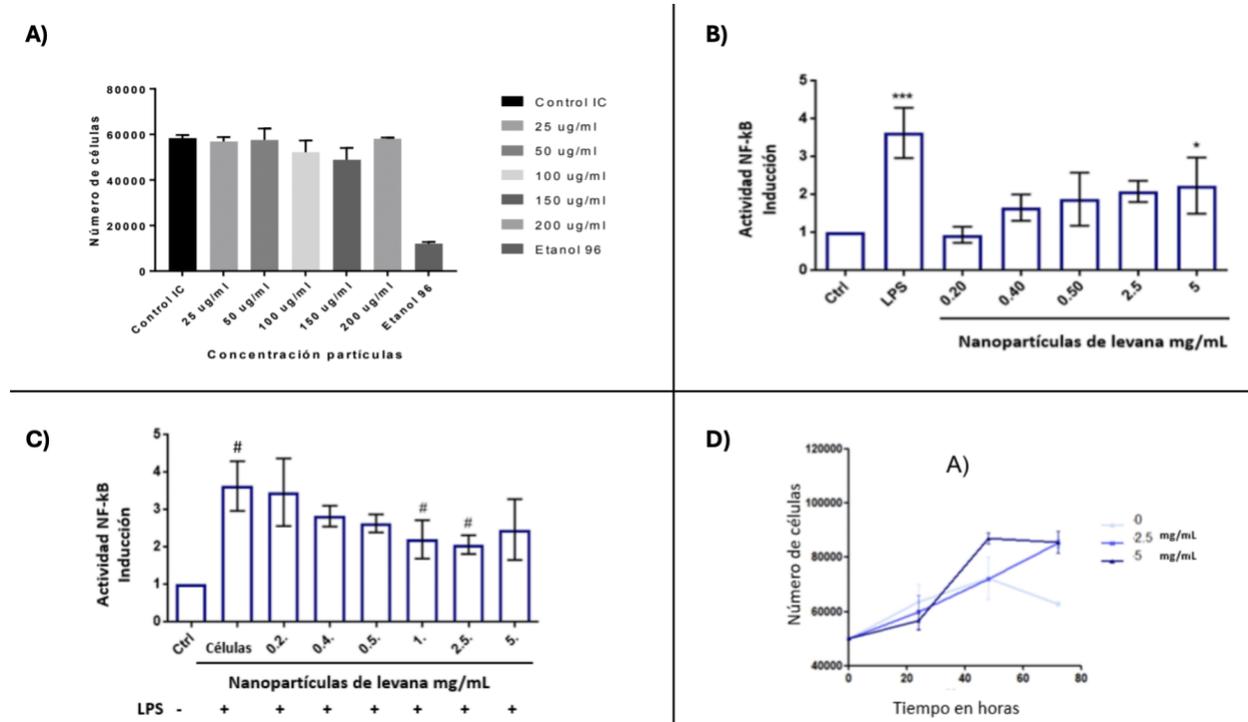


Figura 1.VII. Análisis de la citotoxicidad de nanopartículas de fructanas de alto peso molecular: a) citotoxicidad de nanopartículas de inulina en el cultivo de linfocitos humanos; b, c, y d) Citotoxicidad de nanopartículas de levana; b) Inducción en la actividad de del factor NF-kB con diferentes concentraciones de nanopartículas de levanas, c) Inducción en la actividad del factor NF-kB en presencia de LPS bacteriano y nanopartículas, y d) Proliferación de células HaCaT en presencia de nanopartículas de levana. Tomado de Valdez-Echeverría 2021 y Jiménez-Sánchez et al., 2019.

Debido a que las nanopartículas de fructanas han mostrado propiedades biológicas interesantes, se han considerado como excelentes candidatas para su uso como nanoacarreadores de fármacos y biomoléculas. Sin embargo, su área de aplicación sigue siendo objeto de exploración, por lo que aún se requieren esfuerzos continuos para identificar en qué enfermedades específicas podrían ser aplicadas. Dado que las NPF parecen favorecer la proliferación celular y contener el desarrollo de

una respuesta inflamatoria, se ha propuesto su posible aplicación como sistemas de administración de fármacos en enfermedades donde la muerte celular e inflamación sean factores importantes. Por lo tanto, este trabajo va enfocado en estudiar el potencial de estas NPF para llegar al cerebro y así poder para tratar alteraciones en este órgano, como lo son las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, el gran reto actual para poder aplicar estas NPs en el cerebro es que puedan cruzar la barrera hematoencefálica, la que al ser altamente selectiva no permite la entrada indiscriminada de moléculas a este órgano.

1.3 Cerebro y la barrera hematoencefálica

El cerebro forma parte del sistema nervioso central en conjunto con la medula espinal. El cerebro es el órgano del tejido nervioso responsable de las respuestas, las sensaciones, el movimiento, las emociones, la comunicación, el procesamiento del pensamiento y la memoria (Thau et al., 2022). La barrera hematoencefálica (BHE) es el mecanismo de defensa homeostático del cerebro contra patógenos y toxinas, es una barrera compleja multicelular dinámica altamente selectiva que regula el transporte de moléculas como iones, nutrientes y células entre la sangre y el cerebro (Roney et al., 2005). La BHE actúa junto con las neuronas y las células gliales y forma la unidad neurovascular completa que es crucial para el funcionamiento del cerebro (Zhang et al., 2021). Anatómicamente, consta de células endoteliales cerebrales, pericitos, astrocitos y membrana basal (figura I.VIII) (Ding et al., 2020; Lach et al., 2023). Los pericitos regulan la barrera hematoencefálica al promover la formación de uniones estrechas y regular en gran medida el transporte de moléculas a través del endotelio. Además, se ha propuesto que los pericitos pueden contribuir a la regulación del flujo sanguíneo cerebral (Villaseñor et al., 2019). La BHE presenta una alta resistencia eléctrica que es causada por la presencia de complejos de uniones estrechas intercelulares que mantienen unidas a las células endoteliales adyacentes y que están formados por diferentes proteínas, incluidas claudinas, ZO-1 y ocludina (Ceña & Játiva, 2018).

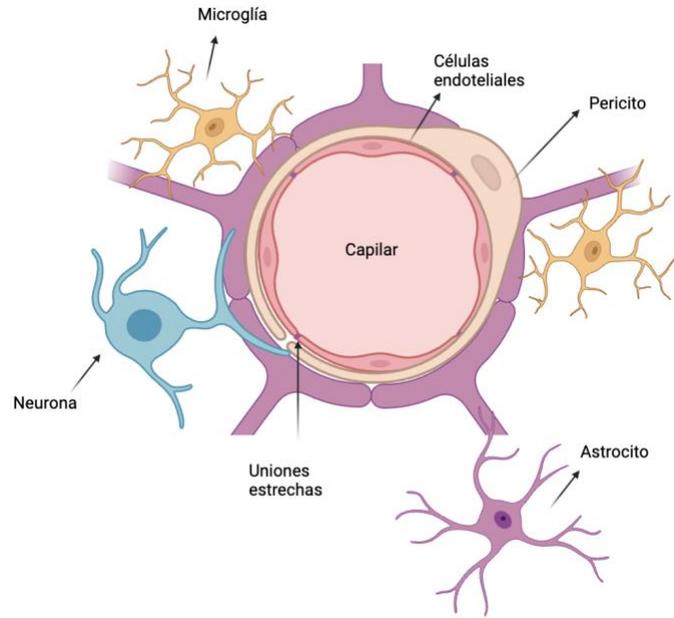


Figura 1.VIII. Representación esquemática de la barrera hematoencefálica y componentes de la unidad neurovascular incluidos los astrocitos y microglías. Modificado de Lach et al., 2023.

1.3.1 Vías de transporte a través de la barrera hematoencefálica

La barrera hematoencefálica funciona como una barrera física a través de la que se transportan moléculas de forma regulada entre la sangre y el parénquima cerebral (Ding et al., 2020). Las moléculas pueden cruzar esta barrera por diferentes vías y esto dependerá del tamaño y naturaleza de cada una de estas, por ejemplo, existe el transporte paracelular, transporte transcelular mediado por receptores, por proteínas transportadoras y por absorción (Ding et al., 2020). En el transporte paracelular las pequeñas moléculas solubles en agua (peso molecular <500 Da) pasan entre las células endoteliales a través de las uniones estrechas (Hartl et al., 2021; Ding et al., 2020). En el transporte transcelular diferentes gases lipófilos y algunos compuestos liposolubles, como el alcohol y las hormonas esteroides atraviesan de forma pasiva desde las células endoteliales hacia el estroma cerebral. Por otro lado, los metabolitos y nutrientes necesarios para el tejido nervioso deben tener un suministro controlado, por lo que su transporte es de manera activa, es decir, a través de receptores, como la glucosa, aminoácidos o ácidos grasos esenciales se unen a una proteína de transporte, que está incrustada en la membrana del endotelio, su unión provoca un cambio conformacional en la proteína transportadora que permite su entrada al cerebro (Roney et al., 2005).

Debido a que la BHE es muy selectiva y que las vías de transporte a través de ella no favorecen la administración de fármacos se han utilizado diferentes estrategias para poder tratar enfermedades del cerebro. Entre estas estrategias se encuentran el aumento temporal de la permeabilidad de la BHE (por ejemplo, mediante alteración osmótica), la infusión intraventricular o intracerebral directa del agente y la implantación intracerebral de formulaciones de depósito para una liberación controlada del fármaco, sin embargo, estas estrategias son muy invasivas y presentan un alto riesgo de complicaciones, como infecciones intracraneales o edema cerebral, por lo que, en los últimos años se ha explorado el uso de nanoacarreadores para la entrega de estos fármacos en el cerebro.

1.4 Nanopartículas como sistema de administración de compuestos al cerebro

Uno de los retos más sustanciales en el campo de la nanotecnología es la entrega de fármacos al cerebro, por ello diversos estudios se han enfocado en el estudio y diseño de nanopartículas capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. Las nanopartículas presentan una serie de ventajas, como una alta capacidad de carga, estabilidad, liberación controlada del fármaco, brindan protección a la fagocitosis por parte del sistema reticuloendotelial para que los fármacos estén disponibles a través de la barrera hematoencefálica y mejore significativamente su concentración en el cerebro (Zhou et al., 2018). Además, al emplear NPs no requiere ninguna modificación de la molécula del fármaco para su administración al cerebro lo que evita la alteración de la eficiencia terapéutica de este, por otro lado, se ha propuesto la modificación de la superficie de las nanopartículas para permitir su entrada al cerebro tras su administración intravenosa a través de vías mediadas por receptores (Wohlfart et al., 2012).

Existen algunos trabajos que han estudiado el posible efecto de nanopartículas en el SNC. Las nanopartículas de poli cianoacrilato de butilo (PBCA) fueron el primer sistema de nanopartículas a base de polímeros que se utilizó para administrar fármacos al SNC (Kreuter et al., 1995). Estas nanopartículas se cargaron con dalargina (un compuesto con actividad opioide) y se recubrieron con polisorbato 80. Los estudios *in vivo* demostraron que las partículas tenían un efecto analgésico y que en ausencia del recubrimiento de polisorbato 80, había una disminución significativa en el número de nanopartículas que cruzaban la barrera hematoencefálica (Schroeder et al., 1998; Kreuter et al., 1995).

Los poliésteres como el ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliglicólico (PGA), y su copolímero poliácido láctico-co-glicólico (PLGA) también se han estudiado, demostrando su capacidad para atravesar la BHE. Por ejemplo, se demostró que las nanopartículas de PLA cargadas con breviscapina (un flavonoide), penetran en la BHE de manera dependiente del tamaño (Liu et al., 2008). Por otro lado, las NPs de quitosano han mostrado prometedoras aplicaciones en la administración cerebral debido a su carga positiva, ya que se observó presentan una buena absorción celular e incluso esta se ve potenciada al emplear NPs de PEG-quitosano modificadas con anticuerpos, lo que se atribuyó a la sinergia del anticuerpo y la carga positiva de quitosano (Monsalve et al., 2015). Sin embargo, las nanopartículas de quitosano tienen limitaciones tales como una baja eficiencia de carga del fármaco y un bajo control sobre el peso molecular, además de que debido a su carga pueden mostrar una mayor toxicidad que las nanopartículas aniónicas y neutras (Han et al., 2007; Zhang et al., 2021).

Si bien existen investigaciones que se han centrado en el estudio de las nanopartículas como sistemas de entrega de fármacos en el cerebro, algunas de las limitantes para poder estudiar la capacidad de las nanopartículas para llegar a este órgano son los métodos para ser detectadas y observadas, por lo tanto, una estrategia utilizada para monitorear la biodistribución y acumulación de NPs es el atrapar colorantes o fluoróforos que permiten su visualización y seguimiento no invasivo. Un ejemplo del uso de nanopartículas poliméricas marcadas, en particular nanopartículas de fructanas es el trabajo de Kim y colaboradores en 2015, donde emplearon nanopartículas de levana para atrapar el colorante verde de indocianina (ICG) y de esta manera fuera posible rastrear a las NPs, en este trabajo se encontró que las nanopartículas de levana-ICG se acumulan con éxito en el cáncer de mama mediante la interacción específica entre las moléculas de fructosa del levana y el transportador de glucosa 5, sin embargo, además de la acumulación de las nanopartículas en los tumores, también se encontró en otros órganos como hígado, bazo y riñones. De esta manera resulta interesante analizar más a detalle la distribución y acumulación de las nanopartículas de levana en modelos murinos pues estos ensayos nos permitirán conocer si las NPL pueden cruzar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro. Además, debido a que las nanopartículas poliméricas han mostrado ser biocompatibles, biodegradables y que no generan una respuesta tóxica en ensayos in vitro estas presentan una gran ventaja en esta área.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que existen muchas enfermedades cerebrales que no logran ser tratadas eficazmente debido a problemas en la solubilidad de fármacos, en la dosis de administración, o por las dificultades que enfrentan estos compuestos para atravesar la barrera hematoencefálica, es fundamental buscar nuevos sistemas de nanoacarreo y liberación de biomoléculas en el cerebro. En los últimos años, se ha propuesto el uso de nanopartículas (NPs) como vehículos acarreadores de fármacos capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, sin embargo, tienen una gran limitante y es la falta de especificidad de éstas por el órgano o tejido a tratar. Por lo tanto, se requiere mejorar el diseño de NPs de manera que tengan una entrega de fármacos más selectiva y el tratamiento de dichas enfermedades sea más eficiente.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que las nanopartículas de fructanas han mostrado interesantes propiedades tanto de biocompatibilidad, citotoxicidad, estabilidad, así como su capacidad para atrapar biomoléculas, surge el interés de estudiar su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, con el fin de conocer su potencial para la entrega de fármacos en el cerebro. Este estudio sentará las bases para el uso de las nanopartículas de fructanas como sistema de nanoacarreo hacia el cerebro.

HIPÓTESIS

Las nanopartículas de fructanas son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y llegar a cerebro debido a su tamaño nanométrico, morfología esférica y su posible reconocimiento por los receptores de glucosa presentes en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica.

OBJETIVOS

Objetivo general

Generar un sistema de nanoacarreo basado en nanopartículas de fructanas y demostrar su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica.

Objetivos específicos

- Seleccionar el sistema basado en nanopartículas de fructanas que cumpla con características idóneas, tanto en su proceso de producción, como en su potencial para atravesar la barrera hematoencefálica.
- Estudiar la capacidad de las nanopartículas de fructanas para cruzar la barrera hematoencefálica mediante el análisis de su biodistribución *in vivo* en modelos murinos.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

- Seleccionar el sistema basado en nanopartículas de fructanas que cumpla con características idóneas, tanto en su proceso de producción como en su potencial para atravesar la barrera hematoencefálica.



- Analizar de las características de las enzimas productoras de nanopartículas de fructanas
- Estudiar del proceso de síntesis de las nanopartículas de fructanas.
- Analizar de la morfología de las nanopartículas de fructanas.
- Determinar el tamaño de las nanopartículas de fructanas por NTA y DLS.
- Determinar la solubilidad de las nanopartículas de fructanas.
- Seleccionar el sistema de nanoacarreo basado en NPF que cumpla con características idóneas que favorezcan su cruce por la BHE.

- Estudiar la capacidad de las nanopartículas de fructanas para cruzar la barrera hematoencefálica mediante el análisis de su biodistribución *in vivo* en modelos murinos.



- Sintetizar el sistema nanopartícula de levana-colorante verde de indocianina (NPL-ICG).
- Estudiar el efecto de la adición del colorante en la síntesis y características de las NPL.
- Estudiar la cinética de atrapamiento y liberación del colorante ICG en las NPL.
- Estudiar la fluorescencia de las NPL para los estudios *in vivo*.
- Analizar la biodistribución de ICG libre en modelos murinos.
- Estudiar la capacidad de las NPL para cruzar la BHE en modelos murinos.

2 METODOLOGÍA

2.1 Expresión y purificación de las versiones truncadas de LevS de *Leuconostoc mesenteroides*

Se transformaron células *E. coli* BL21 con los plásmidos de las fructansacarosas multidominio IslA4, LevS N70 Tn38, Δ N85C y la fructansacarasa unidominio SacB H243Ly se realizaron preinóculos a 37°C y 220 rpm durante 12-16 horas. Posteriormente, se realizaron fermentaciones a las condiciones antes mencionadas y al alcanzar una densidad óptica de 0.6 UA se realizó la inducción de la expresión del vector con IPTG durante 8 horas a 18°C y 120 rpm. Una vez transcurrido el tiempo se cosecharon las células por centrifugación y se almacenó la pastilla celular a -20°C. La lisis celular se realizó utilizando lisozima a una concentración de 1 mg/mL durante 30 minutos a 4°C, además la lisis se continuo mediante 3 ciclos de congelación-descongelación y ultrasonificación a 70 % amplitud 10 segundos *On*, 30 segundos *Off* durante 5 minutos, posteriormente el extracto se centrifugó y se recuperó el sobrenadante para la purificación de la enzima.

La purificación se realizó empleando una columna de intercambio iónico con una resina DEAE-celulosa y la elución se realizó a una concentración de 350 mM de buffer de fosfatos pH 6. Posteriormente, las fracciones obtenidas con cada una de las enzimas se concentraron por ultracentrifugación empleando tubos Amicon con una membrana de corte molecular de 30 kDa. Esta ultrafiltración se llevó a cabo a 6000 rpm a 4 °C y durante este proceso también se realizó el cambio de buffer a buffer de acetatos 50 mM CaCl₂ 1 mM pH6. Para corroborar la integridad y pureza de la muestra concentrada se realizó un gel SDS-PAGE. Además, se cuantificó la concentración de proteína y se determinó la actividad enzimática por el método de DNS.

2.1.1 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), utilizando una cámara vertical Mighty Small II con amperaje constate de 20 mA para la migración. Como gel concentrador se utilizó acrilamida al 4 % con pH 6.8 y como gel separador acrilamida al 10 % con pH 8.8. La muestra se mezcló con buffer de carga

que contiene 0.125 M tris-Cl pH 6.8, 4 % SDS (w/v), 10 % glicerol (v/v), 10 % de β -mercaptoetanol (v/v) y azul de bromofenol 0.05 % (w/v).

Para observar las bandas correspondientes a las proteínas separadas por electroforesis, se realizó una tinción del gel con azul de coomassie (ácido acético 10 %, metanol 30 % y azul de coomassie 0.2 %) durante 30 min. Para remover el exceso de colorante se utilizó una solución desteñidora (metanol 50 % y ácido acético 10 %) por tiempo indefinido, es decir, hasta que el gel se observara totalmente transparente observándose claramente las bandas y marcador de peso molecular.

2.2 Determinación de la actividad enzimática y concentración de proteína

2.2.1 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteína se realizó mediante el método de Bradford utilizando el reactivo Protein Assay (Bio-Rad) y como estándar se utilizó albúmina sérica bovina (BSA, Bio-Rad). La determinación se realizó reaccionando la muestra de enzima pura con el reactivo de Bradford durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se determinó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Eppendorf BioSpectrometer Kinetic).

La concentración de proteína se determinó con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración proteína } mg/ml = \left(\frac{Abs_{595nm}}{PC_{BSA}} \right) \left(\frac{1 mg}{1000 \mu g} \right) (FD)$$

Donde:

Ab_{595nm} : Absorbancia de las muestras a 595 nm (UA)

PC_{BSA} : Pendiente curva estándar BSA ((UA/ μ g)/mL)

FD: Factor de dilución

2.2.2 Ensayos de actividad enzimática

La actividad se determinó usando 100 g/L de sacarosa a una temperatura de 30°C, una agitación constante de 200 rpm y utilizando la cantidad de enzima necesaria para obtener valores de

absorbancia cercanos a 0.9 UA a 540 nm. Para calcular la actividad enzimática se tomaron 5 alícuotas de 50 µl c/u en diferentes tiempos de la reacción (0, 2.5, 5, 7.5 y 10 minutos) y se neutralizaron con 50 µl de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Posteriormente, con el objetivo de lograr la reducción de un grupo nitro a un grupo amino las alícuotas se calentaron durante 5 minutos, lo que provocó el cambio colorimétrico de amarillo a rojo; posterior a esto las muestras se dejaron en hielo durante 5 minutos y se añadieron 500 µl de agua destilada. Finalmente, los azúcares reductores liberados se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro Eppendorf BioSpectrometer Kinetic a 540 nm, empleando una solución equimolar de glucosa-fructosa como estándar. El promedio y la desviación estándar se obtuvieron de mediciones realizadas por triplicado.

Las ecuaciones utilizadas para determinar la actividad enzimática volumétrica y específica fueron las siguientes:

$$Act. enzimática volumétrica \frac{U}{ml} = (PA_{Enz}) \left(\frac{mg/mL}{PC_{DNS}} \right) \left(\frac{1 mol}{180000 mg} \right) \left(\frac{1 \times 10^6 \mu mol}{1 mol} \right) \left(\frac{0.6 mL}{V_{enzima}} \right)$$

Donde:

PA_{Enz} : Pendiente actividad enzimática (UA/min)

PC_{DNS} : Pendiente curva de estándar DNS (UA)

V_{enzima} : Volumen de enzima utilizada en la reacción (mL)

$$Act. enzimática específica U/mg = \frac{Act. enzimática volumétrica U/mL}{Concentración de proteína mg/mL}$$

La actividad enzimática específica se expresó en términos de U/mg, donde una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima capaz de liberar un µmol de azúcares reductores por minuto.

2.2.2.1 Determinación de las constantes cinéticas

Las constantes cinéticas se determinaron empleando 1 U/mL de enzima y se modificó la concentración de sustrato de 10 mM a 600 mM, la actividad se midió a 30°C, 300 rpm y el procedimiento fue igual al detallado en el punto 2.2.2.

2.3 Determinación del efecto de las condiciones de reacción de NPs

El efecto de las condiciones de reacción en la síntesis de polímero de alto peso molecular se determinó modificando la concentración de enzima (1 U/mL y 2 U/mL) y sacarosa (100 g/L y 200 g/L) en la mezcla de reacción, sin embargo, el buffer de trabajo (Buffer de acetatos 50 mM CaCl₂ 1 mM, pH 6, temperatura (30°C) y agitación (300 rpm) se mantuvieron constantes. De esta manera las reacciones se detuvieron por congelamiento (acetona con CO₂ sólido) y calentamiento a 90°C durante 15 minutos para desnaturalizar la enzima. Las nanopartículas se separaron de los componentes de la reacción por precipitación con etanol, la purificación de las NPs se realizó agregando 2.5 volúmenes de etanol a 4°C durante 1 hora, posteriormente se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm a 4°C durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla celular 2 veces con 800 µL de etanol. El exceso de este se evaporó a 70°C durante 10 min. Para determinar la cantidad de polímero y características de las nanopartículas se resuspendió la pastilla celular en el buffer de trabajo.

2.4 Cuantificación de la cantidad de polímero de alto peso molecular por HPLC

La cuantificación de polímero se realizó mediante el análisis de las muestras por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-SEC), utilizando la columna Ultrahydrogel linear (7.8 x 300 mm) conectado a ultrahydrogel 500 (7.8 x 800 mm). El análisis se realizó empleando una fase de NaNO₃ 0.1 M, un flujo de 0.8 mL/min y un tiempo de corrida de 33 min. Como estándar se utilizó polímero de alto peso molecular sintetizado por la fructansacarasa SacB con el que se generó una curva de calibración de 2.5 g/L a 30 g/L de polímero de alto peso molecular).

2.5 Observación de NPs por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para realizar la observación de las nanopartículas se utilizó la técnica de tinción negativa, que permite la visualización de partículas en la escala nano. Se analizaron muestras a diferentes tiempos de reacción. Se colocaron 10 µL de las muestras sobre una rejilla de cobre y se dejaron secar, posteriormente se colocó una gota de acetato de uranilo al 2 % y se dejó por 1 minuto,

finalmente se retiró el exceso de manera delicada con papel filtro. Posterior a este proceso las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión marca ZEISS modelo Libra a 120 kV

2.6 Determinación de la solubilidad de las NPs de fructanas

El ensayo para determinar la solubilidad se adaptó y modificó de metodologías previamente reportadas para analizar la solubilidad de polímeros de glucosa y fructosa similares a las fructanas (Feng et al., 2018; Cortés-Rojas & Oliveira, 2012; Pourfarzad et al., 2015). Las pruebas de solubilidad se realizaron disolviendo 750 mg de polímero previamente liofilizado en 5 mL de agua. Posteriormente, estas muestras se incubaron a 40°C durante 40 min y se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min esto para determinar la cantidad de polímero que puede disolverse sin generar sedimento. Se colectó el sobrenadante y se cuantificó por HPLC.

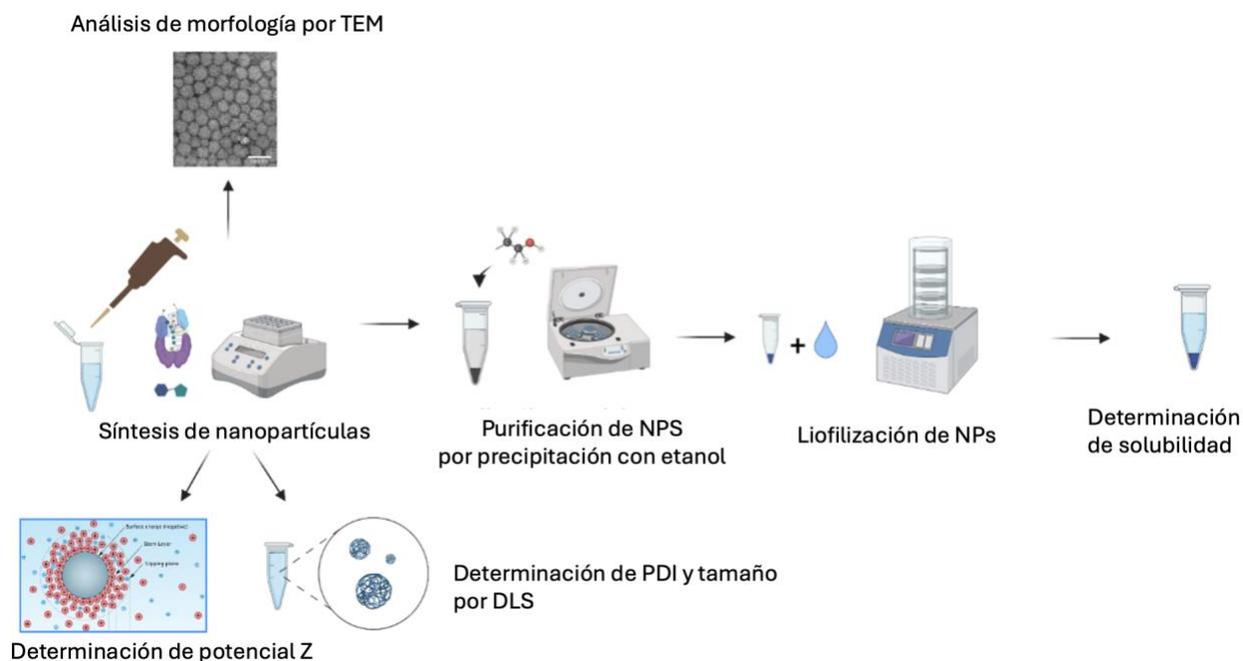


Figura 2.I. Proceso de análisis y obtención de las nanopartículas de fructanas. La determinación de tamaño, potencial Z y PDI se realizó en la mezcla de reacción, al igual que su observación por TEM. Los ensayos de solubilidad se realizaron con el polímero previamente precipitado y liofilizado.

2.7 Medición del tamaño de NPs e índice de polidispersidad por dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz es un método fisicoquímico utilizado para determinar la distribución de tamaños de partículas en suspensión. La distribución del tamaño de nanopartículas y el índice de polidispersidad se determinó por dispersión dinámica de luz midiendo el radio hidrodinámico mediante el equipo Malvern Instrument Zetasizer 2000. El índice de polidispersidad es un parámetro obtenido de manera simultánea con el tamaño de partícula y provee información sobre la muestra: valores cercanos a 0 y menores a 0.1 indican que la muestra es monodispersa. El potencial Z es un valor que representa el comportamiento electrostático de una partícula coloidal en el medio donde se encuentre y se determina con el mismo equipo usando electroforesis Doppler con láser.

2.8 Implementación de un método de cuantificación de nanopartículas empleando DLS y NTA

Con el objetivo de implementar un método para la cuantificación de nanopartículas de fructanas en solución fácil y accesible, se generaron curvas de calibración con la cantidad de nanopartículas determinada por 2 diferentes estrategias: DLS con un Zetasizer Ultra y con el sistema NanoSight NTA en diferentes concentraciones de polímero. Las curvas se realizaron empleando 5 diferentes concentraciones de polímero (0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 mg/ml), se utilizaron nanopartículas de inulina (IslA4) y Levana (LevS N70 Tn38) esto con la finalidad de desarrollar una curva para cada tipo de polímero.

2.9 Síntesis y caracterización del sistema NPL-ICG

El sistema NPL-ICG se sintetizó por reacción enzimática, ya que la nanoestructuración se lleva a cabo durante síntesis del polímero al agregar el colorante verde de indocianina (ICG) a la reacción este es atrapado durante el autoensamblaje. Las condiciones de reacción fueron 30°C, 300 rpm, pH 6 y se utilizaron 2 U/mL de enzima, 200 g/L de sacarosa y 3 diferentes concentraciones de verde de indocianina (ICG) (1 mg/mL, 0.5 mg/mL y 0.2 mg/mL). El sistema se purificó con 2.5 volúmenes de etanol como lo descrito en el apartado II.2. Debido a que el colorante libre es soluble en etanol, este fue eliminado durante la purificación de las nanopartículas, ya que tanto las

nanopartículas vacías como las nanopartículas con colorante atrapado precipitan con el etanol absoluto y por lo tanto pueden ser separadas del colorante libre.

2.9.1 Cinética de atrapamiento del colorante ICG

La cinética se realizó tomando muestras a diferentes tiempos de reacción, desde los 10 minutos hasta las 12 horas y la concentración de colorante libre se leyó por absorbancia a 780 nm, de manera que la disminución en la cuantificación de colorante nos indicó el atrapamiento de este.

2.9.2 Determinación de la eficiencia de atrapamiento y la capacidad de carga

$$EA\% = \frac{\text{Colorante atrapado } \mu\text{g}}{\text{Colorante inicial } \mu\text{g}} (100)$$

$$CC\% = \frac{\text{Colorante atrapado } \mu\text{g}}{\text{Nanopartículas mg}}$$

2.9.3 Cinética de liberación del colorante ICG y estabilidad del sistema NPL-ICG

La cinética de liberación se estudió resuspendiendo en buffer PBS (pH 7.4) a 37°C el sistema NPL-ICG sintetizado y purificado a las condiciones mencionadas en el apartado II.7. Se tomaron muestras a diferentes tiempos, desde 5 minutos hasta 12 horas y se leyeron por absorbancia a 780 nm. La liberación del colorante se determinó al observar un aumento en la absorbancia a través del tiempo, lo que indicaba la liberación del colorante de la nanopartícula, ya que según lo observado anteriormente las nanopartículas y, probablemente la muestra cubierta por estas no muestra señal a 780 nm. En este ensayo existía un 30 % de la concentración soluble de ICG en el medio de disolución.

2.10 Análisis de la fluorescencia de las NPL

Se estudió la fluorescencia de las nanopartículas de levana, del sistema NPL-ICG y del buffer PBS en un fluorómetro Perkin Elmer precisely PTP-1 a las condiciones de excitación a 480 nm y de emisión a 535 nm.

2.11 Estudio de la distribución de las NPL

Los ensayos *in vivo* con modelos murinos se realizaron bajo la aprobación del Comité de Bioética del instituto de biotecnología (proyecto número 456). Para este ensayo se inyectaron por vía intravenosa ratones machos CD1 con peso de 20 a 23 gramos con NPL e ICG libre y después de 1 hora se realizó la extracción de órganos y se observaron en el equipo XTREME IN VIVO del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del Instituto de biotecnología, UNAM a las siguientes condiciones: Ex(730)-Em (830) y Ex(480)-Em (530).

Grupos

GC (GRUPO CONTROL): El ratón se anestesió con isoflurano al 1 % y posteriormente se le administró una dosis única de 0.05 mg/kg de ICG.

Procedimiento para variable (V1): Los dos ratones se anestesiaron con isoflurano al 1 % y posteriormente se les administró una dosis de 62.5 mg/kg de nanopartículas de levana.

2.12 Generación de curvas de calibración para la cuantificación de nanopartículas de fructanas

Las curvas de calibración se realizarán empleando 5 diferentes concentraciones de polímero (0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 mg/mL), estas curvas se validaron empleando absorbancia a 204 nm, por cuantificación en el equipo Zetasizer ultra y por nanotracking.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Selección de NPs de fructanas basada en su proceso de producción y su potencial para atravesar la barrera hematoencefálica

La selección de las NPFs se realizó con base en su factibilidad de producción y propiedades fisicoquímicas que permitan su uso como un sistema de entrega y liberación de compuestos en el cerebro. Si bien, conocemos la arquitectura de estas enzimas es importante que se estudie a fondo su expresión, actividad y comportamiento cinético. Debido a que la producción de las NPF es a través de síntesis enzimática, analizar las características de las enzimas, como su producción, actividad y comportamiento cinético es de suma importancia para lograr optimizar el proceso de síntesis de estas NPF y por lo tanto seleccionar el mejor sistema de síntesis.

3.1.1 Análisis de las características de las enzimas productoras de NPs de fructanas

En este trabajo decidimos analizar cuatro enzimas que sintetizan NPF; la inulosacarasa IslA4 y 3 levansacarasas: la mutante unidominio SacB H243L, y las levansacarasas truncadas LevS Δ N85C y LevS N70 Tn38, y todas ellas sintetizan principalmente polímero de alto peso molecular (figura 3.I) (Peña-Cardena et al., 2015; Ortiz-Soto et al., 2008; Martínez-Bahena, 2019; Martínez Morales, 2021).

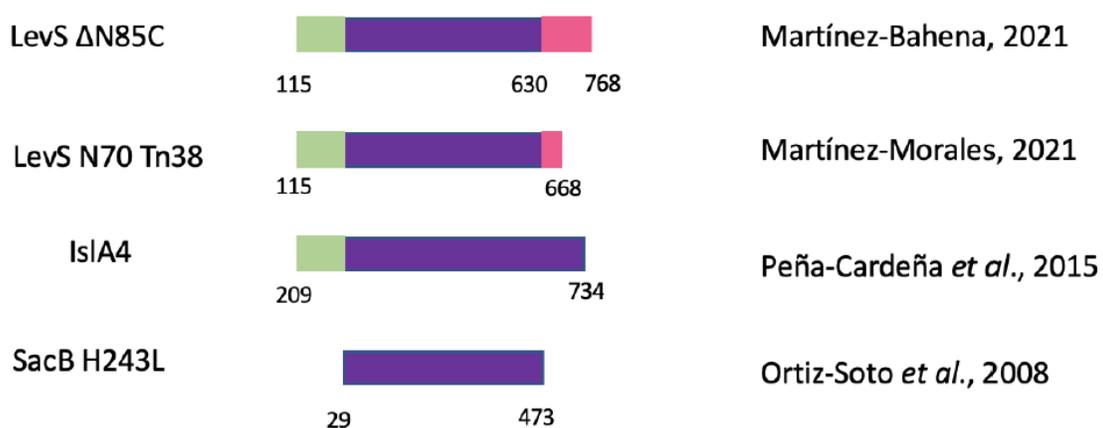


Figura 3.I. Representación de la secuencia de aminoácidos de las fructansacarasas bacterianas unidominio y multidominio. Verde: dominio N-terminal, Morado: dominio catalítico, Rosa: región de transición.

Con la finalidad de analizar y comparar las propiedades cinéticas y de expresión reportadas de estas cuatro enzimas se determinaron las constantes cinéticas de Δ N85C y LevS N70 Tn38 (Anexo B.3). En la tabla III.1 se observa que respecto a su expresión SacB H243L presenta 15.7 veces más expresión que IslA4 y 3.6 veces más que Δ N85C, sin embargo, LevS N70 Tn38 tiene una expresión 3 veces mayor que SacB H243L, 10 veces más que Δ N85C y 51 veces más que IslA4. Por otro lado, respecto a los parámetros cinéticos LevS N70 Tn38 presenta 37.8 veces más eficiencia catalítica que IslA4, 2 veces más que SacB H243L y 4.17 veces más que Δ N85C.

Tabla 3.1.1.1. Parámetros cinéticos de IslA4, SacB H243L y las versiones truncadas de LevS (Δ N85C y LevS N70 Tn38). Condiciones estándar de reacción: 30° C, 300 rpm, 1 U/mL y 100 g/L de sacarosa. Martínez-Morales, 2021^A; Mercado, 2022^B; Guillen-Tinoco, 2022^C; Espinosa, 2022^D; Peña-Cardena et al., 2015^E; Ortiz-Soto et al., 2008^F.

| Enzima | Actividad volumétrica (U/ml) | kcat/Km S⁻¹/mM |
|----------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------|
| IslA4 | 66.5 ± 2.64 ^D | 0.73 ^E |
| SacB H243L ^C | 1049 ± 16.30 | 13.5 ^F |
| Δ N85C ^A | 286 ± 2.37 | 6.63 ± 0.46 |
| LevS N70 Tn38 ^A | 3417 ± 26.06 | 27.65 ± 2.65 |

Si bien con este primer análisis determinamos que LevS N70 Tn38 es la enzima que presenta la mejor expresión y eficiencia catalítica, es necesario analizar el proceso de síntesis de las NPs y sus características.

3.1.2 Estudio del proceso de síntesis de las NPs de fructanas desarrollado por las enzimas Δ N85C y LevS Tn38

Debido a que la nanoestructuración se ha observado en el polímero de alto peso molecular, es de gran importancia contar con procesos que nos permitan obtener la mayor cantidad de este. Para mejorar el rendimiento en el proceso de síntesis del polímero se modificaron las condiciones de reacción y se decidió utilizar dos distintas concentraciones de enzima (1 y 2 U/mL), dos concentraciones de sustrato (100 y 200 g/L de sacarosa) y dos tiempos de reacción (6 y 12 horas). Este estudio se realizó exclusivamente con las enzimas LevS N70 Tn38 y Δ N85C ya que las

condiciones optimizadas de producción de NPF empleando a IslA4 y SacB H243L ya fueron estudiadas y reportadas anteriormente (Hernández-Rodríguez, 2021; Jiménez-Sánchez et al., 2019) sin embargo, serán consideradas y analizadas posteriormente para la selección del sistema de nanoacarreo. Se decidió no aumentar la concentración de enzima y sustrato más allá de las propuestas ya que reportes anteriores determinaron que a una concentración de enzima de 1.2 U/mL y 200- 400 g/L de sacarosa la cantidad de NPF ya no se ve modificada (Hou et al., 2020; Belghith et al., 2012).

En la figura 3.II, se observa que a las diferentes condiciones solo se sintetizó polímero nanoestructurado (polímero de alto peso molecular). En las condiciones de reacción estándar empleadas usualmente para estudiar estas enzimas (100 g/l sacarosa y 1 U/mL de enzima) observamos que se produce la menor cantidad de polímero, obteniendo 44.3 g/L y 35.2 g/L para Δ N85C y LevS N70 Tn38, respectivamente. Por otro lado, al ocupar el doble de concentración de sustrato y enzima (200 g/L y 2 U/mL) se obtienen para Δ N85C y LevS N70 Tn38 112.9 g/L y 95.2 g/L, respectivamente, es decir, 2.5 y 2.7 veces más polímero que con las condiciones estándar de reacción. Además, en los experimentos de Δ N85C utilizando 200 g/L de sustrato y 2 U/mL de enzima se observó una diferencia de 8.6 g/L de polímero entre las 6 y 12 horas, mientras que para la enzima LevS N70 Tn38 la diferencia en la cantidad de polímero entre estos dos tiempos fue de 15 g/L, es decir 1.7 veces más que en Δ N85C, por tanto, el tiempo que permite obtener el mayor rendimiento es 12 horas de reacción. Estos resultados coinciden por lo reportado por Charoenwongpaiboon y colaboradores en 2019 donde encontraron que al aumentar la concentración de enzima (inulosacarasa de *Lactobacillus reuteri* 121) y sustrato aumenta la síntesis de nanopartículas de inulina, sin embargo, en ese trabajo se encontró que por encima de 2.5 U/mL de enzima y 300 g/L de sacarosa la síntesis de NPs se ve disminuida.

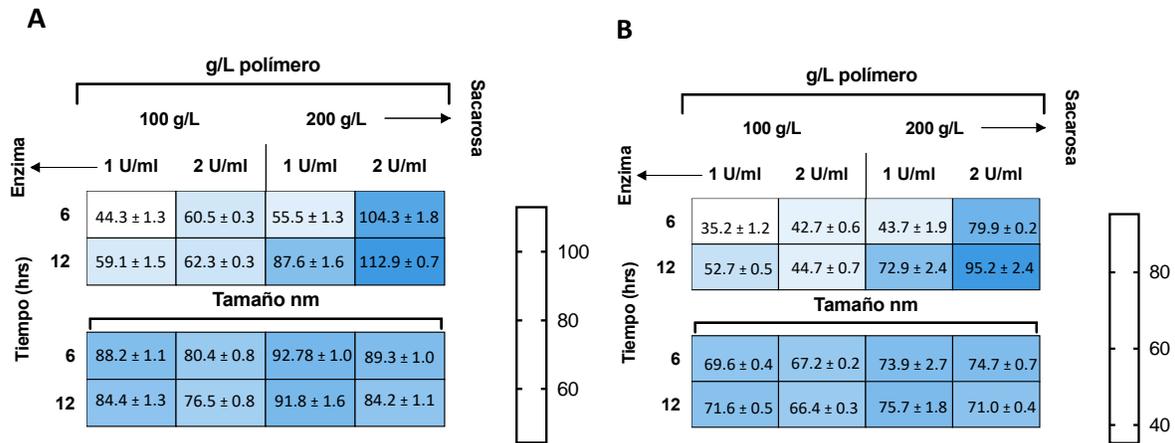


Figura 3.II. Efecto de las condiciones de reacción en la síntesis de polímero y tamaño de nanopartícula de: a) Δ N85C, y b) LevS N70 Tn38. Condiciones de reacción a 30 °C, 300 rpm.

Además, decidimos analizar el efecto de las condiciones de reacción de la síntesis de polímero en el tamaño de nanopartícula, de esta manera se observó que el tamaño se mantiene en un rango de 76 a 92 nm en las nanopartículas sintetizadas por la enzima Δ N85C, y de 66 a 75 nm para las nanopartículas sintetizadas por la enzima LevS N70 Tn38. Asimismo, se observó una diferencia de 12.3 nm entre el menor y mayor tamaño de nanopartícula sintetizadas por la enzima Δ N85C, y 9.38 nm entre las NP producidas por la enzima LevS N70 Tn38, no obstante, es importante recordar que los tamaños reportados corresponden a la media de una distribución de tamaños y que la resolución del equipo es de 20 nm (Bhattacharjee, 2016), por lo tanto, las diferencias observadas no son significativas.

Para entender el efecto que presentan cada una de las variables modificadas en este ensayo se realizó un diagrama de Pareto, que permite conocer el orden de importancia de las variables que intervienen en un estudio, ya que grafica la estimación de los efectos estandarizados desde el efecto más grande hasta el efecto más pequeño (Gutiérrez & Vara, 2008). El diagrama también grafica una línea de referencia (línea roja) que indica cuáles efectos son estadísticamente significativos (Figura 3.III). De esta manera, se determinó que las 3 variables y sus combinaciones presentan un efecto significativo sobre la producción de polímero (figura 3.III), sin embargo, la variable que presenta un mayor efecto es la concentración de sacarosa (sustrato), seguido de la concentración de enzima en el caso de Δ N85C, y el tiempo en LevS N70 Tn38. Previamente Hernández-Rodríguez en 2021, analizó el efecto de las condiciones de reacción en la síntesis de las

nanopartículas por la inulosacarasa IslA4 y encontró que la concentración de sustrato fue la variable que presenta mayor efecto en la cantidad de NPs sintetizadas, lo que coincide con lo observado en este trabajo para las levansacarosas Δ N85C y LevS N70 Tn38.

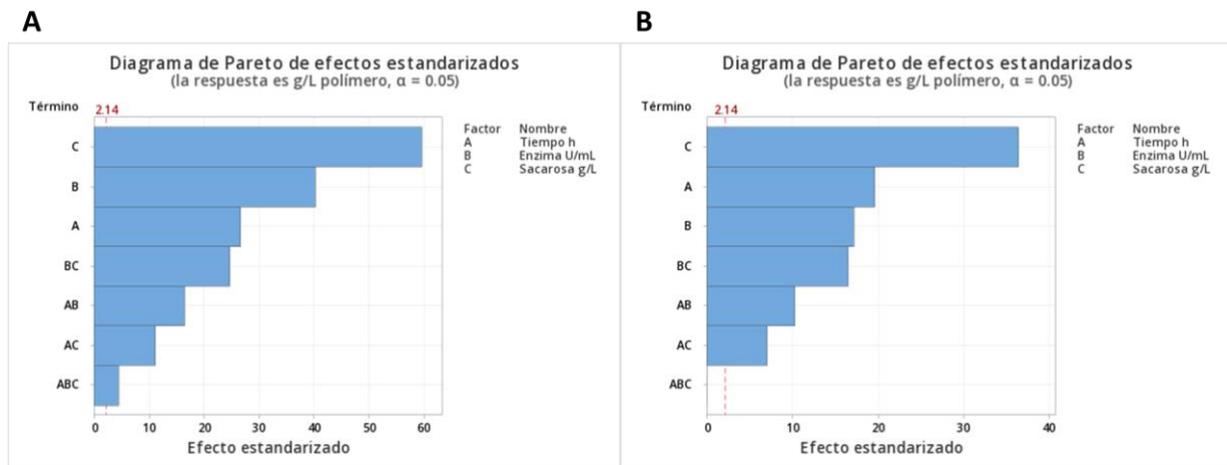


Figura 3.III. Contribución de las variables en la producción de polímero de: a) Δ N85C, y b) LevS N70 Tn38. Aquellas interacciones que presentan significancia son las barras que sobrepasan la línea roja.

3.1.3 Análisis de la morfología de las NPs de fructanas sintetizadas por las enzimas Δ N85C y LevS Tn38

Una vez determinadas las condiciones de reacción para obtener el mayor rendimiento en la síntesis de polímero de alto peso molecular con las enzimas Δ N85C y LevS N70 Tn38, que fueron 200 g/L de sacarosa, 2 U/mL de enzima y 12 horas de reacción, analizamos las características de las nanopartículas a estas condiciones. Por lo tanto, se analizó la morfología de las nanopartículas sintetizadas a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM). De acuerdo con las micrografías obtenidas (figura 3.IV), las nanopartículas presentan una morfología esférica. En el caso de las nanopartículas de Δ N85C (A y B) se observa una distribución de tamaños heterogénea, es decir, se observaron nanopartículas de diferentes tamaños esto similar a lo observado por Valdez-Echeverria en 2021, en las nanopartículas sintetizadas por SacB H243L, sin embargo, es importante analizar el índice de polispersidad para determinar el nivel de heterogeneidad de la muestra de NPs. Por otro lado, las nanopartículas de LevS N70 Tn38 (C y D) presentaron una morfología esférica más homogénea, con base en estos resultados se puede afirmar que los polímeros de alto peso molecular sintetizados por las enzimas Δ N85C y LevS N70 Tn38 a las condiciones de reacción seleccionadas en este proceso de síntesis son capaces de alcanzar su CAC

(Anexo B2) y nanoestructurarse a través de puentes de hidrógeno durante la síntesis enzimática formando así nanopartículas de morfología esférica y altamente monodispersas.

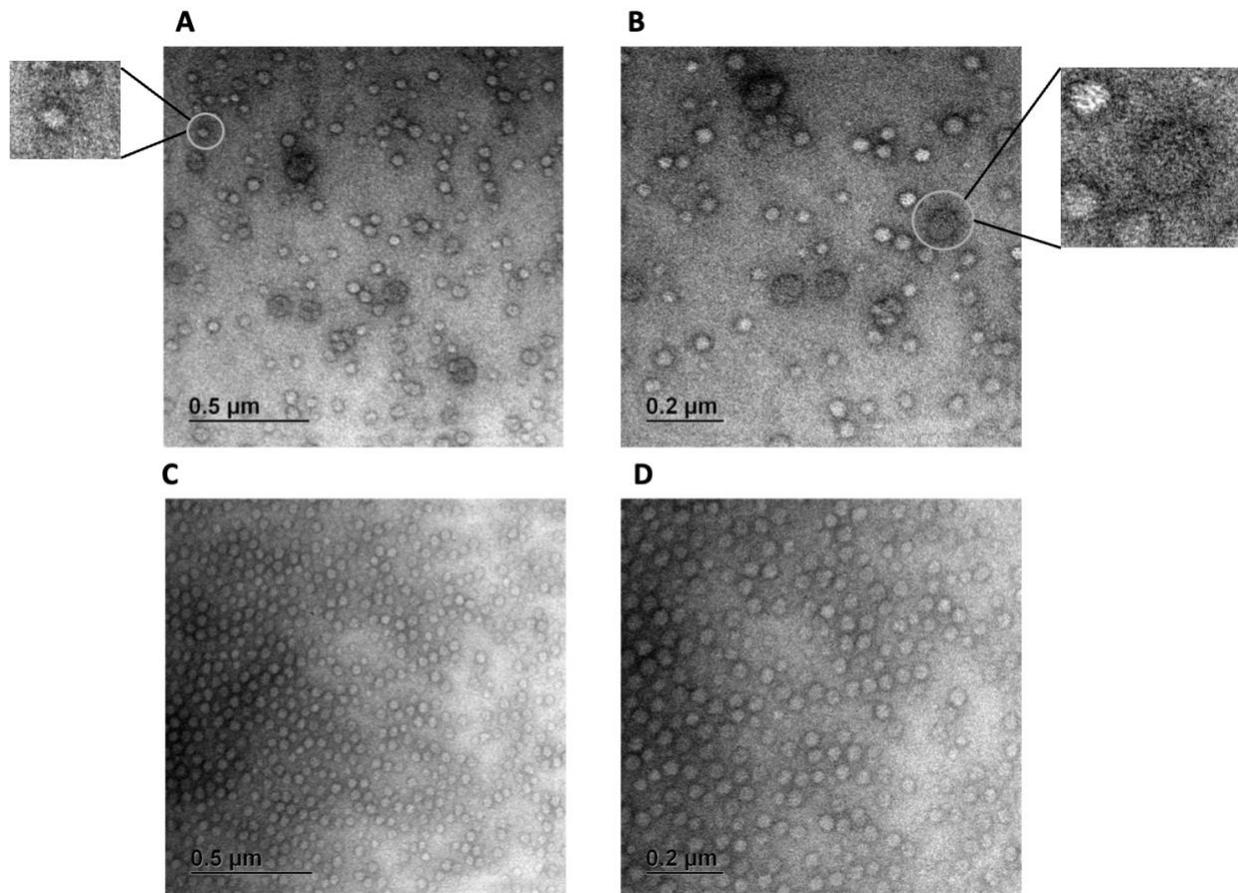


Figura 3.IV. Micrografías de nanopartículas de levanas sintetizadas por reacción enzimática: a, y b) LevS N70 Tn38; c, y d) Δ N85C.

3.1.4 Determinación del tamaño de las NPs de fructanas sintetizadas por las enzimas IslA4 y LevS N70 Tn38

Con el objetivo de conocer la distribución y tamaño promedio de las nanopartículas de fructanas se analizaron muestras de NPs de inulina (IslA4) sintetizadas previamente por Espinosa en 2022 y NPs de levana (LevS N70 Tn38) sintetizadas en este trabajo a una concentración de 2.5 g/L por las técnicas de Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) y DLS. Los resultados obtenidos por NTA muestran que las nanopartículas de inulina sintetizadas por IslA4 (figura 3.VA) presentan una distribución de tamaños desde 53 a 421 nm, sin embargo, la población más representativa (más del 80 % aproximadamente) tiene tamaños entre 53 y 69 nm, y un tamaño promedio de 84.1 ± 2.1

nm por NTA y de 112 ± 5 nm por DLS, este último determinado previamente por Hernández-Rodríguez en 2021. Por otro lado, las nanopartículas de levana sintetizadas por LevS N70 Tn38 presentan una distribución de tamaños de entre 51 y 433 nm (figura 3.VB), sin embargo, la población más representativa (más del 90 % aproximadamente) de nanopartículas presenta un tamaño de 51 nm, seguida de una segunda población de 76 nm y algunas NPs de tamaños mayores a 119 nm, además estas NPs presentaron un tamaño promedio de 65.4 ± 0.8 nm por NTA y de 71.02 ± 0.44 nm por DLS. De acuerdo con estos resultados las nanopartículas de levana presentan tamaños menores a las NPs de inulina, esto probablemente se deba al grado de ramificación de los polímeros. La diferencia en el tamaño promedio determinado por NTA y DLS se debe a que el DLS sobreestima ligeramente el tamaño (en aproximadamente un 10%), mientras que el NTA lo subestima, sin embargo, este último tiene una mejor resolución de tamaño (Tian et al.,2024; Zhdanov, 2020).

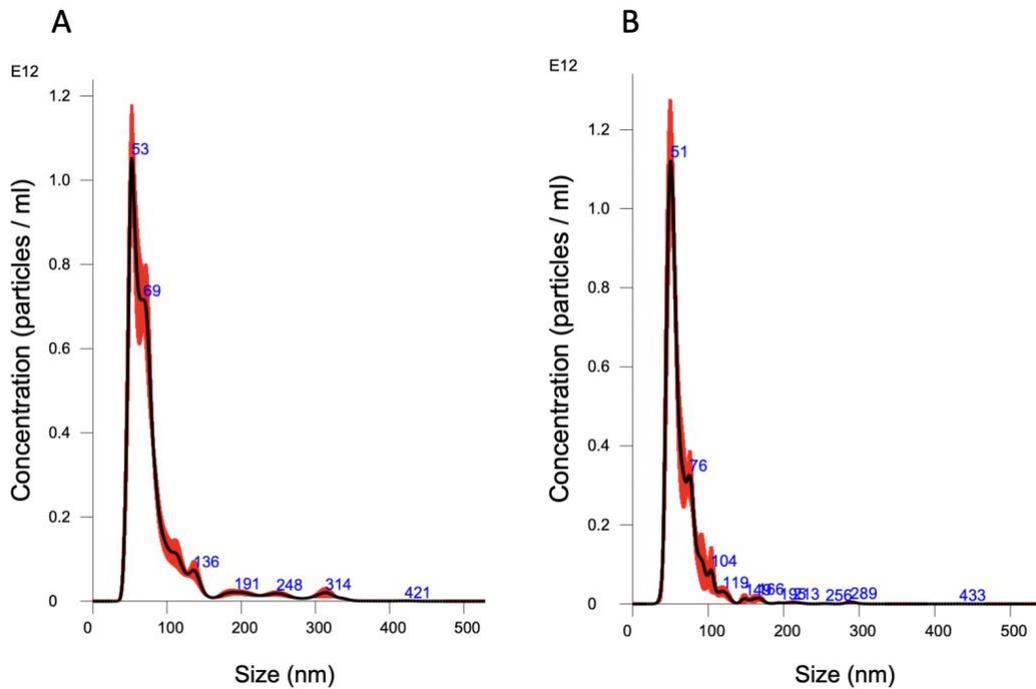


Figura 3.V. Distribución de las nanopartículas de fructanas determinado por NTA: a) Distribución tamaño de las nanopartículas de inulina (IslA4); b) Distribución de tamaño de las nanopartículas de levana (LevS N70 Tn38).

3.1.5 Determinación de la solubilidad de las NPs de fructanas

Debido a que la agregación de las NPs podría causar complicaciones como trombosis al bloquear los vasos sanguíneos, fue importante determinar la concentración de nanopartículas a la que estas comienzan a dejar de ser solubles y formar agregados que representen un riesgo en la salud. Por lo tanto, una vez confirmada la formación de nanopartículas a las condiciones de reacción seleccionadas se analizó la solubilidad de las nanopartículas sintetizadas por las cuatro enzimas: SacB H243L, IslA4, Δ N85C y Levs N70 Tn38. Encontramos que el polímero sintetizado por SacB H243L es el menos soluble, caso contrario, los polímeros sintetizados por IslA4, Δ N85C y LevS N70 Tn38 presentan una solubilidad similar entre ellos que es 4 veces mayor del producido por SacB H243L (tabla III.2). Debido a que se ha reportado que la solubilidad de polímeros de glucosa (dextran) depende del patrón de enlace ramificado (Kiran et al., 2009), es probable que la diferencia en la solubilidad observada en nuestras NPs se deba al grado de ramificación de cada uno de los polímeros. Previamente se ha reportado 0.05 % de ramificaciones para el polímero de SacB H243L, de 10.5 % para IslA4 y de 17.3 % aproximadamente para los de Δ N85C y Levs N70 Tn38 (Jiménez-Sánchez et al., 2019; Quiñonez, 2015). Estos resultados nos sugieren que en los polímeros de fructosa con un mayor porcentaje de ramificación confiere mayor solubilidad, lo que puede deberse a un aumento de áreas amorfas de los polímeros que favorecen la adsorción y retención de agua (Díaz-Montes et al., 2021).

Se ha reportado que la levana sintetizada por *B. subtilis* KBI es capaz de solubilizarse hasta 40 g/L, mientras que la inulina de *Eremurus spectabilis* se solubiliza solo 7 g/L (Domżał-Kędzia et al., 2019; Pourfarzad et al., 2015), la solubilidad de levana de SacB H243L está por debajo de la reportada, mientras que las nanopartículas de IslA4, Δ N85C y LevS N70 Tn38 presentan una solubilidad superior a la reportada.

Tabla 3.1.5.1. Determinación de la solubilidad de las nanopartículas de fructanas en agua. Condiciones a las que se determinó la solubilidad de las NPs: 40° C, 400 rpm durante 40 minutos. Concentración inicial de polímero = 150 mg/mL.

| Nanopartículas | Solubilidad mg/mL |
|----------------|-------------------|
| IslA4 | 107.57 ± 6.11 |
| SacB H243L | 29.11 ± 1.35 |
| ΔN85C | 111.32 ± 0.49 |
| LevS N70 Tn38 | 128.13 ± 0.48 |

3.1.6 Selección del sistema de atrapamiento y liberación basado en NPs de fructanas

Considerando los datos obtenidos en los diferentes análisis de este trabajo, se propuso seleccionar un sistema de NPs eficiente y con características idóneas que favorezcan su entrada al cerebro al cruzar la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, se compararon las nanopartículas generadas en nuestro grupo de investigación y se propuso seleccionar el modelo que cumpliera con los siguientes requerimientos: que tuvieran tamaños entre 70 y 180 nm, fueran monodispersas, neutras, altamente solubles y que presentaran altos rendimientos de producción que se consideró con los g/L de polímero sintetizado. En la tabla III.3 se resumen los datos recopilados de los 4 modelos de NPF propuestos.

Tabla 3.1.6.1. Propiedades de las nanopartículas de levana e inulina. *Jiménez-Sánchez et al., 2019. Condiciones óptimas de síntesis: a) 200 g/L de sacarosa, 2 U/mL, 30°C y 350 rpm; b) 100 g/L de sacarosa, 1 U/mL de enzima, 37°C y 350 rpm; c) 200 g/L sacarosa, 2 U/mL

| Nanopartículas | Polímero g/L | Tamaño NP nm | Potencial Z mV | Índice de polidispersidad PDI | Solubilidad mg/mL | Referencia |
|----------------|---------------|--------------|----------------|-------------------------------|-------------------|----------------------------------------|
| IslA4 | 27.91 ± 1.23 | 112 ± 5* | -0.55 ± 0.02 | 0.036 | 107.57 ± 6.11 | Hernández-Rodríguez, 2021 ^A |
| SacB H243L | 22.70 ± 0.08 | 111.9 ± 0.70 | -3.46 ± 0.78 | 0.04 | 29.11 ± 1.35 | Guillen-Tinoco, 2022 ^B |
| ΔN85C | 104.39 ± 1.89 | 89.35 ± 1.08 | -1.33 ± 0.17 | 0.086 | 111.32 ± 0.49 | Presente trabajo ^C |
| LevS N70 T38 | 95.24 ± 2.47 | 71.02 ± 0.44 | -1.78 ± 0.22 | 0.044 | 128.13 ± 0.48 | Presente trabajo ^C |

Al comparar a las NPs candidatas encontramos que respecto al tamaño se encuentran en el rango de los 71 y 112 nm, por lo que las cuatro cumplen con el tamaño deseado, este parámetro fue establecido debido a que se ha reportado previamente que las NPs menores a 200 nm pueden cruzar la barrera hematoencefálica a través de endocitosis mediada por clatrina y que las NPs de aproximadamente 100 nm presentan una penetración más profunda en el cerebro (Wohlfart et al., 2012; Zhang et al., 2021). Con relación a la monodispersidad se encontró que las cuatro nanopartículas tienen un PDI menor a 0.1, es decir, son altamente monodispersas, y, respecto a su neutralidad se determinó que estas presentan un potencial Z de entre -3.46 y -0.55 mV encontrándose cercanas a la neutralidad. A pesar de que las nanopartículas de fructanas presentan un valor de potencial Z cercano a la neutralidad, lo que en otros sistemas se ha observado que induce la agregación, en estas NPF se ha demostrado que permanecen estables durante al menos durante 15 días (Jiménez-Sánchez et al., 2019), esta característica es importante ya que se ha reportado que las nanopartículas neutras presentan tiempos de vida media prolongados en circulación, además de que presentan menor citotoxicidad que las NPs catiónicas (Blanco et al., 2015; Zhang et al., 2021). De esta manera que las cuatro candidatas cumplen con estas tres características (tamaño, monodispersidad y neutralidad). Sin embargo, determinamos que las NPs de SacB H243L son muy poco solubles, en promedio presentan 3.6 veces menor solubilidad que las otras 3 NPs por lo que se descartaron para los análisis posteriores. Debido a que las NPs de IslA4, Δ N85C y LevS N70 Tn38 cumplieron con las características antes mencionadas, fue importante considerar sus procesos de síntesis y las características de las enzimas que las sintetizan. De esta manera primero se comparó la cantidad de polímero obtenido para la formación de las NPs y observamos que IslA4 sintetiza 27 g/L de NPs de inulina, mientras que para Δ N85C y LevS N70 Tn38 se sintetizan en promedio 100 g/L de levana, es decir casi 3.5 veces más que para IslA4, por lo que considerando el rendimiento del proceso de síntesis de NPs se decidió omitir a las NPs de IslA4 en este proceso de selección, sin embargo, se propone en trabajos futuros mejorar sus rendimientos de producción con el fin de obtener una mayor cantidad de NPs pues resulta interesante poder estudiar su biodistribución *in vivo* así como analizar su potencial como sistemas de nanoacarreo en el cerebro ya que presentan diferente tipo de enlace y porcentajes de ramificación que las NPs de levana.

Sin embargo, una vez consideradas las características de las nanopartículas y sus rendimientos de producción los dos sistemas candidatos fueron las NPs de Δ N85C y LevS N70 Tn38, por lo que,

para elegir solo un sistema se analizaron las características de las enzimas que las sintetiza, es decir, se consideró la producción y eficiencia catalítica de las 2 enzimas (tabla III.1), en este caso, debido a que la enzima LevS N70 Tn38 presenta mayor producción y eficiencia catalítica que $\Delta N85C$ se decidió seleccionar como sistema final a las nanopartículas de LevS N70 Tn38 pues cumplen con el tamaño, carga, solubilidad y rendimiento de síntesis que las vuelven el mejor candidato para su estudio y posible aplicación como acarreador de compuestos hacia el cerebro.

3.2 Estudio de la capacidad de las NPs de fructanas para cruzar la barrera hematoencefálica mediante el análisis de biodistribución *in vivo* en modelos murinos

Una vez seleccionado el sistema de NPL sintetizado por LevS N70 Tn38 para estudiar su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro fue importante implementar una estrategia que permitiera rastrear a las nanopartículas *in vivo* en modelos murinos, por ello se decidió emplear el colorante verde de indocianina (ICG) (figura 3.VI) que ha sido atrapado previamente en nanopartículas de levana (Kim et al., 2015) y que además presenta una baja toxicidad y es utilizado ampliamente en aplicaciones terapéuticas (Lim et al., 2023).

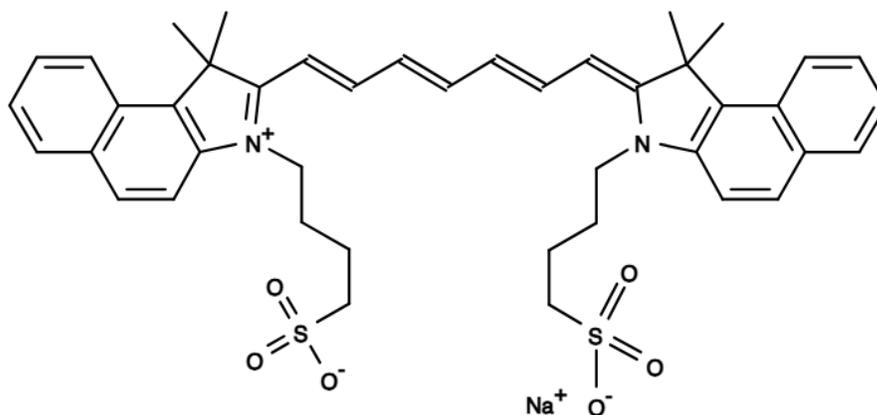


Figura 3.VI. Estructura química del verde de indocianina (ICG).

3.2.1 Síntesis del sistema de atrapamiento NPL-ICG

3.2.1.1 Efecto de la adición del colorante ICG en la síntesis y características de las nanopartículas de levana

Inicialmente, fue importante analizar si la adición del colorante ICG a la mezcla de reacción afectaba la síntesis del polímero de alto peso molecular (PAPM) y por lo tanto de las NPs, para ello se cuantificó por HPLC la cantidad de PAPM al agregar tres diferentes concentraciones de ICG. Los resultados presentados en la figura 3.VII, muestran que de 4 a 10 horas existe una disminución en la cantidad de PAPM sintetizado al agregar el ICG a la reacción, sin embargo, a tiempo final (12 horas) la cantidad de polímero obtenida es similar en todos los casos en un rango de 89.01 g/L a 102.19 g/L.

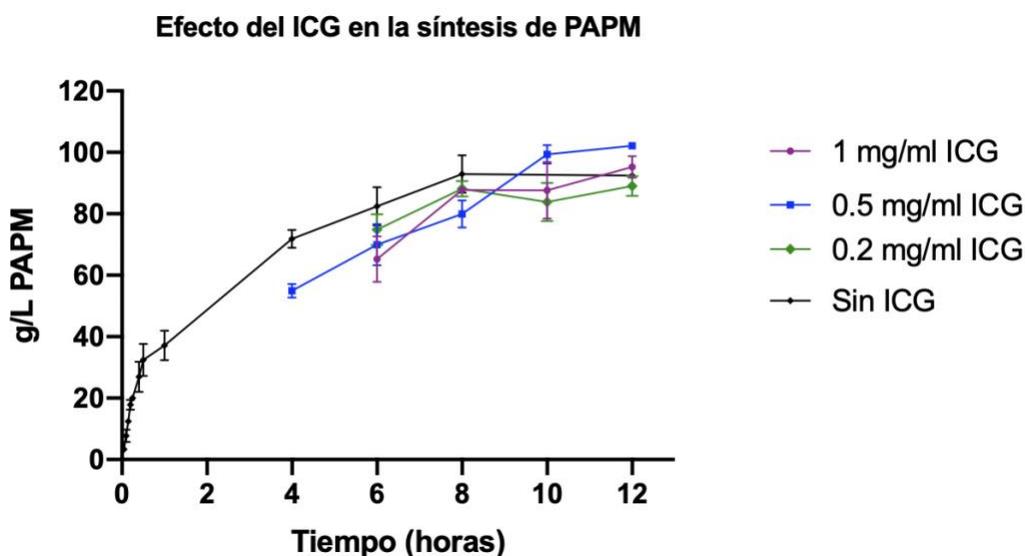


Figura 3.VII. Efecto de la adición del colorante verde de indocianina en la mezcla de reacción en la síntesis de PAPM.

Por otro lado, con el fin de analizar si el ICG afecta el tamaño y la dispersión de las NPL durante su síntesis se analizó el tamaño y PDI de las NPs a diferentes tiempos reacción. Los resultados son mostrados en la figura 3.VIII, donde se observa que de 5 minutos a 6 horas hay una disminución en el tamaño de NPs y el PDI y, que este último se mantiene por debajo de 0.1, es decir que la población es monodispersa. Sin embargo, al analizar la cinética de síntesis se observó que en ausencia de ICG la disminución del tamaño de las NPs es mayor en comparación con las muestras

a las que se les añadió el ICG, ya que sin ICG hubo una disminución de 83 nm a 67 nm de los 5 minutos a las 6 horas, es decir, un 20 % de cambio en el tamaño promedio de la población. La muestra que presenta 0.5 mg/mL de ICG presentó un comportamiento similar al control sin ICG ya que hubo una disminución de 78 a 68 nm, es decir, del 13 %. Caso contrario, las muestras con 0.2 y 1 mg/mL solo presentaron un cambio de 69 nm a 66 nm, lo que se encuentra dentro del promedio de la distribución. Si bien se observaron diferentes comportamientos en la cinética de tamaño y PDI de las nanopartículas en las diferentes muestras, es importante mencionar que a tiempo final (12 horas) en todas las muestras el tamaño de NPs fue de 68-66 nm y que estas presentaron un PDI menor a 0.1 lo que indica que nuestra población de nanopartículas es altamente monodispersa, por lo tanto, la adición del colorante durante la síntesis de las NPs no modifica sus características después de las 6 horas.

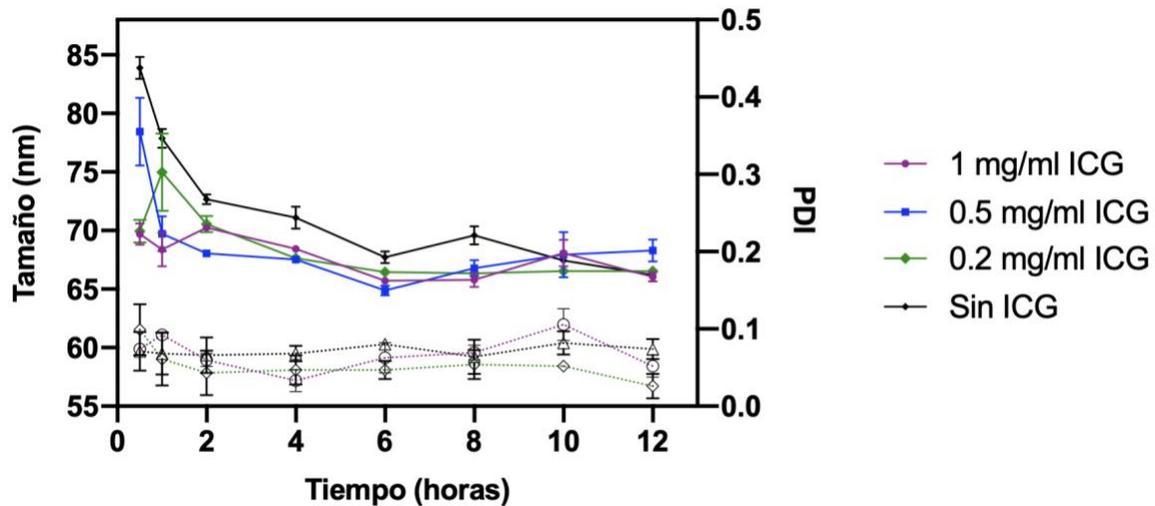


Figura 3.VIII. Estudio del efecto en el tamaño de nanopartículas e índice de polidispersidad (PDI) al adicionar el colorante ICG a la mezcla de reacción durante la síntesis de nanopartículas. Líneas punteadas representan el índice de polidispersidad (PDI) y las líneas continuas el tamaño (nm).

3.2.1.2 Estudio de la cinética de atrapamiento del colorante ICG en las nanopartículas de levana

Con el objetivo de determinar si el colorante ICG logra ser atrapado por las nanopartículas de levana, se propuso utilizar tres diferentes concentraciones de colorante para determinar la eficiencia de atrapamiento: 1 mg/mL (límite de solubilidad del colorante en agua), 0.5 mg/ml y 0.2 mg/mL de ICG. El atrapamiento del ICG se realizó durante la síntesis enzimática utilizando

las condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas reportadas para LevS N70 Tn38 en el apartado 3.1.2 del presente trabajo.

Los resultados se presentan en la figura 3.IX, mostrando que para 0.2 mg/mL de ICG el atrapamiento se da en las 2 primeras horas de reacción y se da una estabilización entre las 2 y 10 horas, sin embargo, entre las 10 y 12 horas se observó un aumento en la cantidad de ICG atrapado. Por otro lado, para la cinética de 0.5 mg/mL observamos algo similar, sin embargo, el aumento en el atrapamiento de ICG de 1 a 2 horas es más evidente. Por último, en la cinética de atrapamiento al utilizar 1 mg/mL de ICG observamos que la mayor cantidad de ICG atrapado se alcanza a las 8 horas y después se estabiliza. Nuestros resultados indican que la cantidad de ICG atrapado depende de la concentración de ICG agregada a la mezcla de reacción, de esta manera se obtuvo el mayor atrapamiento de ICG empleando 1 mg/mL de ICG. Estos resultados indican que el colorante ICG logra ser atrapado durante el autoensamblaje de las nanopartículas, probablemente a través de la formación de puentes de hidrógeno entre las nanopartículas de levana y el ICG.

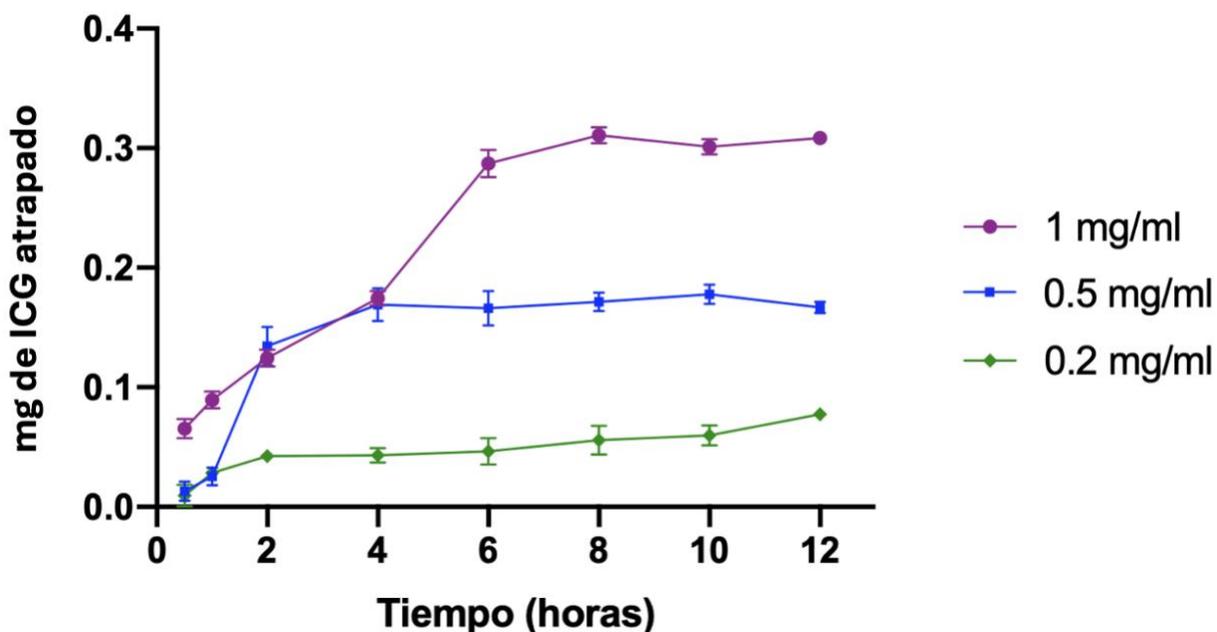


Figura 3.IX. Cinética de atrapamiento del colorante verde de indocianina (ICG).

Por otro lado, se analizó la eficiencia de atrapamiento y la capacidad de carga del sistema. Los resultados se muestran en la tabla III.4, donde encontramos que con 1 mg/mL de ICG agregado inicialmente se obtiene el mayor atrapamiento después de 12 horas de reacción. Respecto a la

capacidad de carga, encontramos que la mayor cantidad de ICG atrapado en este sistema es de 3.20 μg ICG/mg de NPL, en conclusión, observamos que, si bien la eficiencia de atrapamiento es similar al emplear las tres diferentes concentraciones de ICG, esta depende de la concentración inicial de ICG utilizada.

Tabla 3.2.1.1. Caracterización de la eficiencia de atrapamiento y capacidad de carga del sistema NPL-ICG. Condiciones de reacción: 200 g/L de sacarosa, 2 U/mL, 30 °C y 350 rpm.

| mg/ml ICG | ICG atrapado (mg) | Eficiencia de atrapamiento (EA%) | Capacidad de carga (μg ICG/mg de NPL) |
|------------------|--------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 1 | 0.308 \pm 0.006 | 30.19 % | 3.20 \pm 0.14 |
| 0.5 | 0.167 \pm 0.004 | 33.26 % | 1.75 \pm 0.09 |
| 0.2 | 0.077 \pm 0.003 | 38.50 % | 0.80 \pm 0.05 |

3.2.1.3 Estudio de la cinética de liberación del colorante ICG y estabilidad del sistema NPL-ICG

Con el objetivo de determinar si el colorante es liberado de las nanopartículas de levana después de su atrapamiento, se estudió la cinética de liberación usando buffer PBS con pH fisiológico (37°C, pH 7.4). Los resultados se muestran en la figura 3.X, donde observamos que el 90 % del colorante es liberado en las primeras 2 horas, posteriormente el otro 10 % es liberado de las 2 a las 12 horas. Estos resultados indican que la liberación del colorante es rápida pero constante. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Kim y colaboradores en 2015, ya que ellos reportaron el 60 % de liberación del colorante en la primera hora.

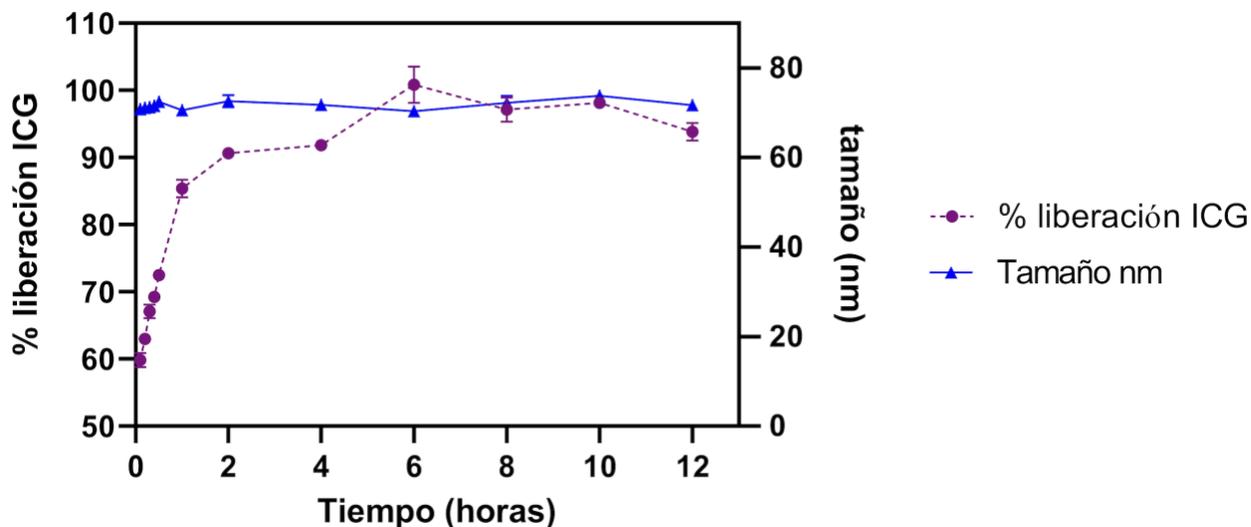


Figura 3.X. Cinética de liberación del colorante verde de indocianina (ICG) a condiciones fisiológicas 37°C, pH 7.4 durante 12 horas y determinación del tamaño de nanopartícula durante la liberación del ICG a las mismas condiciones.

Por otro lado, se caracterizó el tamaño, índice de polidispersión y potencial Z del sistema NPL-ICG empleando 1 mg/mL de ICG. Los resultados presentados en la tabla III.5, muestran que el tamaño del sistema es similar al tamaño de la nanopartícula sin ICG atrapado reportado en este trabajo (71 nm), lo que nos indica que el atrapamiento del colorante no afecta el tamaño de la nanopartícula. Estos resultados son contrarios a lo reportado por Kim y colaboradores en 2015, ya que ellos obtuvieron un sistema de 202 nm, en este caso el peso molecular del polímero utilizado por los autores fue de <2000 kDa, similar al polímero de alto peso molecular de LevS que es de 2200 kDa, sin embargo, es importante mencionar que el método de síntesis del sistema es distinto ya que ellos no atraparon el ICG durante la síntesis enzimática, si no que proponen la formación de nanopartículas por la interacción de las regiones hidrofóbicas de la levana y una vez mezclando la levana de alto peso molecular con el ICG se da la formación de NPs y, por lo tanto, el atrapamiento del colorante. Por otro lado, Lee y colaboradores en 2021 encapsularon ICG en nanopartículas de zeína-fosfatidilcolina y no observaron un cambio en el tamaño de nanopartícula, tal como lo observado en el presente trabajo. Por lo tanto, el método utilizado para el atrapamiento del colorante juega un papel crucial en las características del sistema.

Tabla 3.2.1.2. Caracterización las nanopartículas de levana y del sistema NPL-ICG.

| Muestra | Tamaño NPs nm | Índice de polispersidad PDI | Potencial Z mV | Nanopartícula s/mL |
|----------------|--------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| NPL | 71.02 ± 0.44 | 0.04 ± 0.015 | -1.78 ± 0.22 | 2.23x10 ¹² |
| NPL-ICG | 64.3 ± 0.83 | 0.04 ± 0.01 | -1.44 ± 0.32 | 2.59x10 ¹² |

Asimismo, el índice de polidispersidad y potencial Z del sistema no se vieron modificados lo que nos indica que la muestra se mantiene monodispersa y cercana a la neutralidad. Además, el atrapamiento del ICG no modificó el número de NPL formadas. Estos resultados permitieron conocer que las características de nuestro sistema son comparables a las NPL libres, lo que es de suma importancia, pues como se detalló en el apartado III.1, es importante que el sistema cumpla con el tamaño, neutralidad y homogeneidad adecuada para que mantenga su potencial para cruzar la BHE.

3.3 Estudio de la capacidad de las NPs de levana para llegar al cerebro

Para poder estudiar si las NPL son capaces de cruzar la barrea hematoencefálica y llegar al cerebro en ratones, monitoreamos su biodistribución *in vivo* y extrajimos del órgano de interés para determinar la presencia de estas por fluorescencia. Sin embargo, para poder llevar a cabo este ensayo fue necesario realizar análisis previos sobre la fluorescencia que presentan estas NPs a las condiciones en que pueden observarse los ratones y órganos en el equipo Xtreme Bruker que son de Ex(480)-Em(535).

3.3.1 Estudio de la fluorescencia de las NPs de levana para los estudios *in vivo*

Con el objetivo de analizar si es posible detectar a las nanopartículas *in vivo* se estudió su fluorescencia en solución así como la del sistema NPL-ICG y del buffer PBS en un fluorómetro a las condiciones de Ex(480)-Em(535) que coinciden con las longitudes de onda del equipo Bruker Xtreme donde se observaran posteriormente a los ratones. Los resultados se muestran en la figura 3.XI, en el panel A se observa el espectro de excitación y en el panel B se observa el espectro de emisión de las nanopartículas, del sistema NPL-ICG y del PBS. En el caso del espectro de excitación la longitud de onda de emisión fue fijada a 535 nm, por lo que el espectro nos indica a

que las longitudes de onda nuestra muestra absorberá para emitir en la única longitud de onda de emisión. Por otro lado, en el espectro de emisión de fluorescencia la onda de excitación se fijó a 480 nm.

Con estos resultados se identificó que las tres muestras presentan fluorescencia e incluso la intensidad de fluorescencia obtenida es similar en las condiciones de excitación y emisión que fueron para las NPL de 207-214, para el sistema NPL-ICG de 191-198 y de 21-22 para el PBS, en este caso la intensidad de fluorescencia obtenida para el PBS son 9 veces menores que las obtenidas en las NPL y el sistema NPL-ICG por lo que, en los ensayos *in vivo* esperamos observar mayor fluorescencia en los órganos extraídos de ratones inyectados con NPL que con el PBS.

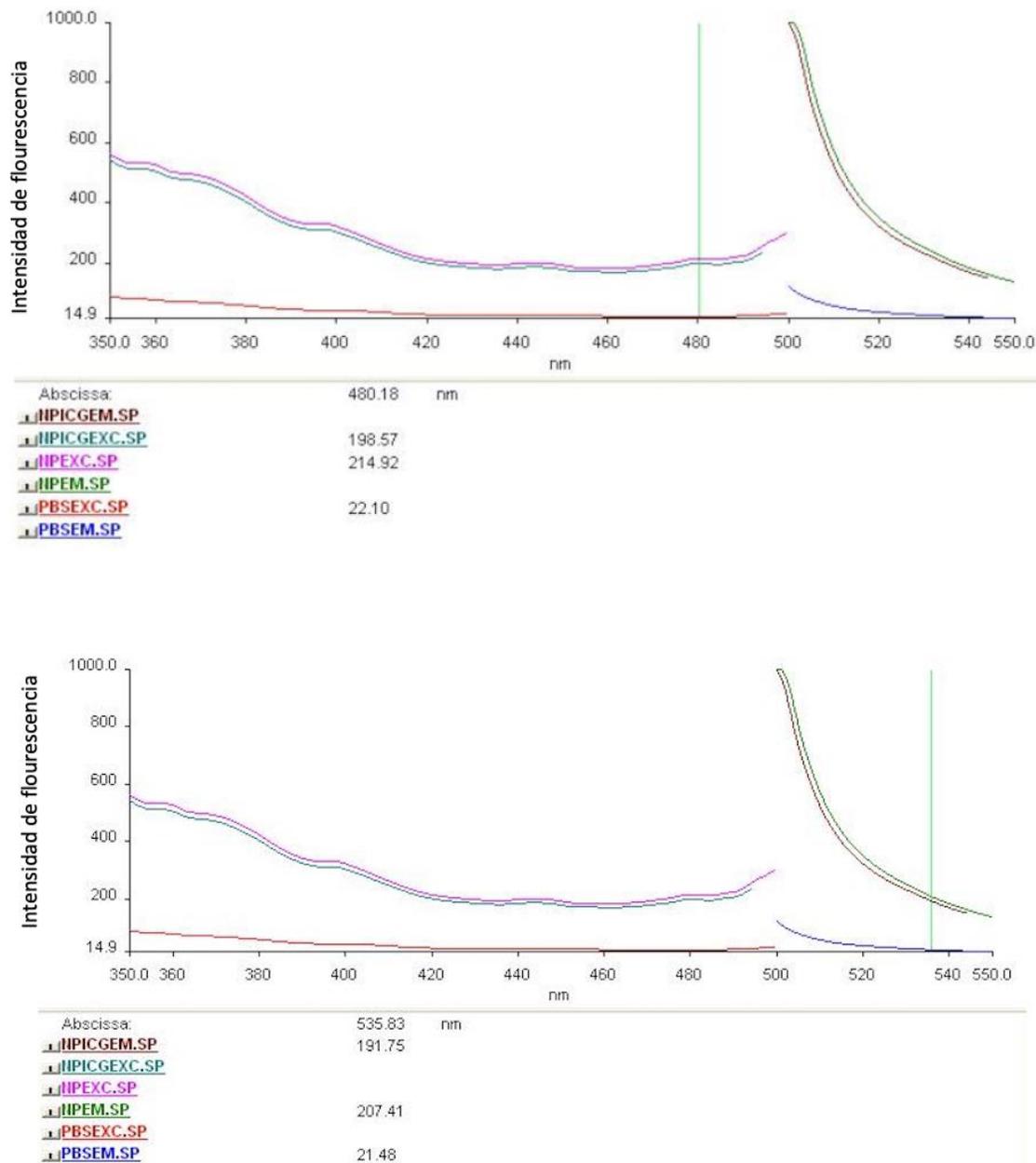


Figura 3.XI. Espectro de fluorescencia del PBS y las NPL determinado en el flourometro a las condiciones de Ex(480)-Em(535). NPICGEM: Sistema NPL-ICG condiciones de emisión; NPICGEXC: Sistema NPL-ICG condiciones de excitación; NPEXC: NPL condiciones de excitación; NPEM: NPL condiciones de emisión; PBSEXC: PBS condiciones de excitación; PBSEM: PBS condiciones de emisión.

3.3.2 Análisis de la biodistribución del colorante ICG libre en modelos murinos

Por otro lado, con el objetivo de determinar si el colorante libre es o no capaz de atravesar la BHE, se inyectó el colorante libre en ratones y se observaron en el equipo xtreme *in vivo* a las condiciones de (Ex(730)-Em(830), estas condiciones fueron seleccionadas ya que en estas es posible observar la fluorescencia del colorante ICG. Los resultados mostraron que al inyectar el colorante libre este se distribuía en todo el animal, incluso en el cerebro (figura 3.XIIA). Para poder observar de mejor manera la acumulación del ICG libre en órganos de interés, principalmente el cerebro, se realizó la extracción del cerebro, hígado y riñones y estos se observaron a las mismas condiciones (figura 3.XIIB). Se encontró que el colorante se acumulaba en los tres órganos, lo que fue un resultado inesperado en nuestro trabajo, pues de acuerdo con la literatura reportada el ICG no podía cruzar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro al menos que esta barrera presentara daños físicos (Keller et al., 2002; Sun et al., 2022; Kumar et al., 2019). La llegada del colorante al cerebro probablemente se deba a que como ya ha sido reportado, el 95 % de ICG se une a proteínas plasmáticas como la albúmina inmediatamente después de la inyección intravenosa, de manera que se ha observado que después de su unión la molécula es demasiado grande para cruzar la barrera hematoencefálica, sin embargo, se acumula y concentra en los compartimentos intravasculares sin invadir el parénquima cerebral (Foster et al., 2019; Kim et al., 2005), por lo que es probable que sea lo observado en este ensayo. De acuerdo con estos resultados la administración del sistema NPL-ICG no permitirá responder la pregunta de investigación, que se centra en la capacidad de las NPL para llegar al cerebro, pues el ICG libre se acumula en este órgano y no permitirá diferenciar la fluorescencia entre el ICG libre (liberado antes de que las NPL lleguen al cerebro) y el colorante liberado de la NPL una vez que esta logra cruzar la barrera hematoencefálica.

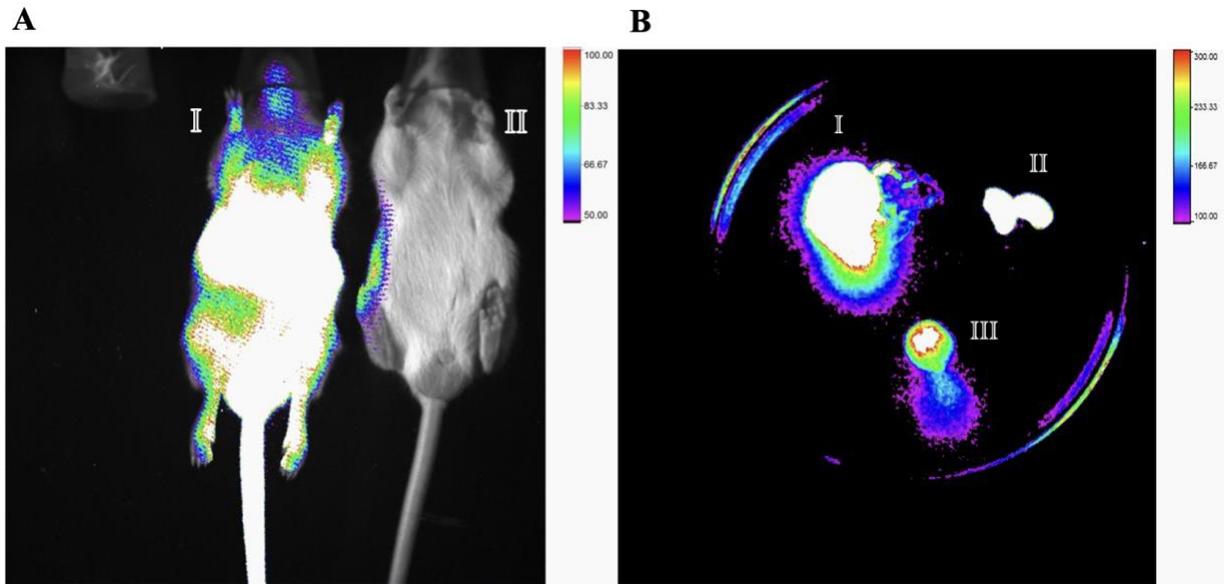


Figura 3.XII. Análisis de la biodistribución del ICG libre. AI: biodistribución del ICG libre; AII: biodistribución de las NPL. B: fluorescencia de órganos de los ratones inyectados con ICG libre. Condiciones Ex(730)-Em (830). Hígado, II: riñones, y III: cerebro.

Aprovechando la fluorescencia intrínseca de las NPLs, realizamos estudios de su biodistribución en modelos murinos para demostrar su capacidad para llegar al cerebro. Para este ensayo, se administraron por vía intravenosa NPL a ratones CD1, y después de ser sacrificados se les extrajeron los riñones, hígado y cerebro, y se observaron en un Sistema Xtreme, Bruker a dos condiciones: Ex(730)-Em(830) y Ex(480)-Em(535). Cabe destacar que en este estudio se utilizó la inyección de PBS como control. Los resultados presentados en la figura 3.XIII muestran que al administrar PBS por vía intravenosa no se observó fluorescencia en los órganos a condiciones de longitud de onda (Ex(730)-Em(830)). Por otro lado, cuando se inyectaron nanopartículas de levana se observó una ligera fluorescencia en el hígado y en el cerebro, en particular en el cerebelo.

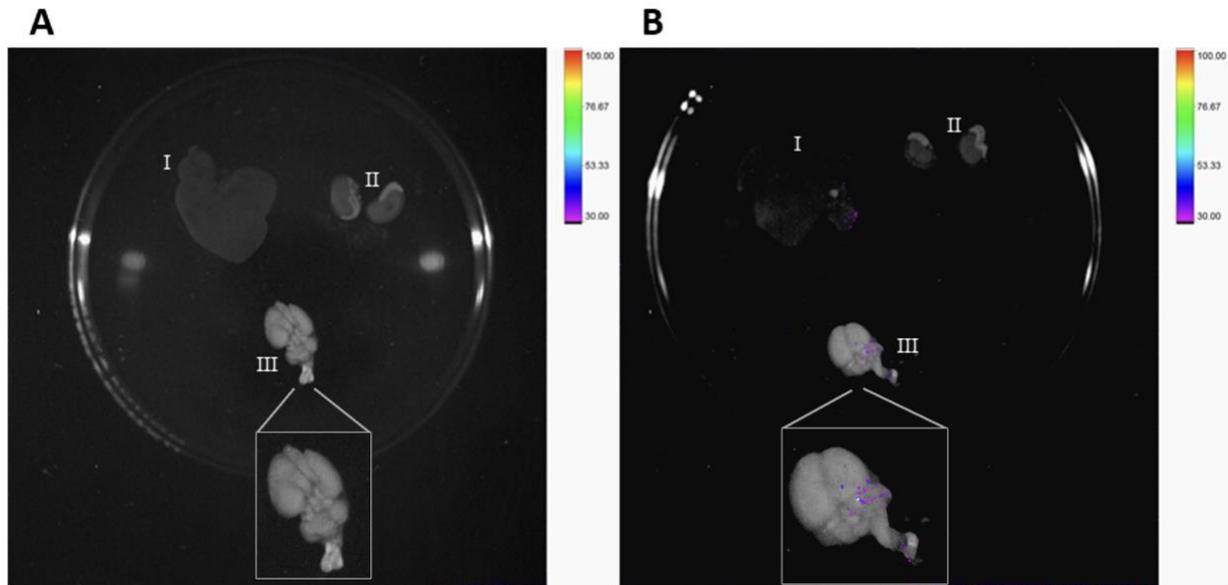


Figura 3.XIII. Fluorescencia de órganos: a) administración de PBS como control; b) administración de nanopartículas de levana. Condiciones Ex(730)-Em(830). I: Hígado; II: Riñones; III: Cerebro.

Debido a la baja intensidad de fluorescencia observada en el ensayo anterior, se decidió modificar las condiciones en las que se observaron los órganos, de esta manera se analizaron a Ex(480)-Em(535), longitud de onda a la que las nanopartículas de levana presentan mayor fluorescencia. Como se observa en la Figura 3.XIV, a esta longitud de onda el PBS emite una ligera señal de fluorescencia en riñón y mínimas señales en cerebro. Por otro lado, al administrar las NPL se observó clara señal en el cerebro, que fue más abundante e intensa que en la muestra de PBS. Estos resultados sugieren que las NPL logran cruzar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro. Proponemos que las NPL pueden cruzar la barrera hematoencefálica probablemente a través de los transportadores de glucosa-1 (GLUT-1) que es la vía de transporte de azúcares como la glucosa (Saraiva et al., 2016), ya que se ha informado previamente que estas NPL pueden ser transportadas por los receptores GLUT-5 en el caso de las células cancerosas (Kim et al., 2015). Además, es probable a que debido a su pequeño tamaño estas puedan penetrar a través de las uniones estrechas de las células endoteliales de la BHE (Zhang et al., 2021). Adicionalmente, recientemente se reportó que las nanopartículas de levana pueden ser reconocidas por los receptores CD44, por lo que está también podría ser una vía por la que puedan ser reconocidas y crucen la barrera hematoencefálica para llegar al cerebro (Lee et al., 2023; Galea et al., 2021). Con base en nuestros resultados y con lo reportado previamente en la literatura, el cruce de las NPs de levana a través

de la barrera hematoencefálica podría favorecerse al funcionalizar su superficie y así, puedan ser reconocidas por otros receptores además de los GLUT y CD44. Además, resulta interesante profundizar más en los ensayos *in vivo* al realizar una estimación sobre la cantidad de NPs que logran llegar al cerebro, lo que nos permitiría conocer más sobre el potencial de este sistema respecto a la dosis de fármacos que podrían entregar en el cerebro.

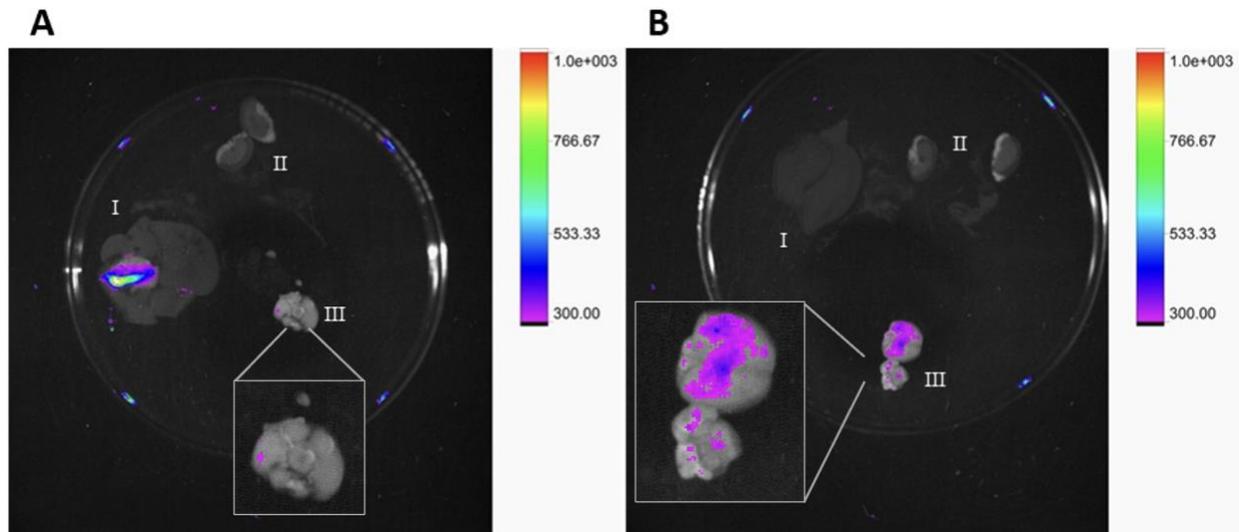


Figura 3.XIV. Fluorescencia de órganos: a) administración de PBS como control; b) administración de nanopartículas de levana. Condiciones Ex(480)-Em(535). I: Hígado; II: Riñones; III: Cerebro.

CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación, se seleccionó el sistema basado en nanopartículas de levana (NPL) sintetizado por la enzima LevS N70 Tn38 para estudiar su capacidad de llegar al cerebro. Este sistema, además de generar NPLs que cumplen con características que podrían favorecer su cruce por la barrera hematoencefálica (una morfología esférica monodispersa, un tamaño de 71 nm y una carga superficial muy cercana a la neutralidad) presentó un rendimiento del 95 % de conversión del sustrato en NPL. Por lo tanto, este sistema ofrece un proceso de síntesis eficiente con altos rendimientos para posibles aplicaciones futuras.

Asimismo, se atrapo el colorante ICG en las NPLs, demostrando que su atrapamiento no afecta ni el rendimiento de producción ni las características de las nanopartículas. Al administrar este sistema para estudiar la biodistribución de las NPL en modelos murinos se observó que el colorante libre puede llegar al cerebro, sin necesidad de ser transportado por las NPL, observación que contradice a lo reportado en la literatura (Keller et al., 2002; Sun et al., 2022).

Demostramos que las NPLs tienen fluorescencia intrínseca a Ex(480 nm)-Em(535 nm). Aprovechando esta fluorescencia intrínseca de las NPL, pudimos realizar los ensayos de biodistribución y los resultados sugieren que estas pueden llegar al cerebro probablemente al atravesar la BHE, respaldando así la elección de nuestro sistema y confirmando nuestra hipótesis planteada en este trabajo de investigación. Adicionalmente estos resultados nos permitieron sentar las bases para el desarrollo de este sistema basado en nanopartículas de levana para la entrega de compuestos en el cerebro.

PERSPECTIVAS

La principal prospectiva de este trabajo es demostrar la capacidad de las nanopartículas de levana para cruzar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro. Por lo que, podríamos atrapar un vector que contenga el gen de una proteína fluorescente que se exprese bajo un promotor de proteínas específicas de células gliales, por ejemplo, el promotor de la proteína ácida fibrilar glial (Gfap) de astrocitos, que se encuentran exclusivamente en el sistema nervioso central y por lo tanto en el cerebro (Shimizu et al., 2022; Zhou et al., 1997). Otra estrategia sería podría ser administrar NPL en modelos murinos, extraer el cerebro y realizar ensayos de inmunohistoquímica empleando anticuerpos anti-fructanas (Broson et al., 1999).

Por otro lado, se ha reportado que los módulos de unión a carbohidratos (CBM) de las glucósido hidrolasas podrían mejorar el reconocimiento de sustratos poliméricos gracias a la interacción entre sus residuos de triptófano y tirosina con los azúcares presentes en los polímeros (Lee et al., 2004; Zhou et al., 2016). Estos hallazgos resaltan el potencial de utilizar los BMC como etiquetas de fusión y como medio de unión a nanopartículas poliméricas (Oliviera et al., 2015; Boraston et al., 2004). Por lo tanto, proponemos la selección de un BMC específico para estudiar su unión a las nanopartículas de levana, esto con el fin de desarrollar una nanopartícula unida a un CBM para posteriormente fusionarlo a una proteína fluorescente y estudiar la capacidad de la NPL marcada para atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro mediante ensayos de biodistribución *in vivo* como los realizados en este trabajo.

Finalmente, además de confirmar el cruce de las NPL a través de la BHE, proponemos utilizar este sistema para el atrapamiento de fármacos o compuestos que permitan tratar afecciones del cerebro, adicionado a esto, consideramos de suma importancia funcionalizar a las NPL con un ligando para un receptor específico presente en la BHE y en el cerebro y así aumentar su especificidad y captación en este órgano, favoreciendo así la entrega del fármaco y/o compuesto de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Belghith, K. S., Dahech, I., Belghith, H., & Mejdoub, H. (2012). Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(2), 451–458.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not?. *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351.
- Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. In *Nature Biotechnology*, 33(9), 941–951. Nature Publishing Group.
- Boraston, A. B., Bolam, D. N., Gilbert, H. J., & Davies, G. J. (2004). Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. In *Biochem. J*, 382, 769–781.
- Brorson, K., Thompson, C., Wei, G., Krasnokutsky, M., & Stein, K. E. (1999). Mutational Analysis of Avidity and Fine Specificity of Anti-Levan Antibodies. *The Journal of Immunology*, 163 (12), 6694–6701.
- Castro, N. P., Olivero, J., Juan, V., & Padilla, R. (2009). Nanotecnología aplicada a la medicina, Nanotechnology applied to medicine. *Revista Científica Guillermo de Ockham*, 11(1), 125-133.
- Ceña, V., & Játiva, P. (2018). Nanoparticle crossing of blood-brain barrier: A road to new therapeutic approaches to central nervous system diseases. *Nanomedicine*, 13(13), 1513–1516.
- Charoenwongpaiboon, T., Wangpaiboon, K., Panpetch, P., Field, R. A., Barclay, J. E., Pichyangkura, R., & Kuttiyawong, K. (2019). Temperature-dependent inulin nanoparticles synthesized by *Lactobacillus reuteri* 121 inulosucrase and complex formation with flavonoids. *Carbohydrate Polymers*, 223.
- Cheng, T. M., Chu, H. Y., Huang, H. M., Li, Z. L., Chen, C. Y., Shih, Y. J., Whang-Peng, J., Cheng, R. H., Mo, J. K., Lin, H. Y., & Wang, K. (2022). Toxicologic Concerns with Current Medical Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14).
- Cinan, E., Cesur, S., Haskoylu, M. E., Gunduz, O., & Oner, E. T. (2021). Resveratrol-loaded levan nanoparticles produced by electrohydrodynamic atomization technique. *Nanomaterials*, 11(10).
- Cooper, P. D., Rajapaksha, K. H., Barclay, T. G., Ginic-Markovic, M., Gerson, A. R., & Petrovsky, N. (2015). Inulin crystal initiation via a glucose-fructose cross-link of adjacent polymer chains: Atomic force microscopy and static molecular modelling. *Carbohydrate Polymers*, 117, 964–972.
- Díaz-Montes, E. (2021). Dextran: Sources, Structures, and Properties. *Polysaccharides*, 2(3), 554–565.
- Ding, S., Khan, A. I., Cai, X., Song, Y., Lyu, Z., Du, D., Dutta, P., & Lin, Y. (2020). Overcoming blood–brain barrier transport: Advances in nanoparticle-based drug delivery strategies. *Materials Today*, 37, 112–125.
- Domżał-Kędzia, M., Ostrowska, M., Lewińska, A., & Łukaszewicz, M. (2023). Recent Developments and Applications of Microbial Levan, A Versatile Polysaccharide-Based Biopolymer. *Molecule*, 28(14).

- Espinosa, J. (2022). Estudio del complejo nanopartículas inulina-DNA plasmídico como sistema de entrega de ácidos nucleicos. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fakruddin, M., Hossain, Z., & Afroz, H. (2012). Prospects and applications of nanobiotechnology: A medical perspective. *Journal of Nanobiotechnology*, 10(31).
- Foster, C. H., Morone, P. J., Tomlinson, S. B., & Cohen-Gadol, A. A. (2019). Application of Indocyanine Green During Arteriovenous Malformation Surgery: Evidence, Techniques, and Practical Pearls. *Frontiers in Surgery*, 6.
- Gajewicz, A., Rasulev, B., Dinadayalane, T. C., Urbaszek, P., Puzyn, T., Leszczynska, D., & Leszczynski, J. (2012). Advancing risk assessment of engineered nanomaterials: Application of computational approaches. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(15), 1663–1693.
- Galea, I. (2021). The blood–brain barrier in systemic infection and inflammation. *Cellular and Molecular Immunology*, 18(11), 2489–2501.
- Gessner, I., & Neundorff, I. (2020). Nanoparticles modified with cell-penetrating peptides: Conjugation mechanisms, physicochemical properties, and application in cancer diagnosis and therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7).
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412.
- González-Garcinuño, Á., Tabernero, A., Marcelo, G., & Martín del Valle, E. (2020). A comprehensive study on levan nanoparticles formation: Kinetics and self-assembly modeling. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 1089–1098.
- Guillen-Tinoco, S. (2022). Estudio de la encapsulación de insulina en gliconanopartículas de levana producidas mediante síntesis enzimática. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gutiérrez Pulido, H., & de la Vara Salazar, R. (n.d.). Análisis y diseño de experimentos.
- Han, W., Liu, C., & Bai, R. (2007). A novel method to prepare high chitosan content blend hollow fiber membranes using a non-acidic dope solvent for highly enhanced adsorptive performance. *Journal of Membrane Science*, 302(1–2), 150–159.
- Hartl, C. L., Ramaswami, G., Pembroke, W. G., Muller, S., Pintacuda, G., Saha, A., Parsana, P., Battle, A., Lage, K., & Geschwind, D. H. (2021). Coexpression network architecture reveals the brain-wide and multiregional basis of disease susceptibility. *Nature Neuroscience*, 24(9), 1313–1323.
- Hernández- Rodríguez, J. (2021). Encapsulación y transfección de DNA plasmídico empleando nanopartículas de inulina producidas enzimáticamente. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hestrin, S., Feinold, D. S., & Avigad, G. (1956). The mechanism of polysaccharide production from sucrose. 3. Donor-acceptor specificity of levansucrase from *Aerobacter levanicum*. *The Biochemical Journal*, 64(2), 340–351.
- Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T., & Tashiro, Y. (1986). Effects of Fructooligosaccharides on Intestinal Flora and Human Health. *Bifidobacteria Microflora*, 5(1).
- Hou, Y., Huang, F., Yang, H., Cong, H., Zhang, X., Xie, X., Yang, H., Tong, Q., Luo, N., Zhu, P., & Meng, J. (2021). Factors affecting the production and molecular weight of levan

- in enzymatic synthesis by recombinant *Bacillus subtilis* levansucrase SacB-T305A. *Polymer International*, 70(2), 185–192.
- Jiménez-Sánchez, M., Pérez-Morales, R., Goycoolea, F. M., Mueller, M., Praznik, W., Loeppert, R., Bermúdez-Morales, V., Zavala-Padilla, G., Ayala, M., & Olvera, C. (2019). Self-assembled high molecular weight inulin nanoparticles: Enzymatic synthesis, physicochemical and biological properties. *Carbohydrate Polymers*, 215, 160–169.
 - Keller, E., Ishihara, H., Nadler, A., Niederer, P., Seifert, B., Yonekawa, Y., & Frei, K. (2002). Evaluation of brain toxicity following near infrared light exposure after indocyanine green dye injection. *Journal of Neuroscience Methods*, 23(31).
 - Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931.
 - Kim, D. E., Jaffer, F. A., Weissleder, R., Tung, C. H., & Schellingerhout, D. (2005). Near-infrared fluorescent imaging of cerebral thrombi and blood-brain barrier disruption in a mouse model of cerebral venous sinus thrombosis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25(2), 226–233.
 - Kim, S. J., Bae, P. K., & Chung, B. H. (2015). Self-assembled levan nanoparticles for targeted breast cancer imaging. *Chemical Communications*, 51(1), 107–110.
 - Kreuter, J., Alyautdin, R. N., Kharkevich, D. A., & Ivanov, A. A. (1995). Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain Research*, 674.
 - Kumar, P., Treuren, T. Van, Ranjan, A. P., Chaudhary, P., & Vishwanatha, J. K. (2019). In vivo imaging and biodistribution of near infrared dye loaded brain-metastatic-breast-cancer-cell-membrane coated polymeric nanoparticles. *Nanotechnology*, 30(26).
 - Łach, A., Wnuk, A., & Wójtowicz, A. K. (2023). Experimental Models to Study the Functions of the Blood–Brain Barrier. *Bioengineering*, 10,(5).
 - Lee, J. S., Park, E., Oh, H., Choi, W. Il, & Koo, H. (2023). Levan nanoparticles with intrinsic CD44-targeting ability for tumor-targeted drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 234.
 - Lehner, R., Wang, X., Marsch, S., & Hunziker, P. (2013). Intelligent nanomaterials for medicine: Carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application. In *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9(6), 742–757.
 - Lim, Z. Y., Mohan, S., Balasubramaniam, S., Ahmed, S., Siew, C. C. H., & Shelat, V. G. (2023). Indocyanine green dye and its application in gastrointestinal surgery: The future is bright green. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, 15(9), 1841–1857.
 - Liu, M., Li, H., Luo, G., Liu, Q., & Wang, Y. (2008). Pharmacokinetics and biodistribution of surface modification polymeric nanoparticles. *Archives of Pharmacal Research*, 31(4), 547–554.
 - Martínez-Bahena, S. (2020). Delimitando la región N-terminal involucrada en la procesividad de la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
 - Martínez-Morales, M. (2021). Identificación de la zona mínima funcional de la región de transición responsable en la actividad transferasa y procesividad de la levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
 - Medrano, C. (2018). Desarrollo de un método de encapsulación de biomoléculas en nanopartículas de inulina. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Mercado, I. (2020). Estudio de la relación estructura/ función de la región n100terminal de la inulosacarasa (IsIA) de *Leuconostoc citreum* CW28. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Monsalve, Y., Tosi, G., Ruozi, B., Belletti, D., Vilella, A., Zoli, M., Vandelli, M. A., Forni, F., López, B. L., & Sierra, L. (2015). PEG-g-chitosan nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26 for brain drug targeting. *Nanomedicine*, 10(11), 1735–1750.
- Najahi-Missaoui, W., Arnold, R. D., & Cummings, B. S. (2021). Safe nanoparticles: Are we there yet? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 1–22.
- Oliveira, C., Carvalho, V., Domingues, L., & Gama, F. M. (2015). Recombinant CBM-fusion technology - Applications overview. *Biotechnology Advances*, 33(3–4), 358–369.
- Olvera, C., Castillo, E., & López-Munguía, A. (2007). Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa. *Biotecnología*, 14, 327–346.
- Ortiz-Soto, M. E., Rivera, M., Rudiño-Piñera, E., Olvera, C., & López-Munguía, A. (2008). Selected mutations in *Bacillus subtilis* levansucrase semi-conserved regions affecting its biochemical properties. *Protein Engineering, Design and Selection*, 21(10), 589–595.
- Patel, T., Zhou, J., Piepmeier, J. M., & Saltzman, W. M. (2012). Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. In *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(7), 701–705.
- Peña-Cardena, A., Rodríguez-Alegría, M. E., Olvera, C., & Munguía, A. L. (2015). Synthesis of Fructooligosaccharides by IsIA4, a truncated inulosucrase from *Leuconostoc citreum*. *BMC Biotechnology*, 15(1).
- Pourfarzad, A., Habibi Najafi, M. B., Haddad Khodaparast, M. H., & Hassanzadeh Khayyat, M. (2015). Physicochemical properties of serish root (*Eremurus spectabilis*) fructan as affected by drying methods. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*, 7(5), 687–696.
- Qi, B., Wang, C., Ding, J., & Tao, W. (2019). Editorial: Applications of nanobiotechnology in pharmacology. In *Frontiers in Pharmacology*, 10.
- Quiñonez, O. (2015). Caracterización de nanopartículas de fructanas de diversos orígenes. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ritsema, T., & Smeekens, S. (2003). Fructans: Beneficial for plants and humans. In *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 223–230.
- Roney, C., Kulkarni, P., Arora, V., Antich, P., Bonte, F., Wu, A., Mallikarjuna, N. N., Manohar, S., Liang, H. F., Kulkarni, A. R., Sung, H. W., Sairam, M., & Aminabhavi, T. M. (2005). Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release*, 108(2–3), 193–214.
- Salata, O. V. (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 2.
- Saraiva, C., Praça, C., Ferreira, R., Santos, T., Ferreira, L., & Bernardino, L. (2016). Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*, 235, 34–47.
- Schroeder, U. (1998). Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(11), 1305–1307.
- Sezer, A. D., Kazak Sarılmışer, H., Rayaman, E., Çevikbaş, A., Öner, E. T., & Akbuğa, J. (2017). Development and characterization of vancomycin-loaded levan-based

- microparticular system for drug delivery. *Pharmaceutical Development and Technology*, 22(5), 627–634.
- Sezer, A. D., Kazak, H., Öner, E. T., & Akbua, J. (2011). Levan-based nanocarrier system for peptide and protein drug delivery: Optimization and influence of experimental parameters on the nanoparticle characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 358–363.
 - Sharma, H. S., Castellani, R. J., Smith, M. A., & Sharma, A. (2012). The Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. *Novel Therapeutic Targets and Nanodrug delivery*. In *International Review of Neurobiology*, 102, 47–90.
 - Shimizu, Y., Kawasaki, T., & Deguchi, T. (2022). Gfap transgenic medaka as a novel reporter line for neural stem cells. *Gene*, 820.
 - Silva, G. A. (2004). Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surgical Neurology*, 61(3), 216–220.
 - Sim, S., & Wong, N. K. (2021). Nanotechnology and its use in imaging and drug delivery (Review). *Biomedical Reports*, 14(5).
 - Smith, D. M., Simon, J. K., & Baker, J. R. (2013). Applications of nanotechnology for immunology. In *Nature Reviews Immunology*, 13(8), 592–605.
 - Sun, R., Liu, M., Xu, Z., Song, B., He, Y., & Wang, H. (2022). Silicon-based nanoprobe cross the blood–brain barrier for photothermal therapy of glioblastoma. *Nano Research*, 15(8), 7392–7401.
 - Tian, Y., Tian, D., Peng, X., & Qiu, H. (2024). Critical parameters to standardize the size and concentration determination of nanomaterials by nanoparticle tracking analysis. *International Journal of Pharmaceutics*, 656.
 - Valdez- Echeverria, R. (2021). *Nanomedicina: Gliconanopartículas como una terapia innovadora para el tratamiento de heridas*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
 - Vijn, I., & Smeekens, S. (1999). Update on Biochemistry Fructan: More Than a Reserve Carbohydrate?. *Plant Physiology*, 120, 351–359.
 - Villaseñor, R., Lampe, J., Schwaninger, M., & Collin, L. (2019). Intracellular transport and regulation of transcytosis across the blood–brain barrier. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(6), 1081–1092.
 - Wohlfart, S., Gelperina, S., & Kreuter, J. (2012). Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 264–273.
 - Zhang, W., Mehta, A., Tong, Z., Esser, L., & Voelcker, N. H. (2021). Development of Polymeric Nanoparticles for Blood–Brain Barrier Transfer—Strategies and Challenges. In *Advanced Science*, 8(10).
 - Zhdanov, V. P. (2020). How the partial-slip boundary condition can influence the interpretation of the DLS and NTA data. *Journal of Biological Physics*, 46(2), 169–176.
 - Zhou, S. H., Liu, Y., Zhao, Y. J., Chi, Z., Chi, Z. M., & Liu, G. L. (2016). Enhanced exo-inulinase activity and stability by fusion of an inulin-binding module. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(18), 8063–8074.
 - Zhou, Y., Peng, Z., Seven, E. S., & Leblanc, R. M. (2018). Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. In *Journal of Controlled Release*, 270, 90–303.
 - Zhuo, L., Sun, B., Zhang, C.-L., Fine, A., Chiu, S.-Y., & Messing, A. (1997). Live Astrocytes Visualized by Green Fluorescent Protein in Transgenic Mice. *Developmental biology*, 187.

ANEXOS

A. Implementación de un método de cuantificación de NPs empleando DLS

Con el objetivo de implementar un método para la cuantificación de nanopartículas de fructanas en solución fácil y accesible, se generaron curvas de calibración correlacionando la cantidad de nanopartículas determinada por 2 diferentes estrategias: DLS con un Zetasizer Ultra y el sistema NanoSight NTA con las UA a 204 nm. Las curvas se realizaron empleando 5 diferentes concentraciones de polímero (0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 mg/mL), se utilizaron nanopartículas de inulina (IsIA4) y levana (LevS N70 Tn38) esto con la finalidad de desarrollar una curva para cada tipo de polímero. Las curvas obtenidas para las nanopartículas de levana e inulina se muestran en la figura A.1. En nuestros resultados, se observa que empleando los 2 métodos es posible obtener una correlación entre el número de partículas y las UA a 204 nm determinadas para cada cantidad de polímero, sin embargo, se observó que el número de nanopartículas cuantificadas por NTA es 17-33 veces más a las cuantificadas por Zetasizer ultra en el caso de las NPs de inulina y 10-16 para las NPs de levana, no obstante, ambos métodos detectan un aumento en el número de nanopartículas conforme se aumenta la concentración de polímero, lo que nos indica que si bien existe una diferencia en el número de nanopartículas detectadas, ambos métodos permiten la generación de la correlación entre el número de nanopartículas y las UA a 204 nm. El aumento observado en el número de nanopartículas detectado por NTA puede deberse a la sensibilidad del equipo, ya que este es capaz de rastrear los movimientos de partículas individuales para calcular el coeficiente de difusión para cada partícula individual y determinar la concentración (Austin et al., 2020), mientras que el DLS Zetasizer utiliza la tasa de recuento de fotones como indicador de la concentración de nanopartículas, siempre y cuando se realicé la medición con MADLS (Multi-angle dynamic light scattering) (Sang & Gao, 2014).

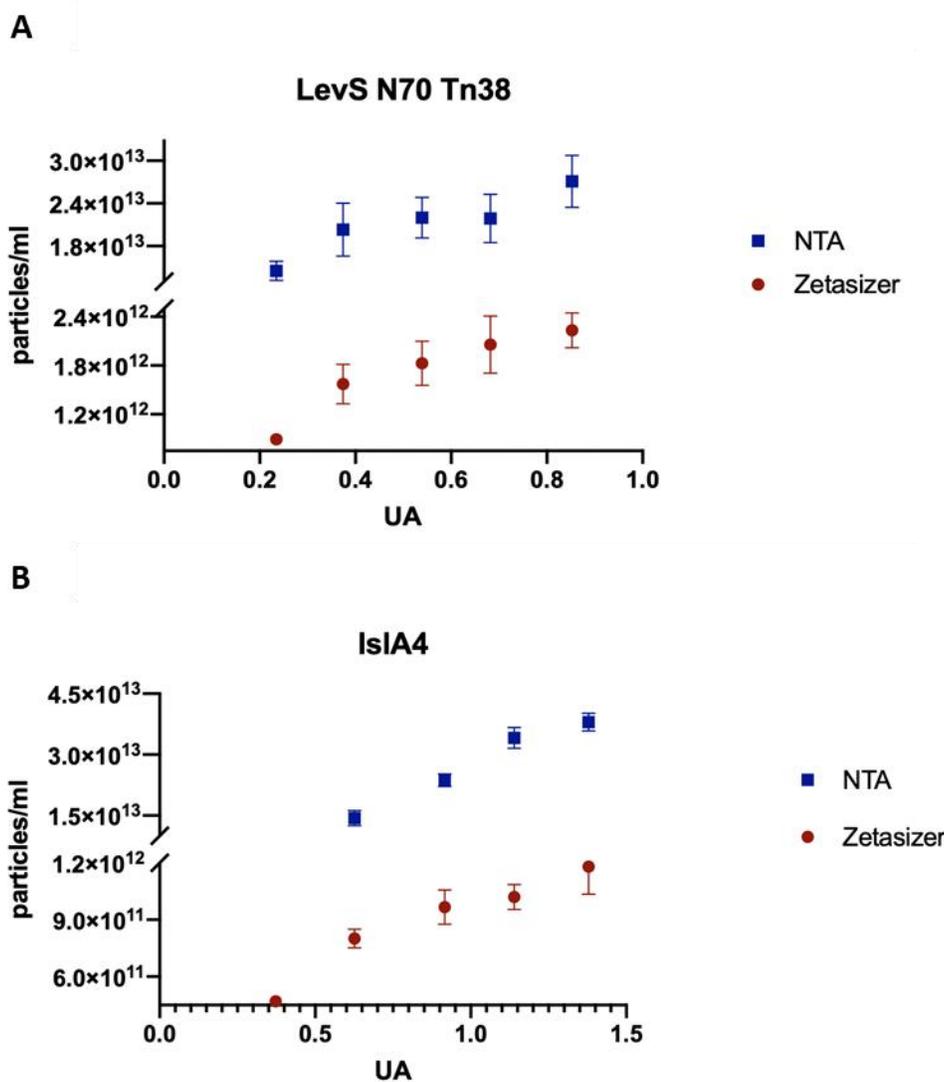


Figura A.1. Curvas de calibración generadas midiendo UA a 204 nm utilizando 5 diferentes concentraciones de polímero y 2 métodos diferentes de cuantificación de nanopartículas: a) Análisis de nanopartículas de levana (LevS N70 Tn38); b) Análisis de nanopartículas de inulina (IsIA4).

Es importante mencionar que la tasa de conteo de fotones en el DLS Zetasizer se define como el número de fotones detectados por segundo y tiene la unidad de kilocounts por segundo (Kcps) y en un cierto rango de concentración, la tasa de conteo de fotones es proporcional a la intensidad de la luz dispersada de las dispersiones coloidales global (Zang & Gao, 2014). Por lo tanto, es posible contemplar los valores de Kcps obtenidos en el Zetasizer ultra durante la determinación de tamaño y concentración de nanopartículas para cada una de 5 concentraciones de polímero para su correlación con la cantidad de nanopartículas cuantificadas en el NTA, tal como se observa en la figura A.2. En esta gráfica podemos observar que existe correlación entre el número de NPs y los

Kcps detectados ya que ambos valores cambian conjuntamente a una tasa constante. De esta manera, empleando esta curva estándar y analizando diferentes muestras en un DLS convencional (no tipo MADLS), es decir, empleando solo el scattering del ángulo 173° que fue utilizado para determinar los valores de Kcps de esta curva, podríamos obtener el valor de Kcps en una muestra y este valor utilizarlo para la estimación del número de nanopartículas presentes.

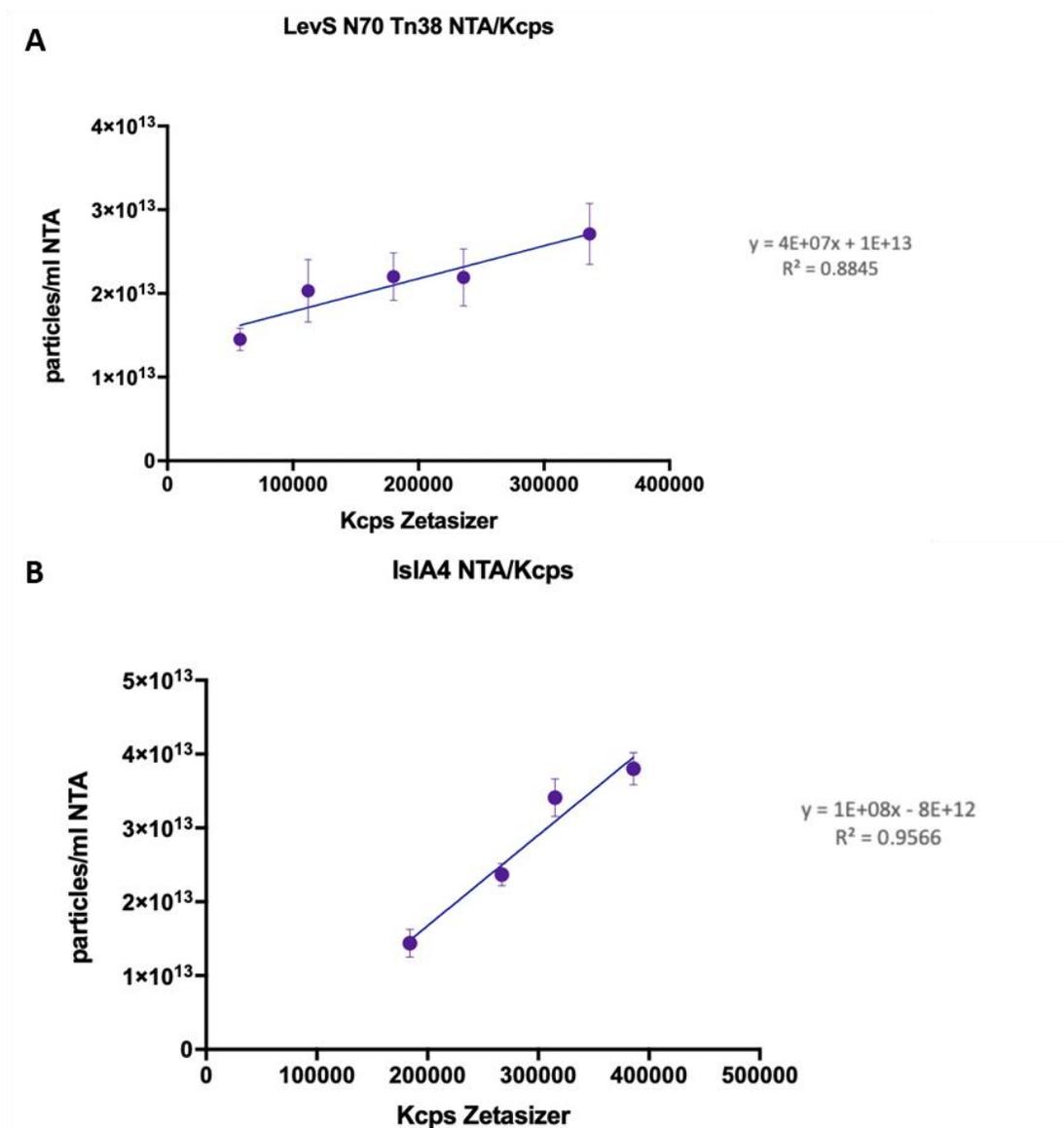


Figura Error! No text of specified style in document..1. Correlación entre el número de nanopartículas detectado por NTA y los Kcps detectados en el Zetasizer Ultra. A: Levana (LevS N70 Tn38); B: Inulina (IslA4).

Con estos resultados es posible observar que se generaron curvas validadas por 2 métodos diferentes: NTA y DLS Zetasizer ultra, en este caso, se propone determinar el valor de Kcps de la

muestra problema y no las UA a 204 nm, pues la tasa de recuento de fotones (Kcps) tiene relación directa con la concentración de nanopartículas detectadas en el Zetasizer y es un valor que podemos obtener en el equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (ZEN3600) utilizado en nuestro grupo de investigación.

B. Estabilidad del colorante ICG a la temperatura

A.B.1 Estabilidad del colorante ICG a la temperatura de inactivación enzimática

Debido a que el atrapamiento del ICG se realiza durante la síntesis enzimática de las nanopartículas, un punto importante durante este proceso es la inactivación de la enzima al final de la reacción, la inactivación enzimática se realiza congelando y calentando la muestra durante 15 min a 95°C, por lo tanto, es importante conocer la estabilidad del colorante a estas condiciones. En la tabla B.1, se muestran los resultados obtenidos después de someter el colorante libre a las condiciones de inactivación enzimática y se encontró un 15 % de disminución en la cuantificación del colorante, lo que nos indica que el ICG es inestable a temperaturas altas tal como ha sido reportado anteriormente (Björnsson et al.,1983).

Tabla Error! No text of specified style in document..1. Determinación de la estabilidad del colorante verde de indocianina a las condiciones de inactivación enzimática.

| MUESTRA | mg/L | % PERDIDO |
|------------------|------------|--------------|
| ICG | 4 ± 0.11 | 0 |
| ICG 15 min calor | 3.4 ± 0.24 | 15.97 ± 3.18 |

C. Cinética de formación de NPs de Levana

Con el objetivo de conocer la cinética de formación de nanopartículas de levana y determinar la concentración crítica de agregación (CAC), es decir la concentración de PAPM necesaria para que se formen las NPL, por lo tanto, se cuantificó la cantidad de polímero a diferentes tiempos y se analizó su tamaño y PDI por DLS. Los resultados presentados en la figura B.1 muestran que a los 8 minutos se observa la aparición de NPs en la muestra, es en este punto donde se presenta el PDI más alto, es decir, la muestra es altamente polidispersa, sin embargo, de los 8 minutos a los 20

minutos se da una disminución del tamaño de NPs y la población se hace cada vez más monodispersa, disminuyendo el PDI de 0.39 a 0.037. Por otro lado, al analizar la cinética de síntesis de PAMP se observa la formación de NPs y por ende el autoensamble aparece entre los 3.3 y 7.7 g/L de PAMP. De acuerdo con nuestros resultados y a lo reportado previamente en la literatura, la CCA para las nanopartículas de fructanas es variable y depende de las condiciones de síntesis de las NPs, así como de la enzima utilizada. De acuerdo con lo reportado por González-Garcinuño y colaboradores en 2019 la CCA para NPs de levana es de 0.24 g/L, es decir, 22 veces menor a lo observado en este trabajo, por otro lado, Jiménez-Sánchez y colaboradores en 2019 reportaron que la CCA para las nanopartículas de inulina es de 15 g/L, es decir 3 veces más que a lo reportado en nuestras nanopartículas. Estos resultados además de ayudarnos a comprender la formación de las NPF, nos da información sobre en qué momento se comienza la nanoestructuración del polímero y por ende el atrapamiento de las moléculas de interés.

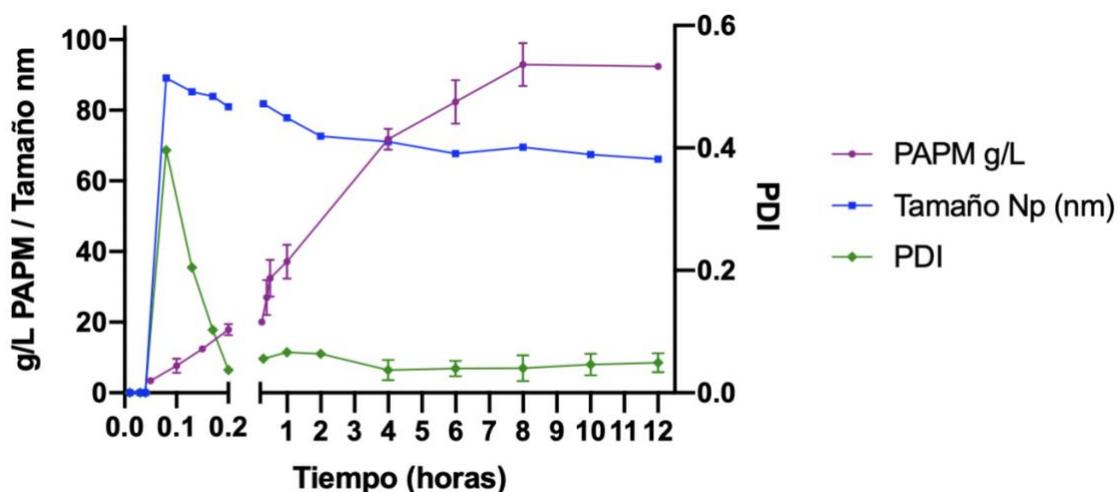


Figura C.1. Cinética de síntesis de PAMP de tipo levana y evolución del tamaño promedio de las nanopartículas de levana. Condiciones de reacción: 2 U mL⁻¹ de enzima, 200 g L⁻¹ de sacarosa, pH = 6, 300 rpm.

D. Determinación de las constantes cinéticas de las fructansacarosas Δ N85C Y LevS N70 Tn38

Para la determinación de las constantes cinéticas de las fructansacarosas Δ N85C Y LevS N70 Tn38 se realizó un ajuste al modelo de Michaelis-Menten (Figura). Con estos resultados, además observamos que ambas enzimas presentan una aparente inhibición por concentración de sustrato a 600 mM de sacarosa.

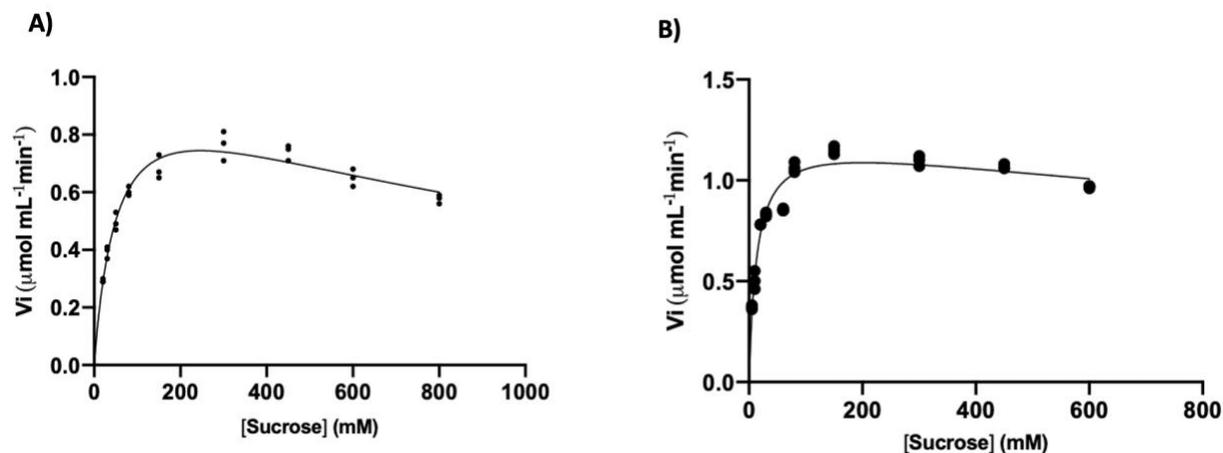


Figura D.1. Gráfico de la cinética de Michaelis y Menten de las fructansacarosas $\Delta N85C Y$ LevS N70 Tn38. Condiciones de reacción: 1 U mL^{-1} de enzima, pH = 6, 30°C y 300 rpm.

E. Determinación del tamaño de las NPL y el sistema NPL-ICG por DLS

Se determinó el tamaño de las NPL solas y del sistema NPL-ICG por DLS a una concentración de 2.5 g/L de polímero de alto peso molecular y se encontró que en ambas muestras solo existe una población de NPs. Para las nanopartículas de levana vacías el tamaño promedio determinado fue de X nm (figura B3A) y para el sistema NPL-ICG de X nm, (figura B3B), estos resultados indican que el atrapamiento del colorante ICG no modifica el tamaño de NPs.



B)

| | Size (d.nm): | % Intensity: | St Dev (d.nm): |
|-------------------------|---------------|--------------|----------------|
| Z-Average (d.nm): 65.74 | Peak 1: 69.65 | 100.0 | 17.43 |
| Pdl: 0.043 | Peak 2: 0.000 | 0.0 | 0.000 |
| Intercept: 0.912 | Peak 3: 0.000 | 0.0 | 0.000 |
| Result quality : Good | | | |

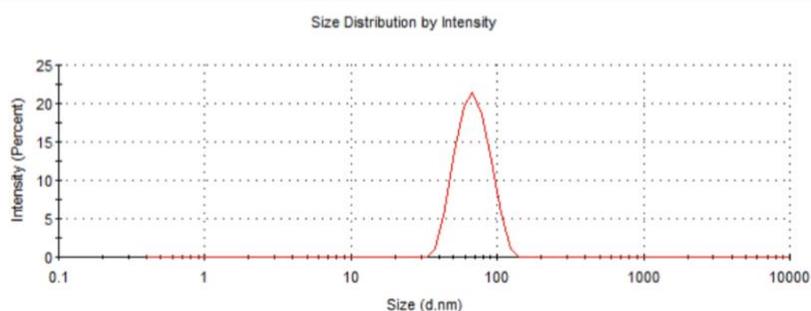


Figura E. 1. Determinación del tamaño de partícula por DLS para las A) NPL y el sistema B) NPL-ICG.

F. Análisis de la absorbancia de las nanopartículas a diferentes longitudes de onda

Se analizó el espectro de absorción de las nanopartículas de levana sintetizadas por LevS N70 Tn38, se realizó un barrido desde los 300 hasta los 780 nm. Se encontró que las nanopartículas presentan absorbancia de los 300 a los 580 nm aproximadamente, sin embargo, esta disminuye considerablemente después de los 400 nm (Figura F.1A). Esto coincide con lo previamente reportado en donde se ha observado que las nanopartículas de levana presentan mayor absorbancia a los 320 nm (Zhang et al., 2015).

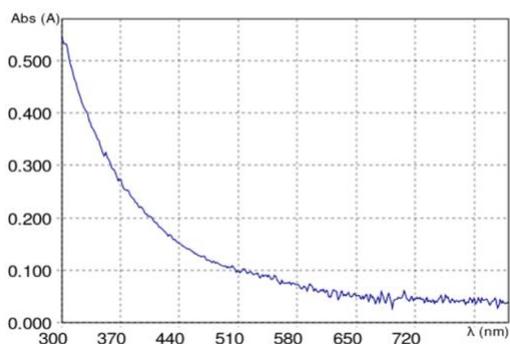
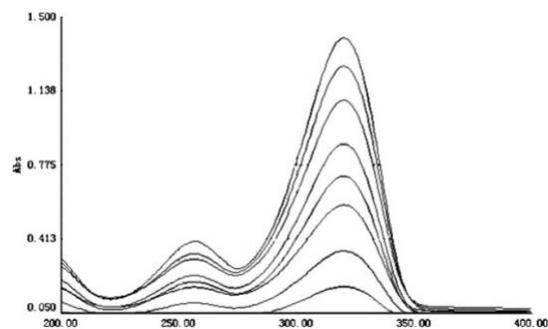
A)**B)**

Figura F. 1. Espectro de absorción de las nanopartículas de levana.