



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Construcción y caracterización de nanoacarreadores biocatalíticos basados en partículas tipo virus

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
Q. Sac Nicté Gómez Barrera

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ismael Bustos Jaimes
[Facultad de Medicina](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez
[Facultad de Medicina](#)

Dr. Arturo Navarro Ocaña
[Facultad de Química](#)

Ciudad Universitaria, CDMX. Abril, 2019



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme realizar mis estudios de Posgrado dentro del Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de la beca de excelencia para llevar acabo la presente Tesis de Maestría.

Este trabajo contó con los recursos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, Proyecto IN200316).

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| AGRADECIMIENTOS | 2 |
| ÍNDICE GENERAL | 3 |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | 6 |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | 10 |
| RESUMEN | 11 |
| INTRODUCCIÓN | 12 |
| <i>Capítulo 1. ANTECEDENTES</i> | 14 |
| 1.1. Bionanotecnología; en la frontera del conocimiento..... | 15 |
| 1.1.1. Nanomedicina..... | 18 |
| 1.1.2. Errores Innatos del Metabolismo | 19 |
| 1.1.3. Enfermedades lisosomales y la Terapia de Reemplazo Enzimático..... | 21 |
| 1.1.3.1 Deficiencia de Lipasa Ácida Lisosomal..... | 22 |
| 1.1.3.2 Terapia de reemplazo enzimático (ERT)..... | 24 |
| 1.2. Partículas tipo virus; nanoacarreadores de enzimas y sistemas de liberación de moléculas terapéuticas, una opción biocompatible..... | 26 |
| 1.3 Antecedentes directos..... | 30 |
| 1.3.1 Proteínas Quiméricas VP2-BpIA..... | 34 |
| 1.3.2 Lipasa A de <i>Bacillus pumilus</i> (BpIA). | 35 |
| 1.2.1 VLPs de Parvovirus B19 como modelo de estudio para producción de nanoacarreadores de enzimas..... | 30 |
| <i>Capítulo 2. HIPÓTESIS</i> | 39 |
| <i>Capítulo 3. OBJETIVOS</i> | 40 |
| 3.1 OBJETIVO GENERAL..... | 40 |
| 3.2 OBJETIVOS PARTICULARES..... | 40 |
| <i>Capítulo 4. MATERIALES Y MÉTODOS</i> | 41 |
| 4.1. METODOLIGÍA GENERAL..... | 42 |
| 4.2 MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN | 43 |
| 4.2.1 Reactivos | 43 |
| 4.2.2 Cepas | 45 |
| 4.2.3 Instrumentación | 45 |

| | | |
|---|--|-----------|
| 4.2.4 | Amortiguadores | 46 |
| 4.3 | MÉTODOS | 48 |
| 4.3.1 | Diseño de proteínas quiméricas | 48 |
| 4.3.2 | Obtención de células transformantes de <i>E. coli</i> BL21(DE3)..... | 50 |
| 4.3.3 | Sobreexpresión de proteínas recombinantes..... | 50 |
| 4.3.4 | Purificación de proteínas Q1, Q2 y VP2..... | 51 |
| 4.3.4.1. | Lisis..... | 51 |
| 4.3.4.2. | Lavado de cuerpos de inclusión | 52 |
| 4.3.4.3. | Purificación de proteínas desnaturalizadas mediante cromatografía de afinidad | 52 |
| 4.3.4 | Ensamble in-vitro de VLPs de proteínas Q1, Q2 y VP2..... | 54 |
| 4.3.5 | Caracterización de VLPs ensambladas | 55 |
| 4.3.4.4. | Análisis del radio hidrodinámico de VLPs por dispersión dinámica de luz..... | 55 |
| 4.3.4.5. | Densidad de partículas ensambladas mediante centrifugación isopícnica.... | 56 |
| 4.3.4.6. | Purificación de VLPs mediante cromatografía de exclusión molecular en HPLC y por SEC-MALS | 57 |
| 4.3.4.7. | Caracterización de VLPs mediante microscopía de transmisión de electrones (TEM) | 58 |
| 4.3.6 | Pruebas de estabilidad en medios no convencionales | 58 |
| 4.3.7 | Actividad hidrolítica de la lipasa BpIA en VLPs..... | 59 |
| 4.3.8 | Termoestabilidad de BpIA soportada en VLPs..... | 60 |
| 4.3.9 | Pruebas de hidrólisis de ésteres de colesterol por BpIA acarreada por VLPs. | 61 |
| 4.3.9.1 | Hidrólisis química de heptanoato de colesterol (CE) | 61 |
| 4.3.9.2 | Hidrólisis enzimática de heptanoato de colesterol (CE)..... | 62 |
| A. | Reacción a pH 7.0 y 30 °C..... | 63 |
| B. | Hidrólisis de heptanoato de colesterol a pH 5.0 y 30 °C..... | 63 |
| 4.3.9.3 | Determinación cualitativa de las reacciones de hidrolisis enzimática mediante cromatografía en capa fina. | 64 |
| 4.3.9.4 | Detección y cuantificación por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC). | 64 |
| Capítulo 5. Resultados y Discusión | | 67 |
| 5.1 | Obtención de células transformantes y sobreexpresión de proteínas quiméricas Q1 y Q2..... | 68 |
| 5.2 | Purificación de proteínas quiméricas. | 69 |

| | | |
|---------------------------------------|--|-----|
| 5.3 | Caracterización de VLPs ensambladas | 73 |
| 5.3.1 | Caracterización por Dispersión Dinámica de Luz (DLS) | 73 |
| 5.3.2 | Caracterización de partículas ensambladas mediante centrifugación isopícnica | 75 |
| 5.3.3 | Caracterización y purificación de VLPs por cromatografía de exclusión molecular. | 76 |
| 5.3.4 | Caracterización de partículas mediante microscopía de transmisión de electrones | 78 |
| 5.4 | Actividad enzimática..... | 79 |
| 5.5 | Termoestabilidad | 83 |
| 5.5 | Estabilidad de VLPs de proteína quiméricas y de VP2 en medios no convencionales..... | 87 |
| 5.6 | Pruebas de hidrólisis de ésteres de colesterol por los dominios de BpIA acarreados en VLPs. | 89 |
| 5.7 | Cuantificación de colesterol producido en la reacción enzimática de BpIA con colesteril heptanoato mediante RP-HPLC..... | 94 |
| 5.8.1. | Curva de calibración para la cuantificación de colesterol. | 96 |
| <i>Capítulo 6. CONCLUSIONES</i> | | 100 |
| Bibliografía..... | | 101 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. A) MOVIMIENTO DE LA MIOSINA A TRAVÉS DE LOS FILAMENTOS DE ACTINA, INDUCIDO POR Ca^{2+} Y ATP. B) IMITACIÓN DEL MOVIMIENTO MUSCULAR USANDO ROTAXANO BASADO EN UNA JAULA MOLECULAR. TOMADA DE (CHUN-JU. ET AL., 2009)..... | 15 |
| FIGURA 2. ESCALA NANOMÉTRICA Y EJEMPLOS. (PAUMIER G, 2008), | 16 |
| FIGURA 3. DIAGRAMA QUE RESUME LA INTERACCIÓN ENTRE LAS ÁREAS BIOLÓGICAS Y LA NANOTECNOLOGÍA. MODIFICADO (ROCO, 2003). | 17 |
| FIGURA 4. ESQUEMA QUE EJEMPLIFICA LA RELACIÓN ENTRE LA BIONANOTECNOLOGÍA CON LA NANOMEDICINA Y OTRAS BIOTECNOLOGÍAS. MODIFICADO (JAIN K.K., 2008)..... | 18 |
| FIGURA 5. ESQUEMA DE LA HOMEOSTASIS CELULAR DEL COLESTEROL. A) CÉLULA HEPÁTICA SANA, B) CÉLULA HEPÁTICA CON DEFICIENCIA DE LAL. ACAT , ACIL-COLESTEROL ACILTRANSFERASA; CE , ÉSTERES DE COLESTEROL; FA , ÁCIDO GRASO; FC , COLESTEROL LIBRE; FFA , ÁCIDO GRASO LIBRE; HMG-CoAR , HIDROXIMETILGLUTARIL-COENZIMA A REDUCTASA; LAL , LIPASA ÁCIDA LISOSOMAL; LDL-C , LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD; LDLR , RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD; SREBPs , PROTEÍNAS DE UNIÓN AL ELEMENTO REGULADOR DE ESTEROL; TG , TRIGLICÉRIDOS; VLDL-C , LIPOPROTEÍNAS DE MUY BAJA DENSIDAD. MODIFICADA DE (REINER, ET AL., 2014) | 23 |
| FIGURA 6. A) ADMINISTRACIÓN DE TRE VÍA INTRAVENOSA. B) VÍA INTRATECAL. C) ESQUEMA QUE EJEMPLIFICA EL MECANISMO DE RECONOCIMIENTO Y ENTRADA A LA CÉLULA POR LA ENZIMA EXÓGENA RECOMBINANTE. | 25 |
| FIGURA 7. CARICATURA DE AUTOENSAMBLE DE UNA VLP Y SU VERSATILIDAD, MODIFICANDO QUÍMICA O GENÉTICAMENTE EL EXTERIOR, LA INTERFASE O ENCAPSULANDO MOLÉCULAS. MODIFICADA (DUGLAS T., 2006). | 27 |
| FIGURA 8. APLICACIONES DE LAS VLPs (DING., 2018) | 27 |
| FIGURA 9. ESQUEMA DE LA PRODUCCIÓN DE VLPs UTILIZANDO A) CONJUGACIÓN QUÍMICA Y B) MODIFICACIÓN GENÉTICA. MODIFICADO (ONG, 2017) | 28 |
| FIGURA 10. ESTRATEGIA DE PRODUCCIÓN DE VLPs FUNCIONALIZADAS A TRAVÉS DE SPYTAG-SPYCATCHER. | 29 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 11. CARICATURA DE CÁPSIDE DEL VIRUS B19, INDICANDO LAS PROTEÍNAS ESTRUCTURALES VP1 Y VP2. | 31 |
| FIGURA 12. REPRESENTACIÓN DEL MECANISMO DE ENTRADA DE PARVOVIRUS A LA CÉLULA, DESDE EL RECONOCIMIENTO DE RECEPTORES DE MEMBRANA HASTA LA LIBERACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO EN EL NÚCLEO DEL HUÉSPED. TOMADO DE (TU, ET AL., 2015)..... | 32 |
| FIGURA 13. A) ESTRUCTURA RESUELTA DE PARVOVIRUS B19 FORMADA POR LA PROTEÍNA VP2. B) IMAGEN ESTEREOSCÓPICA DE LA TOPOLOGÍA DE LA SUPERFICIE DE VLPs DE B19V, EN LA QUE SE MUESTRAN LOS EJES DE ORDEN 2 (●), 3 (▲) Y 5 (◆) (MODIFICADA DE KAUFMANN ET AL., 2004). C) TRÍMERO DE VP2, CADA VLP ESTÁ CONSTITUIDA POR 20 TRÍMEROS (CAPSÓMEROS) DE VP2 (PDB 1S58). . | 33 |
| FIGURA 14. ESQUEMA DE LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS COMPLETA EFECTUADA POR LAS LIPASAS | 35 |
| FIGURA 15. REACCIONES CATALIZADAS POR LIPASAS EN MEDIO ACUOSO Y NO ACUOSO. | 36 |
| FIGURA 16. A) TOPOLOGÍA GENERAL A/B DE LAS LIPASAS Y POSICIÓN DE LA TRIADA CATALÍTICA FORMADA POR UN AMINOÁCIDO NUCLEÓFILO, UN AMINOÁCIDO ÁCIDO Y LA HISTIDINA. B) MODELO ESTRUCTURAL DE LA LIPASA A DE <i>B. PUMILUS</i> , EN LA QUE SE OBSERVA LA TRIADA CATALÍTICA SER77-ASP133-HIS156 (TOMADA DE MORA, 2008). | 37 |
| FIGURA 17. ESQUEMA GENERAL DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL..... | 42 |
| FIGURA 18. ESQUEMA DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA PROTEÍNA VP2-BPLA307 (Q1) Y DE BPLA-VP2 (Q2), EN AMBOS CASOS LA ETIQUETA DE HISTIDINAS SE ENCUENTRA EN EL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL, MIENTRAS QUE EN EL CASO DE Q2 LA CBP EN EL EXTREMO AMINO TERMINAL. | 48 |
| FIGURA 19. PLÁSMIDOS DE LAS PROTEÍNAS Q1 Y Q2 RESPECTIVAMENTE. A) PLÁSMIDO PET22B-VP2-BPL307 (Q1). EN ROJO ESTÁ SEÑALADOS LOS GENES VP2-BPLA307 QUE CODIFICAN PARA LA PROTEÍNA DEL INSERTO. B, C) CONSTRUCCIÓN PARA Q2. PLÁSMIDO PBSK- CBP_LIP_L, EN VERDE AGUA ESTÁN SEÑALADOS LOS GENES CBP-BPLA. PLÁSMIDO PET22B- LVP26H EN ROJO ESTÁ SEÑALADOS LOS GENES VP2 QUE CODIFICAN PARA LA PROTEÍNA. | 49 |
| FIGURA 20. REACCIÓN DE HIDROLISIS DE 4-NITROFENILACETATO..... | 59 |
| FIGURA 21. ESQUEMA DE REACCIÓN PARA LA HIDROLISIS QUÍMICA DEL HEPTANOATO DE COLESTEROL. .. | 61 |
| FIGURA 22. REACCIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE HEPTANOATO DE COLESTEROL MEDIADA POR BPLA. | 62 |
| FIGURA 23. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA BAJO CONDICIONES DESNATURALIZANTES PARA LA COMPROBACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS Q1, Q2 Y VP2. A) LISADOS CELULARES ANTES DE LA INDUCCIÓN. B) SOBREPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES. CARRIL 1, PROTEÍNA VP26H (58 kDA); CARRIL 2, PROTEÍNA Q2 (87 kDA); CARRIL 3, PROTEÍNA Q1 (81 kDA). | 68 |

- FIGURA 24.** CROMATOGRAMA OBTENIDO EN LA PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS Q1 Y Q2 A TRAVÉS DE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A NÍQUEL, EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES. LÍNEA AZUL, ABSORBANCIA A 280 NM; LÍNEA CAFÉ, CONDUCTIVIDAD; LÍNEA VERDE, GRADIENTE DE IMIDAZOL. 70
- FIGURA 25.** PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LAS FRACCIONES RECOLECTADAS DURANTE LA PURIFICACIÓN POR IMAC DE LAS PROTEÍNAS DE INTERÉS. A Y B) PURIFICACIÓN DE Q1 MEDIANTE FPLC. A) CARRILES 1-4, FRACCIONES CORRESPONDIENTES AL PICO 1B; CARRIL 5, MARCADOR DE PESO MOLECULAR; B) CARRILES 1-5, FRACCIONES CORRESPONDIENTES AL PICO 2B; CARRIL 7, MARCADOR DE PESO MOLECULAR. C) PURIFICACIÓN DE Q2 MEDIANTE FPLC. CARRILES 1-6, FRACCIONES CORRESPONDIENTES AL PICO 1A; CARRIL 7, MARCADOR DE PESO MOLECULAR. D) PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA VP26H POR GRAVEDAD. CARRILES 1-6, FRACCIONES RECUPERADAS DURANTE EL PROCESO DE ELUCIÓN; CARRIL 7, MARCADOR DE PESO MOLECULAR. 71
- FIGURA 26.** DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA POR DLS PARA LAS ESPECIES FORMADAS POR LAS PROTEÍNAS PURIFICADAS. **A)** ENSAMBLE DE VP2 (42 H DE DIÁLISIS). DISTRIBUCIÓN POR VOLUMEN. TAMAÑO PROMEDIO: 23.5 NM. Z = 174 NM. ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD: 0.312. **B)** ENSAMBLE DE Q1 (60 H DE DIÁLISIS). DISTRIBUCIÓN POR VOLUMEN. TAMAÑO PROMEDIO: 28.6 NM. Z = 180.6 NM. ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD: 0.652. **C)** ENSAMBLE DE Q2, (60 H DE DIÁLISIS). DISTRIBUCIÓN POR VOLUMEN. TAMAÑO PROMEDIO: 30.4 NM. Z = 154.7 NM. ÍNDICE DE POLIDISPERSIDAD: 0.460. 74
- FIGURA 27.** ANÁLISIS POR CENTRIFUGACIÓN ISOPÍCNICA EN GRADIENTE DE CsCl. **A)** VP2. **B)** CONTROL SIN PROTEÍNA (1), Q1 (2). **C)** CONTROL SIN PROTEÍNA (3), Q2 (4). 75
- FIGURA 28.** PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VLPs POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR. A) CROMATOGRAMA POR SEC DE Q1 EN UNA COLUMNA SEPHACRYL S-500; B) CROMATOGRAMA POR SEC DE Q2 EN UNA COLUMNA SEPHACRYL S-500; C) CROMATOGRAMA POR SEC DE Q1 EN UNA COLUMNA SEPHACRYL S-1000; D) CROMATOGRAMA POR SEC DE Q2 EN UNA COLUMNA SEPHACRYL S-1000; E) TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS OBTENIDA A PARTIR DE Q1 Y Q2 POR DLS Y MALS. 77
- FIGURA 29.** MICROGRAFÍAS DE VLPs DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS. A) Q1 CON TAMAÑOS DE APROXIMADAMENTE 28 NM CON AUMENTO DE 250000X. B) Q2 CON TAMAÑOS DE APROXIMADAMENTE 31 NM CON AUMENTO DE 250000X. 78
- FIGURA 30.** A) CURVA PATRÓN DE P-NF A 410 NM. 79

- FIGURA 31.** TERMOESTABILIDAD DE LIPASA BPLA SOPORTADA EN VLP'S DE VP2 A DIFERENTES TEMPERATURAS. LAS LÍNEAS CONTINUAS CORRESPONDEN AL AJUSTE LINEAL, EN DONDE LA PENDIENTE DE CADA UNA CORRESPONDE A LA CONSTANTE DE INACTIVACIÓN TÉRMICA K_{IE} EN MIN^{-1} . 84
- FIGURA 32** GRÁFICO DE LAS CONSTANTES DE INACTIVACIÓN TÉRMICA DE (K_{IE}) DE LA ENZIMA BPLA EN LAS VLPs QUIMÉRICAS Q1 Y Q2. 85
- FIGURA 33.** PLACA YA REVELADA QUE PERMITEN OBSERVAR EL AVANCE LOS DISTINTOS LÍPIDOS EN LA FASE ESTACIONARIA. CARRIL 1, COLESTERIL HEPTANOATO; CARRILES 2 Y 3, PRODUCTOS DE LA SAPONIFICACIÓN DEL COLESTERIL HEPTANOATO (ÁCIDO HEPTANÓICO, COLESTEROL Y COLESTERIL HEPTANOATO SIN REACCIONAR)..... 90
- FIGURA 34.** PLACAS YA REVELADAS QUE PERMITEN OBSERVAR EL AVANCE DE LOS DISTINTOS LÍPIDOS EN LA FASE ESTACIONARIA, ASÍ COMO SUS TIEMPOS DE RETENCIÓN. A) CARRIL 1, COLESTERIL HEPTANOATO; CARRIL 2, COLESTEROL; CARRIL 3, VLPs DE Q1 EN PBS; CARRIL 4, COLESTERIL HEPTANOATO EN PBS; CARRIL 5, MEZCLA DE REACCIÓN AL INICIO (VLPs DE Q1+ COLESTERIL HEPTANOATO EN PBS); CARRIL 6, MEZCLA DE REACCIÓN (VLPs DE Q1+ COLESTERIL HEPTANOATO EN PBS) DESPUÉS DE 6 H A 30 °C Y 300 RPM; CARRIL 7, VLPs DE Q2 EN PBS; CARRIL 4, COLESTERIL HEPTANOATO EN PBS; CARRIL 5, MEZCLA DE REACCIÓN AL INICIO (VLPs DE Q2+ COLESTERIL HEPTANOATO EN PBS); CARRIL 6, MEZCLA DE REACCIÓN (VLPs DE Q2+ COLESTERIL HEPTANOATO EN PBS) DESPUÉS DE 6 H A 30 °C Y 300 RPM. 91
- FIGURA 35.** PLACA DE REACCIONES A 30 °C DURANTE 24 Y 48 H PARA AMBAS QUIMERAS. CARRILES 1 Y 2 CORRESPONDEN A LAS REACCIONES DE LA Q1 (24 Y 48 H RESPECTIVAMENTE). CARRILES 3 Y 4, REACCIONES DE 24 Y 48 H PARA LA Q2..... 92
- FIGURA 36.** PLACAS DE REACCIONES A 30 °C Y PH 5, DURANTE 12 Y 24 H PARA AMBAS QUIMERAS. A) CARRILES 1 Y 2 CORRESPONDEN A LAS REACCIONES DE LA Q1 A 12 Y 24 H RESPECTIVAMENTE. B) CARRILES 3 Y 4, REACCIONES A LAS 12 Y 24 H PARA LA Q2..... 93
- FIGURA 37.** CROMATOGRAMAS OBTENIDOS EN LA DETECCIÓN DE ESTÁNDARES; A) COLESTEROL 1 MM, B) COLESTERIL HEPTANOATO 1MM 95
- FIGURA 38.** CURVA DE PATRÓN DE ESTÁNDAR INTERNO PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE COLESTEROL. 96
- FIGURA 39.** CROMATOGRAMA CARACTERÍSTICO DE LA DETECCIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DILUIDOS AL 50% SOBRELAPADO AL DE LOS ESTÁNDARES EN CONCENTRACIÓN 1MM. . 97

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|--------------------------------------|
| TABLA 1. APLICACIONES DE LA NANOMEDICINA (CASTER <i>ET AL.</i> , 2017). | 19 |
| TABLA 2. CLASIFICACIÓN GENERAL DE ENFERMEDADES DE DEPOSITO LISOSOMAL (LSDs) DE ACUERDO A LA MACROMOLÉCULA QUE NO SE LOGRA METABOLIZAR. MODIFICADO DE RUA M, 2014 | 21 |
| TABLA 3. VIRUS MÁS UTILIZADOS PARA LA FABRICACIÓN DE VLPS Y SUS CARACTERÍSTICAS. | 30 |
| TABLA 4. AMORTIGUADORES DE PRE-PURIFICACIÓN | 46 |
| TABLA 5. AMORTIGUADORES DE PURIFICACIÓN POR COLUMNA DE AFINIDAD A NÍQUEL (PARTE 1, PURIFICACIÓN POR FPLC). | 46 |
| TABLA 6 AMORTIGUADORES DE PURIFICACIÓN POR COLUMNA DE AFINIDAD A NÍQUEL (PARTE 2, COLUMNA POR GRAVEDAD) PARA Q1 | 46 |
| TABLA 7. AMORTIGUADORES DE PURIFICACIÓN POR COLUMNA DE AFINIDAD A NÍQUEL (PARTE 3, COLUMNA POR GRAVEDAD) PARA Q2 | 47 |
| TABLA 8. AMORTIGUADOR DE ENSAMBLE Y AMORTIGUADORES PARA CARACTERIZACIONES | 47 |
| TABLA 9. PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN PARA Q2, EN COLUMNA DE AFINIDAD A NÍQUEL POR GRAVEDAD | ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO. |
| TABLA 10. RESUMEN DE DISOLVENTES UTILIZADOS PARA LAS PRUEBAS DE ESTABIL..... | 58 |
| TABLA 11. CÁLCULO DE UNIDADES (U) DE ACTIVIDAD PARA Q1 Y Q2. | 80 |
| TABLA 12. ACTIVIDADES ESPECÍFICAS DE LOS DOMINIOS DE BPLA FUSIONADOS A LAS VLPS. | 81 |
| TABLA 13. COMPARACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS PROMEDIO OBTENIDAS PARA Q1 Y Q2 | 81 |
| TABLA 14. RESUMEN COMPARATIVO DE PARÁMETROS DE ESTABILIDAD PARA LA LIPASA DE BPLA EN LAS VLPS QUIMÉRICAS Y DE BPLA LIBRE* (DATOS RECOLECTADOS DE MORA, 2008) A DIFERENTES TEMPERATURAS. | 86 |
| TABLA 15. RESUMEN DE PRUEBAS DE ESTABILIDAD DE PARTÍCULAS DE LAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS Q1 Y Q2. TAMAÑOS DE PARTÍCULAS OBTENIDAS POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ EN LOS MEDIOS ORGÁNICOS | 88 |
| TABLA 16. RESUMEN DE PRUEBAS DE ESTABILIDAD DE PARTÍCULAS DE VP2. TAMAÑOS DE PARTÍCULAS OBTENIDAS POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ EN DISTINTOS LÍQUIDOS IÓNICOS..... | 88 |
| TABLA 17. DATOS PARA CURVA PATRÓN PARA COLESTEROL, LAS MEDICIONES SE REALIZARON POR TRIPLICADO | 96 |

| | |
|---|----|
| TABLA 18. RESUMEN DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS EXPERIMENTOS DE CUANTIFICACIÓN DE COLESTEROL PRODUCIDO EN LAS REACCIONES HIDROLÍTICAS EFECTUADAS POR BPLA CON COLESTERIL HEPTANOATO COMO SUSTRATO. | 98 |
|---|----|

RESUMEN

En la actualidad, las partículas tipo virus (VLPs) son sido utilizadas para el desarrollo de vacunas y nuevos nanomateriales de interés biomédico y farmacéutico. Por su naturaleza, las VLPs pueden funcionar como bloques de construcción “bottom-up” de estructuras más complejas, así como nanoacarreadores de biomoléculas y (o) fármacos que pueden ser presentados en el interior o exterior de las partículas para ser transportados a una célula diana, gracias al tropismo natural o inducido de las VLPs.

En este trabajo se exploró el potencial de las partículas tipo virus derivadas del parvovirus B19 que acarrean a una lipasa, en la reacción de hidrólisis de heptanoato de colesterol, así como su estabilidad térmica y en medios no acuosos.

Con estos fines, se ensamblaron partículas tipo virus provenientes de dos proteínas quiméricas recombinantes basadas en la proteína estructural VP2 del parvovirus B19 y la lipasa A de *Bacillus pumilus*, las cuales difieren en la posición en la se encuentra fusionada dicha enzima. La caracterización de las partículas se efectuó por métodos biofísicos tales como; dispersión dinámica de luz, cromatografía de exclusión molecular acoplada a dispersión estática de luz de múltiples ángulos (SEC-MALS), centrifugación isopícnica y microscopía electrónica de transmisión, así como por métodos bioquímicos como; electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, purificación por exclusión molecular, pruebas de actividad enzimática y termoestabilidad. Inicialmente se probó la estabilidad de estas VLPs en medios orgánicos, encontrando que esta es muy pobre. Sin embargo, en medio acuoso estas VLPs presentaron actividad hidrolítica contra un éster de colesterol. Este resultado sugiere que éstas partículas podrían ser probadas como modelos para el tratamiento de enfermedades lisosomales en las cuales se requiera de remplazo enzimático.

INTRODUCCIÓN

Aunque muchas enzimas implicadas en el metabolismo difunden libremente en el citoplasma, el alto rendimiento catalítico de las enzimas “in vivo” se debe en gran medida a su posicionamiento dentro del entorno biológico. Por esta razón, varios esfuerzos en la bionanotecnología se han encaminado a imitar la organización y entorno natural de estas enzimas con fines tecnológicos, tanto terapéuticos como industriales (degradación de polímeros, biosensores, estabilidad de alimentos, etc.).

El acoplamiento de enzimas a cadenas de proteínas altamente ordenadas, tales como virus, es una forma atractiva para conseguir un posicionamiento optimizado de éstas. Las partículas tipo virus (VLPs) son nanoconstrucciones derivadas del autoensamble de proteínas que constituyen las cápsides virales. Las VLPs no contienen material genético, en consecuencia, guardan gran similitud estructural con los virus y conservan sus propiedades de reconocimiento sin ser infecciosas. Por esto, las VLPs pueden ser utilizadas como andamiajes básicos de enzimas para el diseño y fabricación de materiales nanoestructurados con múltiples finalidades. Estas cápsides virales son atractivas ya que son estructuras monodispersas en tamaño y composición, bajo condiciones particulares de pH y fuerza iónica, y además poseen áreas superficiales grandes con una amplia variedad de grupos funcionales expuestos, lo que permite el acoplamiento de múltiples ligantes, ya sea de la misma molécula o diferentes moléculas. Esta característica las hace estructuras polivalentes, con la capacidad de participar en interacciones colectivamente fuertes, aumentando la afinidad de unión con los sitios blanco.

El proceso de acoplamiento de enzimas en la superficie de estas partículas se puede efectuar tanto por modificaciones químicas como genéticas, y el nombre que reciben estos artefactos es el de nano-acarreadores de enzimas (Enzyme Nano-Carriers, ENC). El tipo de enzima acoplada depende de la funcionalidad que desee darse a estas nanomáquinas. Por ejemplo, las lipasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces éster en triacilglicérols cuando se encuentran en un medio acuoso y son utilizadas principalmente en la industria alimentaria y de detergentes, por ejemplo, en la industria láctea, se utilizan lipasas de *Mucor meihei* (Piccnate, Gist-Brocades; Palatase M, Novo Nordisk), *A.niger* y *A.orizae* (Palatase A, Novo Nodisk, Lipase AP, Amano;

Flavour AGE, Chr. Hansen) entre muchas otras para la fabricación de quesos (Hasan *et al.*, 2006). El uso de estas enzimas se ha extendido también en la industria farmacéutica para la síntesis de algunos fármacos, tales es el caso de la lipasa de *Candida rugosa* utilizada en la fabricación de la lovastatina, medicamento que reduce los niveles de colesterol en la sangre (Hasan *et al.*, 2006). Dichas aplicaciones podrían ampliarse a la nanomedicina en la terapia de remplazo enzimático.

Una ventaja del sistema de ENC basado en VLPs es que es totalmente biocompatible debido a su naturaleza proteica. Esto implica que, en contraste con otros materiales de inmovilización de enzimas, éstos pueden ser introducidos en individuos, con la finalidad de llegar a células u órganos sin que sean degradados en el camino. Como consecuencia, estos ENC podría funcionar como un sistema de entrega eficiente y acarrear actividades enzimáticas y otras moléculas terapéuticas a sitios de un organismo donde estas sean necesarias. Para el caso de las lipasas, estas no solo se usan con fines nutrimentales, sino que participan en la síntesis y degradación de materiales en las células, con la finalidad de mantener el equilibrio. Uno de los productos que pueden acumularse en las células son lípidos y ésteres de colesterol. Estas moléculas se acumulan en los lisosomas cuando existe deficiencia de la lipasa que los degrada de manera natural y provocan una enfermedad que puede ser severa e incluso mortal. (Goldstein *et al.*, 1975; Menéndez *et al.*, 2002; Reiner *et al.*, 2014)

En nuestro grupo contamos con dos quimeras de la proteína VP2 de parvovirus B19 fusionadas con la lipasa *Bacillus pumilus* (BpIA), una en la que la BpIA se encuentra en el extremo N-terminal de la VP2, y otra en la que la lipasa se encuentra insertada en un asa superficial de la VP2. Estudios previos demostraron que dichas quimeras forman VLPs y retienen su actividad hidrolítica frente a ésteres de 4-nitrofenol. En este trabajo nos propusimos explorar las propiedades biocatalíticas de estas quimeras. Primero evaluando la estabilidad de las VLPs en medios no convencionales (disolventes orgánicos y líquidos iónicos) y posteriormente su potencial hidrolítico en condiciones celulares y lisosomales, usando un éster de colesterol de cadena corta como sustrato.

Capítulo 1. ANTECEDENTES

*“El gran siguiente paso de la humanidad es tan pequeño, que, a simple vista,
ningún humano sería capaz de verlo...”*

DREXLER ERICK.

1.1. Bionanotecnología; en la frontera del conocimiento.

El vertiginoso avance de la ciencia y la tecnología ha permitido al hombre el desarrollo de maquinarias cada vez más sofisticadas y eficientes, como las halladas en todas las células vivas: proteínas, lípidos, moléculas de RNA y de DNA, etc. Estos descubrimientos llevaron a la idea de la utilización de dichas “maquinas moleculares” como puntos de partida para nuevos diseños y otras construcciones basadas en biomoléculas, aprovechando así capacidades intrínsecas a ellas, como el plegamiento y el autoensablado molecular, el cual es un proceso de asociación espontánea de moléculas que se debe a la acción cooperativa de distintas fuerzas, como son: electrostáticas, de Vander Waals y de depleción.

Así, emergen dos nuevas ramas del saber; Nanobiotecnología y Bionanotecnología, cuya principal diferencia radica en la manera en la que estas disciplinas abordan su objeto de estudio, por un lado, la Bionanotecnología, utiliza las maquinarias moleculares como bloques de construcción con fines nanotecnológicos, mientras que para la Nanobiotecnología éstas sirven como inspiración para el desarrollo y aplicación de herramientas nanotecnológicas, con la finalidad de abordar fenómenos biológicos (Fig 1). Lo anterior demuestra el alto grado de interdisciplinariedad de estas ciencias emergentes, ya que en ellas convergen diversos enfoques científicos en los que participan la Biología, la Química, la Física y la Ingeniería. (Nagamune T, 2017; Roco MC, 2003a, Roco MC, 2003b)

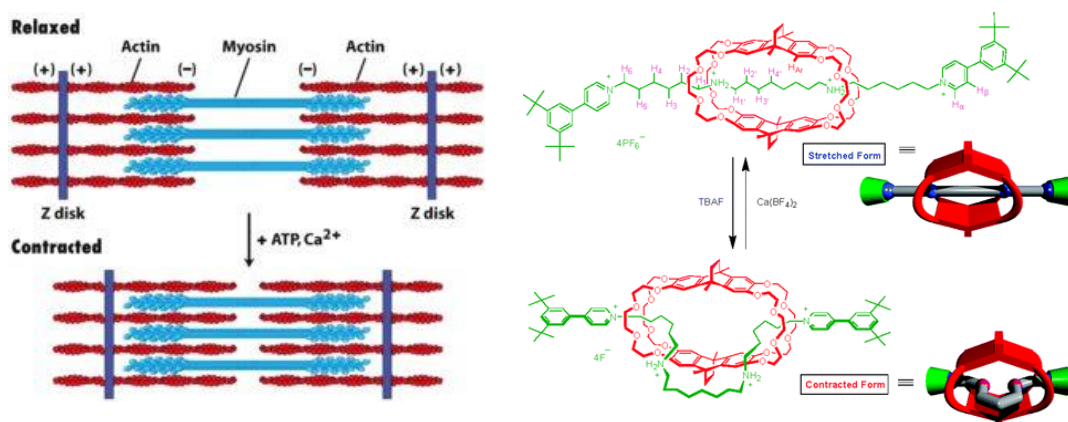


Figura 1. a) Movimiento de la miosina a través de los filamentos de actina, inducido por Ca²⁺ y ATP. b) Imitación del movimiento muscular usando Rotaxano basado en una jaula molecular.

Tomada de (Chun-Ju. et al., 2009).

La Bionanotecnología también llamada Ingeniería Biomolecular, surge como la fusión interdisciplinaria de la Biotecnología y la Nanotecnología. Por un lado, la Nanotecnología¹ se encarga de la creación y utilización de materiales, dispositivos o sistemas a través del control de la materia en escala nanométrica (en el orden de 10^{-9} m, Fig. 2), hablamos de la manipulación a nivel atómico, molecular y de estructuras supramoleculares basándose principalmente en las técnicas de “bottom-up²” y “top-down³”.

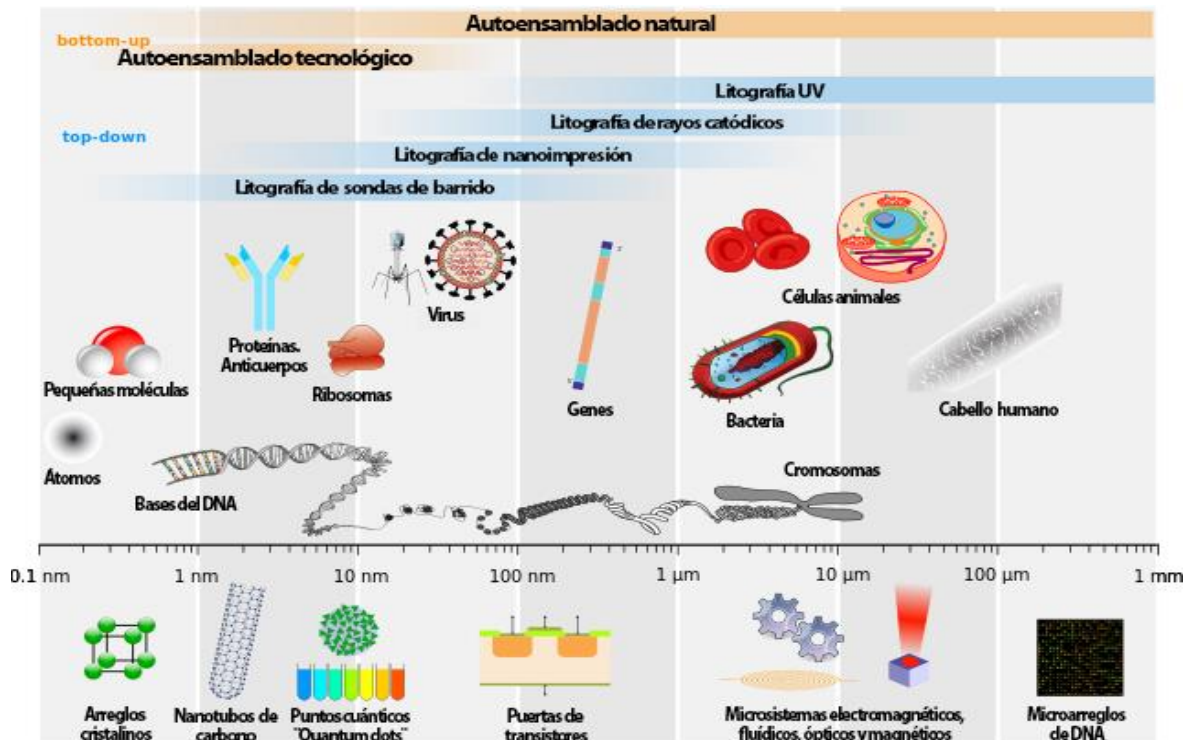


Figura 2. Escala nanométrica y ejemplos. (Paumier G, 2008),

Por otra parte, la Biotecnología consiste en la utilización de la maquinaria biológica de un organismo y los derivados de dichos procesos para la creación o modificación materiales específicos sin importar los detalles moleculares y atómicos de las biomoléculas que llevan a

¹ Del griego *Nānos*= ‘*enano*’, pero se ha tomado para significar “una mil millonésima parte” de algo.

² “Bottom-up” o de abajo hacia arriba; aquí se parte de una estructura nanométrica (átomos y moléculas) y mediante un proceso de montaje se crea una estructura mayor a la inicial. Este proceso también es conocido como auto ensamblaje y es el que muchos consideran como el “verdadero” enfoque nanotecnológico.

³ “Top-down” o de arriba hacia abajo; reducción de tamaño, las estructuras se miniaturizan a escala nanométrica

cabo dichos procesos. Al ser la conjunción entre ambas ciencias, es posible definir a la Bionanotecnología como la ingeniería aplicada al diseño, fabricación y modificación a niveles nanométricos (1-100 nm) de materiales, dispositivos y maquinarias moleculares basados en biomoléculas para que lleven a cabo funciones específicas (Fig. 3).

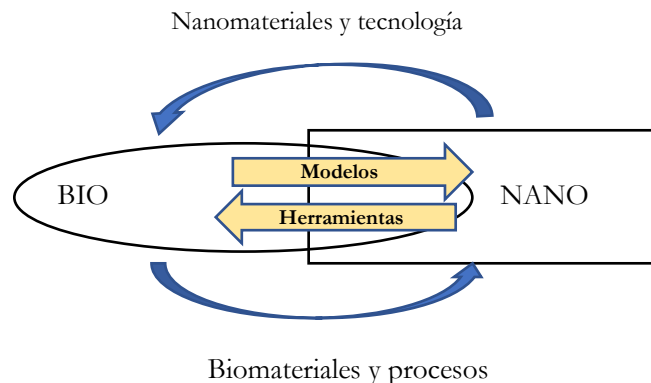


Figura 3. Diagrama que resume la interacción entre las áreas biológicas y la nanotecnología. Modificado (Roco, 2003).

Esta ciencia emergente ofrece soluciones a problemáticas planteadas en diversos campos, basando sus investigaciones, primordialmente en tres grandes áreas: alimentos, energía y salud. Para esta última, el desarrollo ha sido particularmente relevante. Se han generado herramientas novedosas para el diagnóstico (biomarcadores y biosensores) y el tratamiento de enfermedades con el desarrollo y diseño de nuevos sistemas de entrega de fármacos sitio específicos, o la entrega de hormonas y enzimas en la terapia de remplazo enzimático, además de los tratamientos que implican terapia génica (Nagamune T, 2017)

En la industria alimentaria existen avances que van, desde la producción de los alimentos (modificación genética, pesticidas, fertilizantes), tratamiento de desechos agropecuarios (Rajendran, *et al.*, 2007), hasta su transformación en alimentos procesados, extendiendo su tiempo de vida y añadiendo componentes alimentarios.

Y finalmente, en el campo energético existen proyectos que prometen mejoras en la producción, manejo y eficiencia de la energía y todas sus fuentes. El desarrollo de bionanocatalizadores es un ejemplo de esto, los cuales modifican y mejoran las reacciones químicas de los combustibles, para que, en la mayoría de los casos, disminuyan las emisiones de gases de efecto invernadero, o bien, sean transformadas en otras sustancias.

La Bionanotecnología se encuentra en la frontera e interdisciplinariedad del conocimiento, mientras algunas de sus aplicaciones ya están siendo explotadas a nivel médico e industrial, otras, como la tecnología de biomotores, lo estarán en un futuro. No obstante, el desarrollo de esta nueva disciplina podría impactar no solo en aspectos científicos, sino ofrecer cambios sustanciales en materia económica y social.

1.1.1. Nanomedicina

Como se ya se mencionó, entre las muchas aplicaciones de la Ingeniería Biomolecular se encuentra su particular interés por el área de la salud, debido a que todos los procesos fisiológicos y patológicos a nivel celular, ocurren a nanoescala y son dirigidos por complejos biomoleculares. De tal suerte, surge la Nanomedicina (Fig. 4), como una aplicación de la Bionanotecnología, ya se considera como el refinamiento de la medicina a nivel molecular, que, además, integra avances en genómica y proteómica.

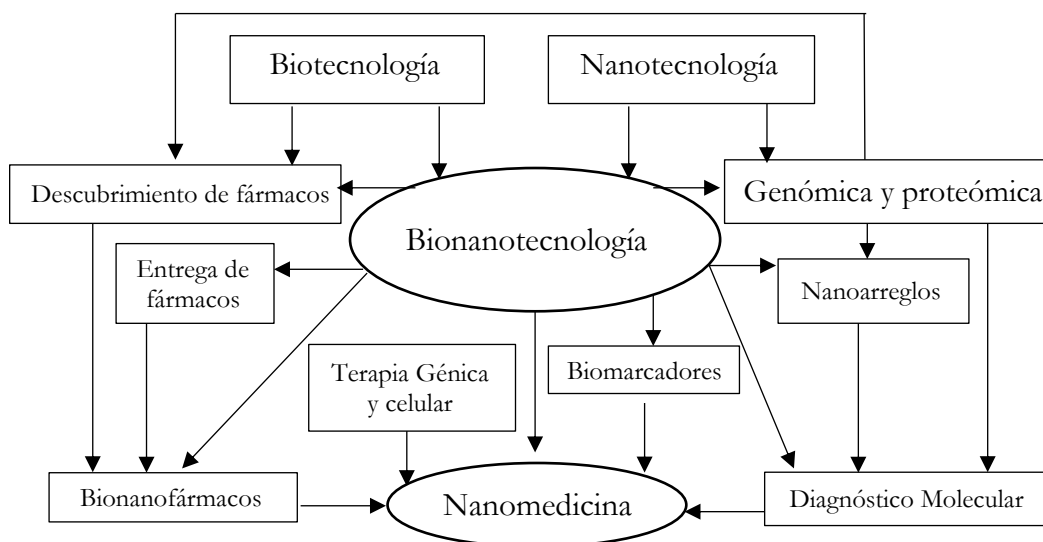


Figura 4. Esquema que ejemplifica la relación entre la Bionanotecnología con la Nanomedicina y otras Biotecnologías. Modificado (Jain K.K., 2008)

Muchos de los aportes tecnológicos de la Nanomedicina ya están siendo aplicados o se encuentran en estudios clínicos (Tabla 1), tal es el caso del Nanodiagnóstico, la Nanorrobótica y la Cirugía reconstructiva (Nano ingeniería de tejidos). Sin embargo, el trabajo futuro se encamina al desarrollo de nanofármacos de liberación controlada y con alta especificidad al tejido o grupo celular dañado, así como la aplicación de terapias a nivel celular y molecular a través de nanopartículas, tanto para la reconstrucción de tejidos, como para el tratamiento de enfermedades que, por su naturaleza, afectan a distintos grupos celulares (Caster, et al., 2017; Petros, et al., 2010).

Tabla 1. Aplicaciones de la Nanomedicina (Caster *et al.*, 2017).

| Nanodiagnóstico | Nanofármacos | Nanocirugía y Cirugía reconstructiva |
|---|--|---|
| -Nanobiosensores | - Entrega de fármacos sitio específica | -Cirugía con nanoláser |
| -Diagnóstico molecular | -Fármacos basados en nanotecnología | -Ingeniería de tejidos con andamios nanotecnológicos |
| -Imagen con nanopartículas con materiales de contraste. | -Suministro de medicamentos a partir de nanobombas implantadas y nanorecubrimientos. | -Implantación de tejidos y órganos artificiales resistentes al rechazo. |

1.1.2. Errores Innatos del Metabolismo

Existen más de 800 enfermedades asociadas a la disfuncionalidad de una o más proteínas, estas enfermedades son ocasionadas en su mayoría por errores monogénicos, de herencia autosómica recesiva y se les conoce como errores innatos del metabolismo (EIM), en dónde la alteración de un gen, produce a una proteína defectuosa lo que conduce a alteraciones bioquímicas en las rutas metabólicas relacionadas a ésta, ocasionando un fenotipo desadaptativo para el individuo con dicho defecto (Cabello *et al.*,2015). Los EIM son poco frecuentes⁴, sin embargo, su diagnóstico y tratamiento suele ser muy complicado. Las enzimas son las responsables de la mayor parte de los procesos metabólicos de las células y de los

⁴ 1 de cada 1000 niño(a)s, nacen con un EIM y el 50% de ellos desarrollan la enfermedad en la etapa neonatal.

organismos, por lo que, cualquier defecto en un gen, producido por cualquier circunstancia, provocará que la enzima para la cual codifica pierda su actividad o que ésta se vea alterada. Si la actividad biológica de dicha enzima se ubica en un solo órgano o tejido, entonces tendremos un defecto localizado, pero si la enzima en cuestión está involucrada en el metabolismo de todas o gran parte de las células del organismo, entonces, el problema será generalizado. El bloqueo parcial o total de una ruta metabólica conlleva la interrupción del funcionamiento celular y orgánico, debido a: a) la acumulación de sustratos no catabolizados, b) un déficit en la producción de energía y de intermediarios que se dirigen a otras vías metabólicas, c) la pérdida de la función en algún receptor o transportador, y d) el depósito intracelular de productos, lo que ocasiona síntomas clínicos de las diversas entidades patológicas (Menéndez, *et al.*, 2002).

Los EIM, como ya se mencionó, se dan por la producción de una proteína defectuosa, la cual puede ser estructural, una enzima, un anticuerpo, un transportador o una hormona. El grado de afección de las enfermedades asociadas a estos errores depende de la toxicidad de los metabolitos acumulados, el lugar en donde se depositen los productos deficitarios y la función de éstos en el organismo. La clasificación de los EIM puede efectuarse en función del sistema enzimático o vía metabólica afectada, de la que surgen 7 familias:

- | | |
|--|--|
| 1. EIM de los Carbohidratos | 5. EIM de los Lípidos |
| 2. EIM de los aminoácidos y proteínas | 6. Defectos de transporte |
| 3. EIM defectos de ciclos específicos | 7. Otras enfermedades metabólicas hereditarias. |
| 4. EIM de moléculas complejas | |

En el siguiente apartado profundizaremos en los errores innatos del metabolismo de lípidos, principalmente en las enfermedades lisosomales, así como en las ventajas y desventajas del tratamiento utilizado para éstas.

1.1.3. Enfermedades lisosomales y la Terapia de Reemplazo Enzimático.

Las enfermedades de depósito lisosomal (LSDs) resultan de la deficiencia de enzimas intralisosomales, las cuales se encargan de la hidrólisis ácida de macromoléculas dentro del espacio lisosomal, pero también puede tratarse de una proteína activadora o transportadora (Pisoni, et al., 1994; Sainz C, 2002), todo esto produce la acumulación de sustratos, generalmente de naturaleza lipídica, en diferentes tejidos, por lo que estas anomalías se vuelven multisistémicas, crónicas y progresivas. Cerca de 50 trastornos dentro de los EIM son debidos a defectos en una proteína lisosomal (Vellodi, 2005). Las enfermedades debidas a estos defectos son clasificadas de acuerdo con la macromolécula que no se logra metabolizar y la función lisosomal que se ve afectada (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación general de Enfermedades de Deposito Lisosomal (LSDs) de acuerdo a la macromolécula que no se logra metabolizar. Modificado de Rua M, 2014

| Clasificación de LSDs | | | |
|--|-----------------------|---|-------------------------------------|
| Lipidosis y Esfingolipidosis (almacenamiento de lípidos) | | Enfermedad de Von Gierke | Glucosa-6P |
| Niemann Pick tipo A y B | Esfingomielinea | Mucopolisacaridosis (MPS) (acumulación de mucopolisacáridos o glucosaminoglicanos GAGs) | |
| Gaucher | Glucocerebrósidos | Tipo I o síndrome de Hurler | Heparán y Dermantán sulfato |
| Fabry | Glucoesfingolípidos | Tipo II o síndrome de Hunter | |
| Gangliosidosis | Gangliósido GM1 | Tipo III o Sanfilippo | Heparán sulfato |
| Feber | Ceramida | Tipo IV o síndrome de Morquio | Quetarán y Condroitín sulfato |
| Krabbé | Galactocerebrósido | | |
| Enfermedad de Wolman | Esteres de colesterol | Tipo VI o síndrome de Maroteaux-Lamy | Dermantán sulfato |
| Glucogenosis | | Tipo VII o síndrome de Sly | Quetarán sulfato |
| Enfermedad de McArdle | Glucógeno | Mucopolisacaridosis (ML) (acumulación de lípidos y carbohidratos complejos.) | |
| Enfermedad de Pompe | | Deficiencia de Sulfatasa múltiple | Sulfatos esteroideos y gangliosidos |

Continua Tabla 2

| | | |
|--------------------------------------|---------------------------------|---|
| Continua Mucopolisidosis (ML) | | Defectos en el transporte de colesterol |
| Tipo II o Leroy | Oligosacáridos y lípidos | Niemann Pick tipo C y D |
| Tipo III o síndrome de Pseudo Hurler | | |
| Oligosacaridosis o Glucoproteínosis | | Ceroidlipofuscinosis Neuronal |
| Sialidosis | Sialoglicósacáridos | Defectos lisosomales por alteración en una proteína de transporte |
| α y β Manosidosis | Glicoproteínas | |
| β -galactosidosis | | Acumulación de Ácido siálico |
| Fucosidosis | Fucosa | Cistinosis |
| Galactosialidosis | Oligosacáridos y Glicoproteínas | Enfermedad de Salla |

Del cuadro anterior es importante señalar que las enfermedades pertenecientes al mismo grupo de macromoléculas acumuladas y que además se relacionan con el mismo sustrato sin metabolizar, se diferencian entre ellas debido a la enzima que lleva a cabo dicha hidrólisis, por ejemplo, en las MPS I, II, en donde las moléculas acumuladas son el Heparán y Dermantán sulfato, las hidrolasas deficientes son distintas; Alfa-L-Ioduronidasa para MPS I y Ioduronato-L-sulfatasa para MPS II.

1.1.3.1 Deficiencia de Lipasa Ácida Lisosomal

La deficiencia de la lipasa ácida lisosomal (LAL-D), es caracterizada por la acumulación progresiva de ésteres de colesterol y triglicéridos en el hígado, el bazo y el sistema cardiovascular. Esto se debe a que la lipasa ácida lisosomal se encarga de la hidrólisis de dichos lípidos dentro de las partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en colesterol y ácido grasos libres.

Este defecto es producido por mutaciones en el gen LIPA el cual codifica a LAL (Reiner et al., 2014), es de carácter autosómico recesivo y el grado de progresión en los trastornos relacionados depende principalmente de la naturaleza de dicha mutación, lo que resulta en el grado de actividad residual dicha enzima. El papel que desempeñan los lípidos producto de la

hidrólisis efectuada por LAL (colesterol y ácidos grasos libres) resulta crucial en el metabolismo de lípidos, ya que estos o sus derivados oxidados, interactúan con factores de transcripción que regulan la expresión de genes de proteínas involucradas en la lipogénesis.

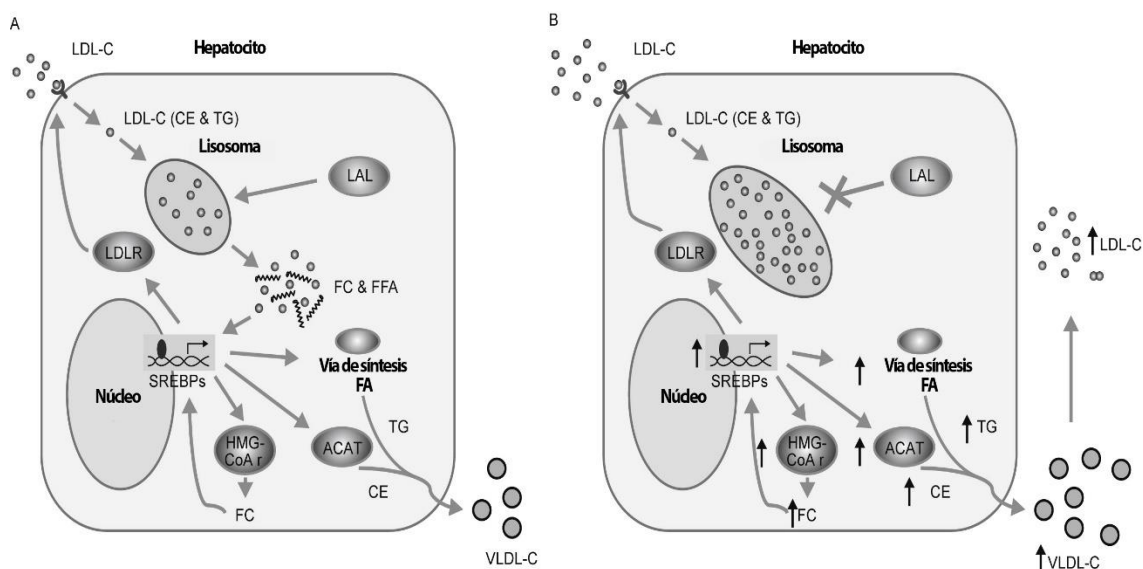


Figura 5. Esquema de la homeostasis celular del colesterol. **a)** Célula hepática sana, **b)** célula hepática con deficiencia de LAL. **ACAT**, acil-colesterol aciltransferasa; **CE**, ésteres de colesterol; **FA**, ácido graso; **FC**, colesterol libre; **FFA**, ácido graso libre; **HMG-CoAr**, hidroximetilglutaril-Coenzima A reductasa; **LAL**, lipasa ácida lisosomal; **LDL-C**, lipoproteínas de baja densidad; **LDLR**, receptor de lipoproteínas de baja densidad; **SREBPs**, proteínas de unión al elemento regulador de esterol; **TG**, triglicéridos; **VLDL-C**, lipoproteínas de muy baja densidad.

Modificada de (Reiner, *et al.*, 2014)

Cuando la LAL trabaja adecuadamente (Fig.5b), la liberación de colesterol conduce a una regulación negativa de los receptores de LDL, lo que provoca que disminuya la entrada de ésteres de colesterol a la célula, además de disminuir la síntesis de colesterol y la estimulación de la acil-colesterol aciltransferasa, que esterifica al colesterol libre para formar partículas de VLDL-C que saldrán de la célula. Así mismo, el aumento de ácidos grasos libres dentro de la célula inhibe la producción de fosfolípidos y triglicéridos, debido a la disminución de la síntesis de ácidos grasos mediada por proteínas de unión al elemento regulador de esterol (SREBPs) (Horton, 2002).

Dentro de las enfermedades asociadas a este defecto se encuentra la enfermedad de Wolman (LAL-D de inicio temprano), la cual se presenta en niños recién nacidos que mueren entre los 6 y 12 meses, al presentar un fallo multiorgánico, con cuadros de fibrosis y cirrosis hepática, hepatoesplenomegalia⁵ prominente, acumulación excesiva de lípidos en la mucosa intestinal, ganglios linfáticos y musculo esquelético. También encontramos la enfermedad de depósito de ésteres de colesterol o EDEC (LAL-D de inicio tardío), la cual afecta a niños y adultos y tiene un horizonte clínico más viable que el de los recién nacidos.

El tratamiento clásico de la LAL-D ha consistido principalmente en el uso de medidas de soporte que reducen las complicaciones de la enfermedad, también se ha implementado el tratamiento hipolipidimiente en el que se incluye una dieta baja en grasas y fármacos que disminuyen la cantidad de lípidos en sangre. Sin embargo, ningún tratamiento logra evitar el avance ya que no abordan la fisiopatología de la enfermedad (Scott, *et al.*, 2013).

En 2015, agencias reguladoras europeas y la FDA de los Estados Unidos de América aprobaron el uso de una LAL recombinante humana (Sebelipasa alfa KANUMA®), para el tratamiento de la LAL-D, mediante la sustitución enzimática a largo plazo en pacientes de todas las edades. Si bien los datos clínicos han mostrado un aumento en la supervivencia en los neonatos que padecen la enfermedad de Wolman, no todos los pacientes han logrado beneficiarse por igual y de manera sostenida. Además, hasta ahora no se conoce un factor predictor de respuesta al tratamiento en pacientes de más edad que ya presentan daño hepático y cardiovascular.

1.1.3.2 Terapia de remplazo enzimático (ERT)

La terapia de remplazo enzimático o ERT por sus siglas en inglés (*Enzyme Replacement Therapy*) constituye una de las opciones más viables para el tratamiento de muchas enfermedades ocasionadas por los EIM. Ésta se basa en administrar de manera periódica al

⁵ La Hepatoesplenomegalia es el recrecimiento conjunto del hígado y del bazo. Si dicha inflamación solo afecta al hígado se le conoce como Hepatomegalia.

paciente una proteína exógena, mediante vía intravenosa o intratecal⁶ (dependiendo el sitio al que se dirige la enzima, es la forma de administración), la cual una vez dispuesta tendrá que llegar a las células diana, en donde deberá ser reconocida y dirigida a los lisosomas. Allí, actuará sustituyendo a la enzima en déficit hidrolizando su sustrato.

La mayoría de las proteínas lisosomales poseen cadenas de N-acetilglucosamina unidas a manosa, la cual es reconocida por receptores de manosa-6-fosfato ubicados en el exterior de la membrana celular, lo que provoca que la enzima glicosilada sea endocitada (Fig. 6). En consecuencia, la adecuada glicosilación de la enzima exógena es necesaria para que las enzimas logren entrar a las células diana. Sin embargo, esto no garantiza de facto que la enzima llegue a su destino, ya que en algunos casos las células diana son neuronas, osteoblastos u osteocitos (Mucopolisacaridosis MPS-III, MPS-VII, Gaucher-II, entre otras)

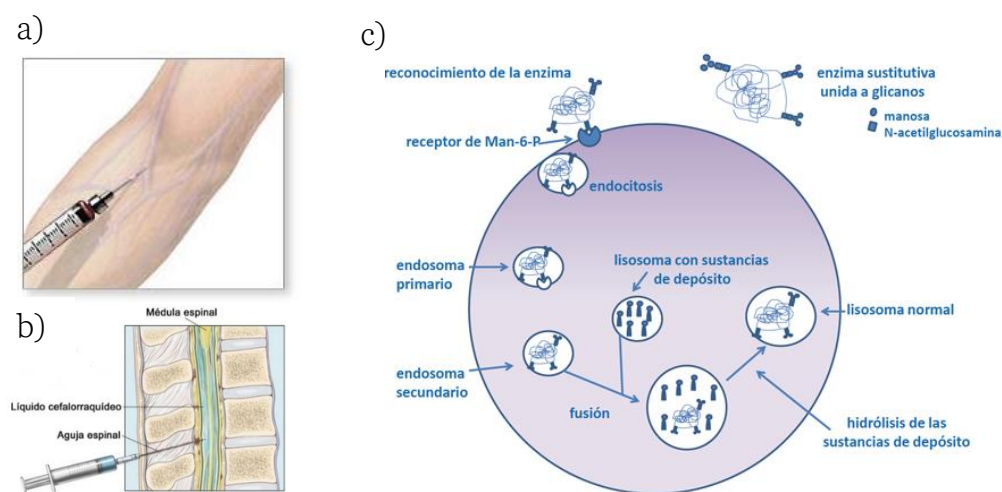


Figura 6. a) Administración de TRE vía intravenosa. b) Vía intratecal. c) Esquema que ejemplifica el mecanismo de reconocimiento y entrada a la célula por la enzima exógena recombinante.

Así mismo, desde 2001 se ha trabajado en protocolos para reemplazar o suplementar genes, mediante terapia génica, sin embargo, su empleo se ha restringido (Scollay, 2011; Wilson, et al., 2001), debido a que los pacientes sometidos a esta terapia han demostrado que aún es

⁶ Se efectúa una punción lumbar, para que la proteína exógena viaje a través del líquido cefalorraquídeo para así superar la barrera hematoencefálica, lo cual es necesario para el tratamiento de enfermedades con afectación cerebral, tales la enfermedad de Gaucher tipo II y algunas Mucopolisacaridosis (MPS).

necesario continuar el desarrollo de sistemas más eficientes para la entrega de los genes exógenos, así como la regulación en la expresión génica de dichos genes en las células transfectadas.

La búsqueda de vehículos biocompatibles y multifuncionales, que aumenten la eficiencia y la especificidad de la terapia génica, de remplazo enzimático, o ambas, para aumentar el espectro de enfermedades que se puedan combatir, sigue siendo uno de los puntos medulares para el tratamiento de enfermedades lisosomales, y en general para las enfermedades causadas por los Errores Innatos del Metabolismo.

1.2. Partículas tipo virus; nanoacarreadores de enzimas y sistemas de liberación de moléculas terapéuticas, una opción biocompatible.

Como ya se ha mencionado, la entrega dirigida ha sido una de las áreas más desafiantes de la nanomedicina, pero también una de las más prometedoras. De ésta depende el tratamiento de enfermedades que carecen de protocolos adecuados, especialmente el cáncer y las que son ocasionadas por trastornos genéticos como los EIM. De acuerdo con la OMS, el cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, en 2016 se calcula que provocó alrededor de 8.8 millones de defunciones (OMS, 2018). En México, 14 de cada 100 fallecimientos ocurren por esta enfermedad (Secretaría de Salud, segob.mx, 2018).

Los virus son entidades biológicas a escala nanométrica conformadas por subunidades protéicas altamente ordenadas, las cuales se ensamblan de manera espontánea⁷ formando así la cápside viral que, además de proteger y transportar el genoma del virus, se encarga del reconocimiento de la célula huésped. Sin embargo, la patogenicidad de éstos limita su uso como herramientas tecnológicas. En contraste, las partículas tipo virus o VLPs (por sus siglas en inglés "*Virus-like particles*") constituidas fundamentalmente por una o varias de las proteínas que forman la cápside, son capaces de autoensamblarse (*in vitro*) en una morfología que imita al virión nativo. Esto permite conservar la mayor parte de los atributos del virus, como su estabilidad, biocompatibilidad y especificidad, pero sin el material genético viral, eliminado así

⁷ Recordando aquí, la estrategia nanotecnológica "Bottom-up".

la patogenicidad de estas partículas. Por otro lado, la posibilidad de funcionalizar la arquitectura de estas jaulas protéicas (Fig. 7) permite posicionarlas entre las mejores plataformas biocompatibles que, en gran medida, revolucionarán la entrega de moléculas para diversas aplicaciones en nanotecnología, bionanotecnología y nanomedicina (Ding, 2018).

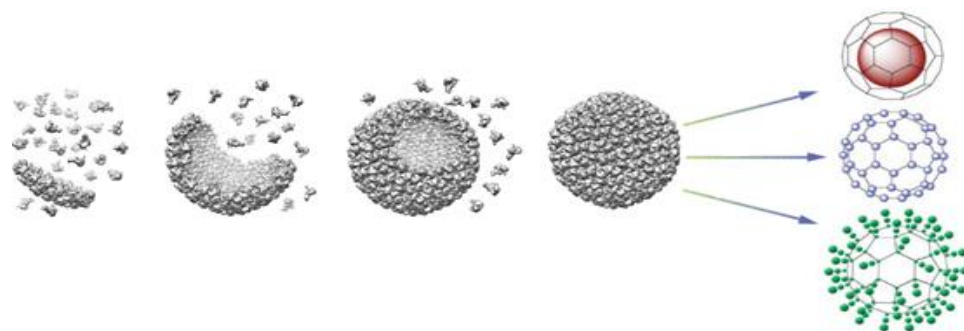


Figura 7. Caricatura de autoensamble de una VLP y su versatilidad, modificando química o genéticamente el exterior, la interfase o encapsulando moléculas. Modificada (Duglas T., 2006).

El uso de las VLPs ha evolucionado desde la simple presentación de epítopos antigénicos nativos en la superficie hasta las actuales VLPs quiméricas de tercera generación, en las que se busca fabricar nano dispositivos inteligentes, robustos y multifuncionales que sirvan como vehículos en la entrega dirigida de moléculas terapéuticas, vacunas o sistemas catalíticos entre otras posibles aplicaciones (Fig. 8).

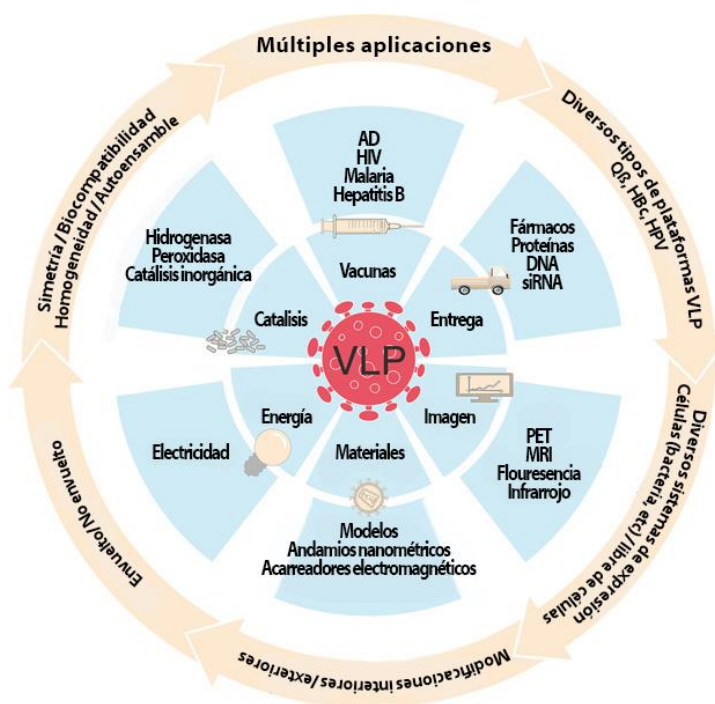


Figura 8. Aplicaciones de las VLPs (Ding., 2018)

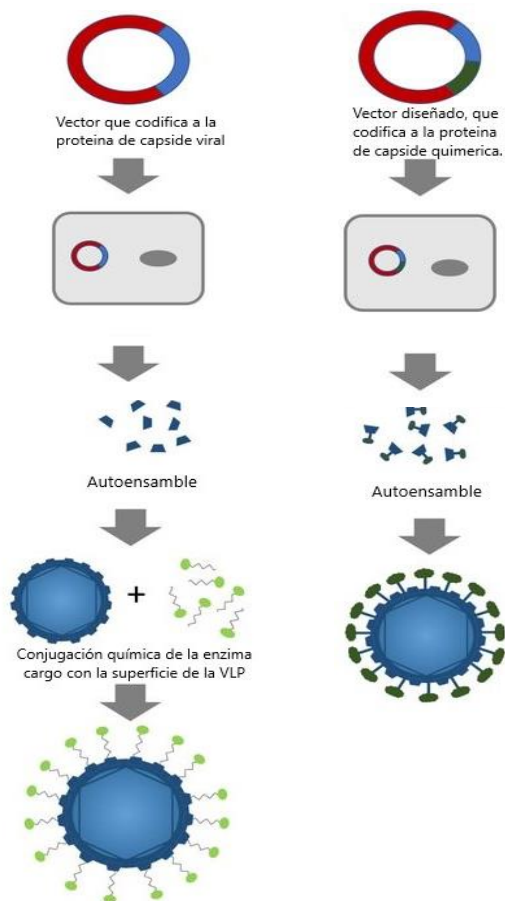


Figura 9. Esquema de la producción de VLPs utilizando a) conjugación química y b) Modificación genética. Modificado (Ong, 2017) .

Las VLPs poseen una superficie exterior e interior sumamente definida y organizada, lo cual proporciona un andamio que puede modificarse con precisión para incorporar diversos cargamentos. En este contexto, las modificaciones de las VLP pueden efectuarse en los grupos terminales internos o externos para que se produzca la funcionalización y puedan unirse una gran cantidad de moléculas. En particular, la funcionalización del exterior permite generar nanoacarreadores de enzimas o de otras proteínas (ENC, por sus siglas en inglés “*Ezyme nanocarrier*”), las cuales posibilitan que las VLPs se dirija a un tejido específico, que cambie su tropismo, así como efectuar una o varias reacciones específicas dentro de la célula diana (Smith, 2011). Dentro de las estrategias más utilizadas para efectuar esta funcionalización exterior se encuentran:

- a) **Conjugación química o Bioconjugación.** En esta técnica se aprovechan los aminoácidos nativos expuestos más reactivos, tales como: cisteína, lisina, aspartato o glutamato, cuya fácil ionización permite la formación de enlaces covalentes con los ligantes deseados, en caso de no disponer de alguno de estos residuos en la superficie, se han incorporado aminoácidos no naturales como la Azidohomoalanina (AHA), que mediante reacciones tipo “click” sobre su grupo azida logran el mismo objetivo que los residuos nativos (Kolb, *et al.*, 2001; Kiick, *et al.*, 2002). El proceso de conjugación ocurre una vez formadas las VLPs, lo cual resulta conveniente para la formación exitosa de este tipo de sistemas ya que permite que el autoensamblaje de las VLPs y el plegamiento de la enzima se realicen de forma independiente y, en ocasiones, simultáneamente .
- b) **Modificación genética,** en esta estrategia se fusiona el gen de la enzima que se desea exponer en la superficie al gen de la proteína de cubierta de la VLP. Debido a que la enzima

está fusionada, es posible que ésta no logre su correcto plegamiento o inhiba el ensamblaje de las VLPs, sin embargo, se ha demostrado que este enfoque es funcional (Comellas-Aragonés, et al., 2007; Rurup, 2014; Bustos-Jaimes, et al., 2017).

c) **Ingeniería de interacciones no covalentes** entre la proteína de la cápside y la enzima de carga. En el 2012 Cardinale y colaboradores realizaron una revisión en la que describen ejemplos del uso de VLPs como nanoacarreadores de enzimas. De entre ellos destaca la estrategia de acoplamiento con “coiled-coil” (hélices enrolladas) entre VLPs y enzimas, para lo cual, se emplean dominios de enrollamiento peptídico complementarios con carga positiva (K-coil) para la proteína de la cápside del CCMV y con carga negativa (E-coil) para la enzima EGFP, fusionados a cada una de las proteínas. Con esta misma estrategia en el 2016 Santillán-Uribe y colaboradores lograron unir VLPs de parvovirus B19 con estas interacciones.

d) **SpyTag-SpyCatcher** una vez ensambladas las VLPs, mediante la formación de un enlace isopeptídico espontáneo entre el SpyTag y el SpyCatcher fusionados a la enzima carga y a la proteína de cubierta, se logra obtener un sistema estable con VLPs como nanoacarreadores de enzimas (Cayetano, et al., 2018).

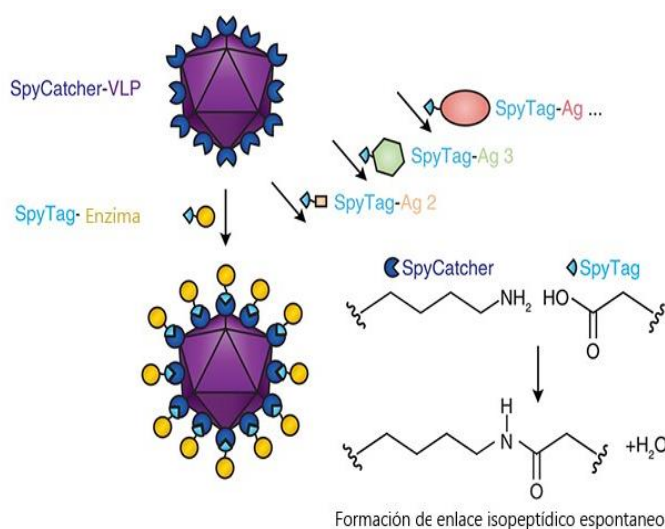


Figura 10. Estrategia de producción de VLPs funcionalizadas a través de SpyTag-SpyCatcher.

De esta forma, la combinación de la funcionalización de la superficie de las VLPs junto con la capacidad de encapsidar carga terapéutica, como DNA, siRNAs y fármacos, puede proporcionar un diseño complejo pero flexible necesario para abrir la puerta a nuevas terapias múltiples que logren cubrir necesidades médicas no satisfechas hasta ahora.

1.3 Antecedentes directos

Las VLPs más estudiadas son las basadas en virus de plantas (CCMV y CPMV), bacteriófagos (MS2, Q β y P22) y uno basado en el virus de la hepatitis B (HBVc) (Tabla 2). El HBVc se ha utilizado exitosamente para la señalización de genes y la liberación específica de fármacos, y al ser un virus que infecta únicamente hepatocitos humanos también ha funcionado para la señalización de células hepáticas cancerosas. El uso de VLPs basadas en virus que infectan a humanos es una herramienta altamente específica para la nanomedicina.

Tabla 3. Virus más utilizados para la fabricación de VLPs y sus características.

| VLP | Nombre del VIRUS | Tipo de Virus | Geometría y tamaño |
|----------------------------|---------------------------------------|---------------|-----------------------------|
| HBVc | Virus de Hepatitis B | Animal | T=4, icosaédrica de 28-30nm |
| CCMV | Virus del moteado clorótico del caupí | Planta | T=3, icosaédrica de ~28nm |
| CPMV | Virus del mosaico del caupí | Planta | T=3, icosaédrica de 28-31nm |
| MS2 | MS2 | Bacteriófago | T=3, icosaédrica de 28-31nm |
| Qβ | Q β | Bacteriófago | T=3, icosaédrica de 28-31nm |
| P22 | P22 | Bacteriófago | T=7, icosaédrica de 28-31nm |

1.2.1 VLPs de Parvovirus B19 como modelo de estudio para producción de nanoacarreadores de enzimas

Los parvovirus infectan a una gran cantidad de animales, entre los que sobresalen las aves y los mamíferos. En la búsqueda de virus con tropismo a células de humanos para la construcción de VLPs con fines biomédicos, nuestro equipo de trabajo ha encontrado en el Parvovirus Humano B19 (B19V), un modelo viable para la producción de éstas partículas. El B19V posee características prometedoras para el desarrollo de sistemas biocompatibles para la entrega sitio-específica de moléculas terapéuticas, tales como enzimas sustitutivas, segmentos de DNA para terapia génica, o fármacos de entrega dirigida, entre otras posibles aplicaciones.

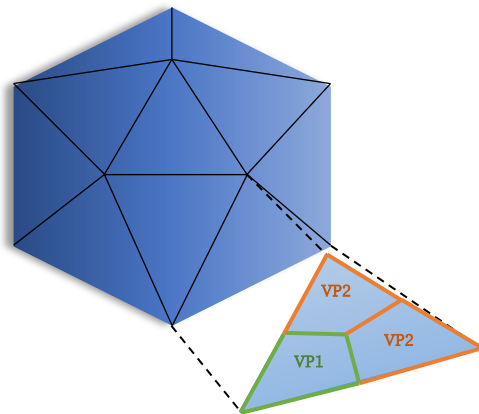


Figura 11. Caricatura de cápside del virus B19, indicando las proteínas estructurales VP1 y VP2.

El B19V pertenece a la familia Parvoviridae del género Erythrovirus. Dentro de sus características estructurales podemos resaltar que posee un tamaño pequeño de entre 22-26 nm y que su DNA es de cadena sencilla de apenas 5.5 Kb. Es un virus no envuelto, su cápside está constituida por 20 capsómeros conformados por dos proteínas estructurales (VP1 y VP2, de 83 y 53 KDa respectivamente). Dichas cápsides poseen forma icosaédrica con $T=1$ y ejes de simetría de orden 2, 3 y 5. Ambas proteínas se autoensamblan formando la cápside con 60 subunidades de proteína (veinte trímeros).

Sus proteínas estructurales son muy similares, VP2 forma el 95% de la cápside y difiere de VP1 en una región única de 221 residuos de aminoácidos en el extremo amino terminal, VP2 es idéntica a la región C-terminal de VP1 (Servant-Delmas, 2016).

Los Parvovirus se reproducen en células que se dividen rápidamente y están en replicación activa. En el caso del B19V, su tropismo es por las células precursoras de los eritrocitos, ya que se sabe que el acceso de este virus a las células se efectúa mediante el reconocimiento del antígeno eritrocítico P (globósido o globotetraosilceramida (Gb4Cer)) como receptor principal. Este receptor está presente principalmente en células endoteliales, megacariocitos, placenta, miocardio e hígado de humanos.

La importancia de las proteínas de la cápside del B19V en la infección de una célula eritroide fue revisada por Tu y colaboradores en el 2015, en donde describen que el papel de la proteína VP2 en el proceso de infección, es crucial, ya que esta es la que posee la capacidad de reconocer al receptor Gb4Cer para así, iniciar la internalización del virus con la formación de un endosoma dependiente de Clatrina. Si bien VP2 es la responsable del reconocimiento celular, VP1 y las secuencias de localización nuclear (NLS) presentes en VP1 y VP2 son sumamente importantes en el ciclo de vida del virus. VP1 es el responsable de la internalización del virus ya que se cree que la región N-terminal de VP1 cambia su ubicación del interior de la cápside al exterior de ésta después de un primer contacto entre el virus y el receptor Gb4Cer, lo que permite el reconocimiento de los receptores $\alpha 5$ y $\beta 1$ que disparan la señal de formación del endosoma primario (Fig. 12).

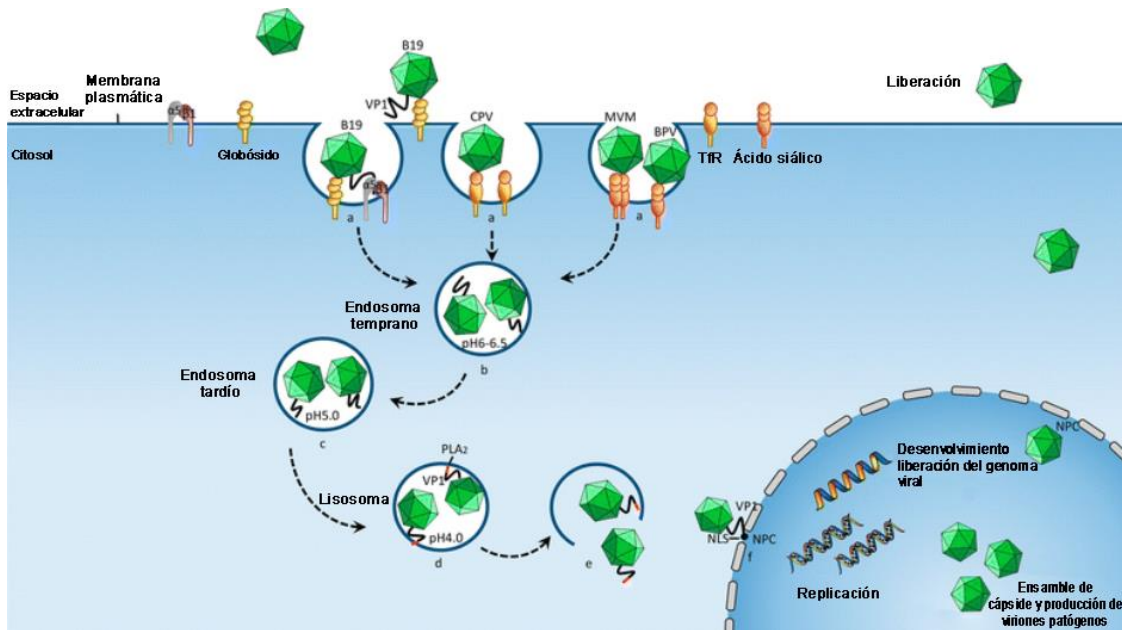


Figura 12. Representación del mecanismo de entrada de parvovirus a la célula, desde el reconocimiento de receptores de membrana hasta la liberación del material genético en el núcleo del huésped. Modificado de (Tu, *et al.*, 2015)

Conforme el pH va disminuyendo más y el endosoma llega a ser lisosoma (pH 4.0), se induce la actividad del dominio de fosfolipasa A₂ (PLA₂) que posee VP1 en los últimos 140 aa de su extremo N-terminal (región única VP1u), la cual destruye la membrana lisosomal liberando al virus en las cercanías del núcleo (Tu, *et al.*, 2015; Leisi R, *et al.*, 2013).

La producción de VLPs basadas en algún tipo de Parvovirus se ha efectuado ampliamente utilizando el sistema de expresión de baculovirus (Ju, 2011), ya que permite obtener partículas ensambladas. Sin embargo, en el caso del B19V, sus VLPs se han podido producir mediante la expresión de la proteína VP2 en células de *Escherichia coli*, con muy buenos rendimientos y homogeneidad después del ensamblaje “*in vitro*” (Sanchez-Rodriguez, 2012).

En 2004, Kaufmann y colaboradores lograron resolver la estructura del B19V a partir de VLPs formadas exclusivamente por la proteína VP2, la cual posee una estructura de barril-β antiparalelo de ocho hebras, las cuales se unen por medio de cuatro asas o loops, de los que resalta la región ubicada entre los residuos 300 y 314, la cual no tiene conformación espacial

definida por ser extremadamente móvil, siendo una región potencial para el diseño y modificación de la superficie de la cápside.

Las hebras β se hallan en una conformación de “jelly roll” y presentan las secuencias más conservadas entre los parvovirus (Fig. 13). Así mismo, se observó que estas VLPs se ensamblan adecuada y homogéneamente a pesar de estar constituidas exclusivamente por la proteína VP2, demostrando también que la proteína VP1 no está involucrada en el proceso de ensamblaje del virus. Además, estas partículas conservan la mayoría de sus propiedades fisicoquímicas y de reconocimiento.

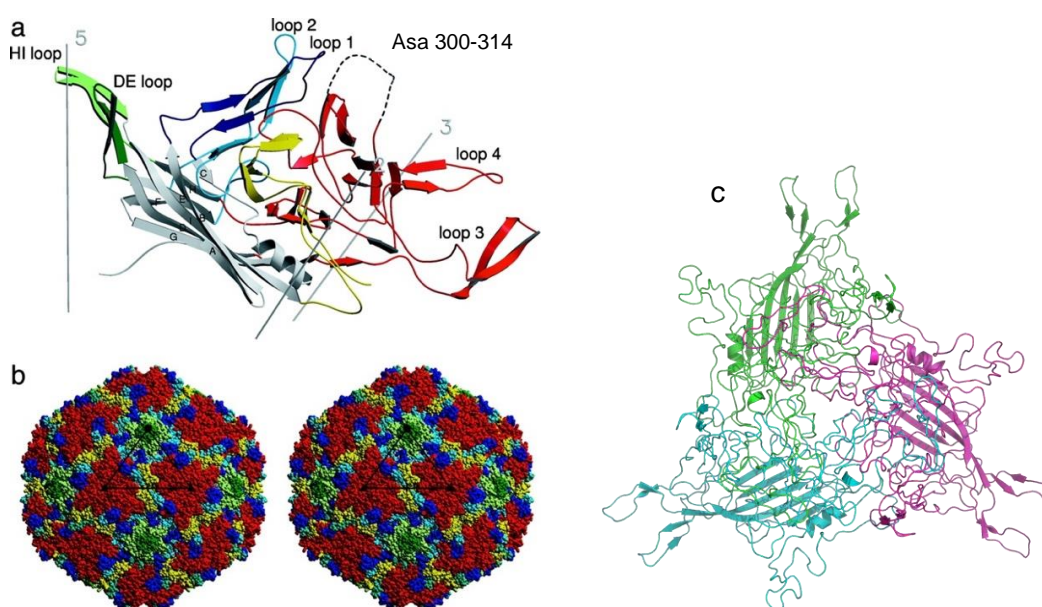


Figura 13. a) Estructura resuelta de parvovirus B19 formada por la proteína VP2. b) Imagen estereoscópica de la topología de la superficie de VLPs de B19V, en la que se muestran los ejes de orden 2 (●), 3 (▲) y 5 (◆) (Modificada de Kaufmann et al., 2004). c) Trímero de VP2, cada VLP está constituida por 20 trímeros (capsómeros) de VP2 (PDB 1S58).

Por todo lo anterior, el parvovirus B19 resulta un excelente modelo para estudios de bionanotecnología y biomedicina, ya que podría ser un vehículo para la entrega dirigida de fármacos o de enzimas terapéuticas, particularmente las asociadas a enfermedades lisosomales, ya que éste, como se describió con anterioridad, es estable dentro de los lisosomas. La capacidad de formar VLPs a partir de una sola proteína (VP2) y su potencial

capacidad de ingresar a las células sin destruir la membrana lisosomal (por ausencia de actividad fosfolipasa en VP1u) permitiría que las VLPs permanezcan dentro del lisosoma con hasta 60 copias⁸ de enzima terapéutica soportada en la superficie.

1.3.1 Proteínas Quiméricas VP2-BpIA

En los últimos años, en nuestro grupo de trabajo se han estudiado algunas modificaciones de la superficie de las VLPs del B19V; utilizando modificación genética, estrategia descrita en líneas anteriores, en regiones específicas de la secuencia de la proteína VP2. Una de las regiones más estudiadas es el asa superficial 300-314, la cual posee gran movilidad y queda expuesta en el eje de orden 3 (Fig. 13), lo que garantiza que las moléculas de carga fusionadas en esta región siempre queden en la superficie del nanoacarreador. Otra región de interés es el extremo N-terminal que, de acuerdo con estudios previos, puede quedar expuesto en la superficie de las VLPs a través del poro localizado en el eje de orden 5 (Gilbert *et al.*, 2005; Morán-García *et al.*, 2016). En estas regiones se han fusionado péptidos y enzimas de interés biomédico y catalítico, una de ellas es la lipasa A de *Bacillus pumilus* (BpIA), la cual será revisada en la siguiente sección.

Las proteínas quiméricas producidas en el grupo de investigación (con BpIA fusionada en el asa 300-314 o en el extremo N-terminal de VP2, Q1 y Q2 respectivamente), se han obtenido, al igual que las VLPs de VP2, por replegamiento y autoensamble "*in vitro*" a partir de proteína recombinante producida en *E. coli* como cuerpos de inclusión. Ambas quimeras mostraron ser capaces de formar VLPs, lo que evidenció que la fusión de la BpIA en estas dos regiones de la proteína VP2 no interfiere con el plegamiento de VP2 ni con su competencia de ensamble de VLPs. Durante el proceso de purificación en condiciones desnaturizantes, en estos trabajos se obtuvieron rendimientos de 42 mg/L para Q1 y 30 mg/L para Q2 (Soto-Roman, 2017; Segovia-Trinidad, 2018), mientras que los obtenidos para VP2 oscilan entre los 60-69mg/L (Sanchez-Rodriguez *et al.*, 2012; Bustos-Jaimes *et al.*, 2017). La diálisis para el autoensablado

⁸ Recordando que la cápside ésta constituida por 60 monómeros de proteína estructural y que a cada uno de ellos le podemos unir o fusionar una enzima terapéutica.

duró alrededor de 48 h para ambas quimeras, 12 h más que las necesarias para ensamblar partículas formadas solo por la proteína VP2.

Así mismo, comprobó que BplA en las quimeras conservaron su actividad lipolítica (Bustos-Jaimes et al., 2017). Dichos resultados sugieren que estas enzimas inmovilizadas en VLPs pueden ser acarreadas a sitios específicos para catalizar reacciones de interés biomédico e incluso podrían ser utilizadas con fines en biocatálisis industrial. Lo que nos lleva a explorar la estabilidad de estos sistemas en diversas condiciones (temperaturas, pH y medios no acuosos), así como la capacidad de la BplA en los acarreadores de efectuar reacciones con otros sustratos.

1.3.2 Lipasa A de *Bacillus pumilus* (BplA).

Las lipasas pertenecen a la familia de hidrolasas, denominadas triacilglicerol acilhidrolasas, ya que su reacción natural es la hidrólisis de triglicéridos generando como productos mono- y diglicéridos, ácidos grasos y glicerol (Fig. 14) (Jeager, 1998). Las lipasas son muy utilizadas en reacciones de síntesis orgánica debido a su versatilidad y capacidad para aceptar sustratos hidrofóbicos.

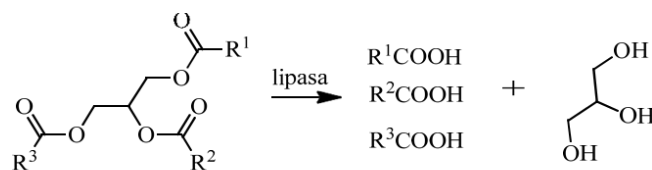


Figura 14. Esquema de la reacción de hidrólisis completa efectuada por las lipasas

La mayoría de los biocatalizadores desarrollan su actividad catalítica en medio acuoso, ya que su potencial catalítico está determinado por condiciones de pH, fuerza iónica, temperatura y medios compatibles con el crecimiento de organismos vivos. Sin embargo, en 1936 el bioquímico polaco Ernest Aleksander Sym, describió procesos en los que, las lipasas eran capaces de efectuar síntesis de ésteres sencillos en medio orgánico. Pero fue hasta 1989 que Klibanov y colaboradores, comprobaron los efectos del uso de solventes orgánicos en la estabilidad y selectividad de reacciones catalizadas por enzimas aisladas sobre diferentes

sustratos, encontrando que algunas lipasas pueden trabajar en solventes orgánicos siempre y cuando mantengan su esfera de solvatación (Klibanov *et al.*, 1995; Klibanov *et al.*, 2001). Por lo que la baja actividad acuosa (a_w) en la que pueden trabajar, produce reacciones de síntesis además de la hidrólisis esterés. En la Figura 15 se muestra un esquema de las diversas reacciones que pueden efectuar las lipasas cuando se encuentran frente a otros sustratos en medio orgánico.

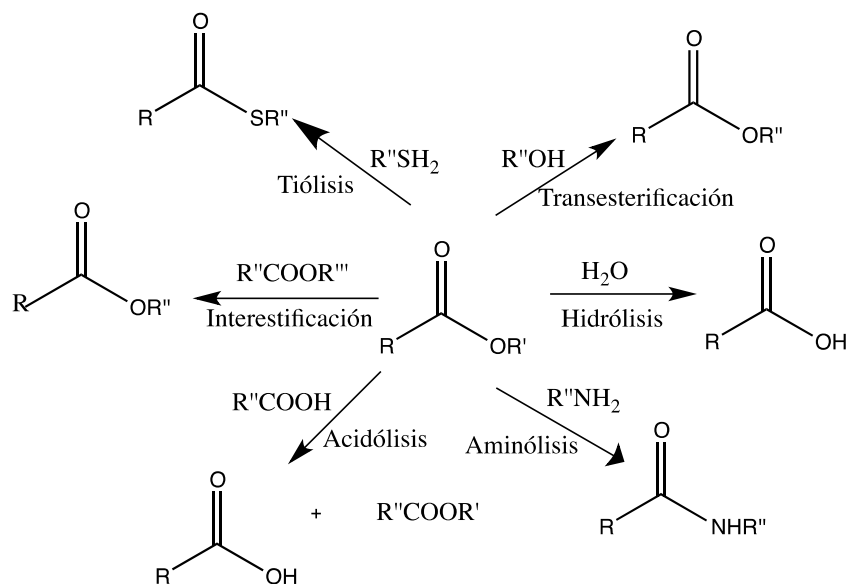


Figura 15. Reacciones catalizadas por lipasas en medio acuoso y no acuoso.

La lipasa A de *Bacillus pumilus* GMA1 (BplA) es homóloga a la lipasa A de *B. subtilis* (BslA), ambas, constituidas por 181 residuos de aminoácidos en sus formas maduras y un peso molecular de 19.5 KDa. Debido a que no se cuenta con la estructura cristalográfica de BplA, se generó un modelo por homología a partir de la estructura de BslA, ya que poseen un 80% de identidad en sus secuencias de aminoácidos (Alcántara, 2009). Dicho consiste en una estructura globular y el plegamiento α/β hidrolasa clásico de las lipasas, con la única diferencia de contar con 6 hebras- β paralelas en lugar de 8, flanqueadas por 5 hélices- α (Fig. 16). El sitio catalítico conservado, corresponde a la triada de residuos Ser77-Asp133-His156 expuestos al disolvente debido a que carece del dominio correspondiente a la tapa del sitio activo (Mora, 2008), el residuo de Serina está localizado en la zona C-terminal de la lámina β_5 , junto con un

pentapéptido GX SXG, altamente conservado, formando un motivo característico β -giro- α llamado codo nucleofílico (Fig. 16a).

La cavidad oxoaniónica está formada por los grupos amida de los residuos Ile12 y Met78 en posiciones similares a las encontradas en otras lipasas.

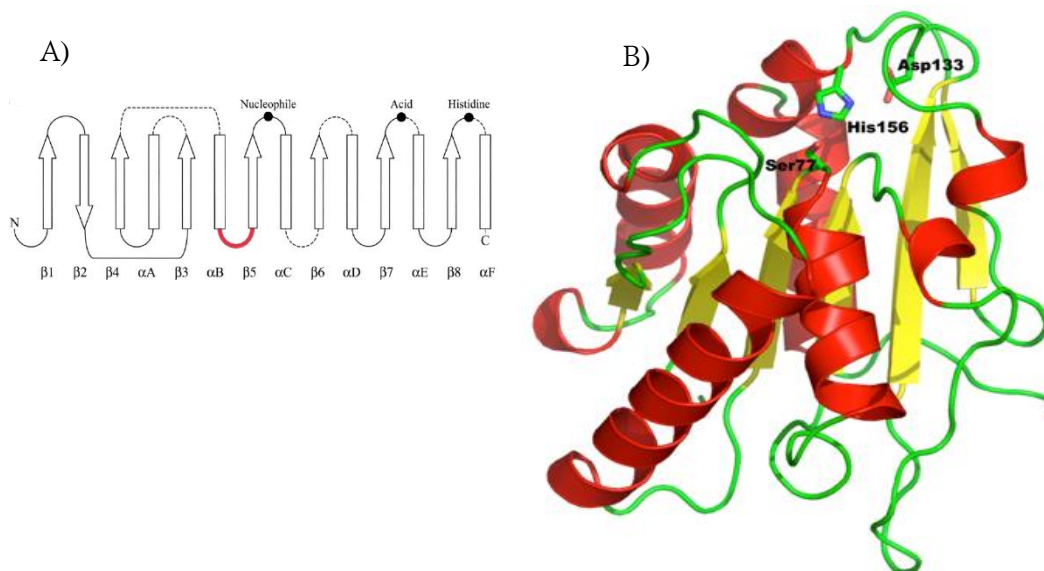


Figura 16. A) Topología general α/β de las lipasas y posición de la triada catalítica formada por un aminoácido nucleófilo, un aminoácido ácido y la histidina. B) Modelo estructural de la lipasa A de *B. pumilus*, en la que se observa la triada catalítica Ser77-Asp133-His156 (Tomada de Mora, 2008).

Esta enzima ha sido estudiada por nuestro grupo de trabajo, y ha demostrado tener actividad hidrolítica preferentemente sobre ésteres de cadena corta cuando se encuentra en medio acuoso (Alcántara, 2009), además es enantioselectiva en reacciones de transesterificación en líquidos iónicos al modificar la temperatura (Bustos-Jaimes, *et al.*, 2013).

En 2009, Benítez Montelongo, demostró que esta lipasa es capaz de realizar reacciones de esterificación de ácidos de cadena corta en medio orgánico (hexano) así como reacciones de alcoholisis. Todos los estudios que se han realizado sobre la actividad catalítica de BpIA en medios no convencionales se han llevado a cabo con enzimas inmovilizadas en soportes poliméricos.

Por sí sola, la inmovilización representa un método tradicional ampliamente usado para la mejora de catalizadores enzimáticos. Este método, si es adecuadamente aplicado, puede conferir al biocatalizador casi todas las propiedades deseadas: estabilidad, actividad, especificidad y

selectividad, reducción de la inhibición (Mateo et al., 2007; Palomo, 2009). La inmovilización permite la utilización de las enzimas en procesos continuos y facilita la separación del biocatalizador de sus productos. En las lipasas, se ha encontrado que al inmovilizar una misma enzima en diferentes soportes se consiguen resultados diferentes en su selectividad, especificidad y actividad (Mateo et al., 2007; Hernández et al., 2011). Es por ello que el desarrollo de nuevos métodos de inmovilización enzimática sigue y seguirá siendo una actividad de investigación y un punto medular para el mejoramiento de los sistemas biocatalíticos en sus diversos campos de aplicación.

En este trabajo exploramos la estabilidad y las propiedades catalíticas de las quimeras de VP2 con la enzima BpIA, tanto en medios no convencionales como en medio acuoso. Los resultados de esta prospección establecerán las bases para las aplicaciones potenciales de estas VLPs quiméricas.

Capítulo 2. HIPÓTESIS

Las VLPs decoradas con dominios de BpIA, tanto en el asa 300-314 como en el extremo N-terminal de la proteína VP2, serán estables en medio acuoso y no acuoso y en primero de estos, podrán catalizar la hidrólisis de heptanoato de colesterol.

Capítulo 3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la estabilidad en medios no acuosos, así como el potencial biocatalítico de la lipasa A de *B. pumilus* (BpIA) fusionada en dos regiones distintas de la superficie de VLPs, derivadas de la proteína VP2 del parvovirus B19 en la reacción de hidrólisis de ésteres de colesterol.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Expresar y purificar las proteínas VP2, VP2-BpIA307 (denominada en lo sucesivo Q1) y BpIA-VP2 (denominada en lo sucesivo Q2).
- Ensamblar partículas tipo virus de las proteínas VP2, y quiméricas Q1 y Q2
- Caracterización biofísica de VLPs mediante dispersión dinámica de luz (diámetro hidrodinámico), dispersión estática de luz (radio medio cuadrático), centrifugación isopícnica (densidad) y microscopía de transmisión de electrones (tamaño de partícula).
- Evaluar la actividad catalítica y termoestabilidad de las VLPs formadas.
- Estudiar la estabilidad de VLPs de VP2 y de proteínas quiméricas en medios no acuoso.
- Evaluar la actividad de BpIA en ambas quimeras en la hidrólisis de heptanoato de colesterol.

Capítulo 4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. METODOLIGÍA GENERAL

En la Figura 17 se esquematiza la metodología general que se siguió durante el desarrollo del proyecto experimental.

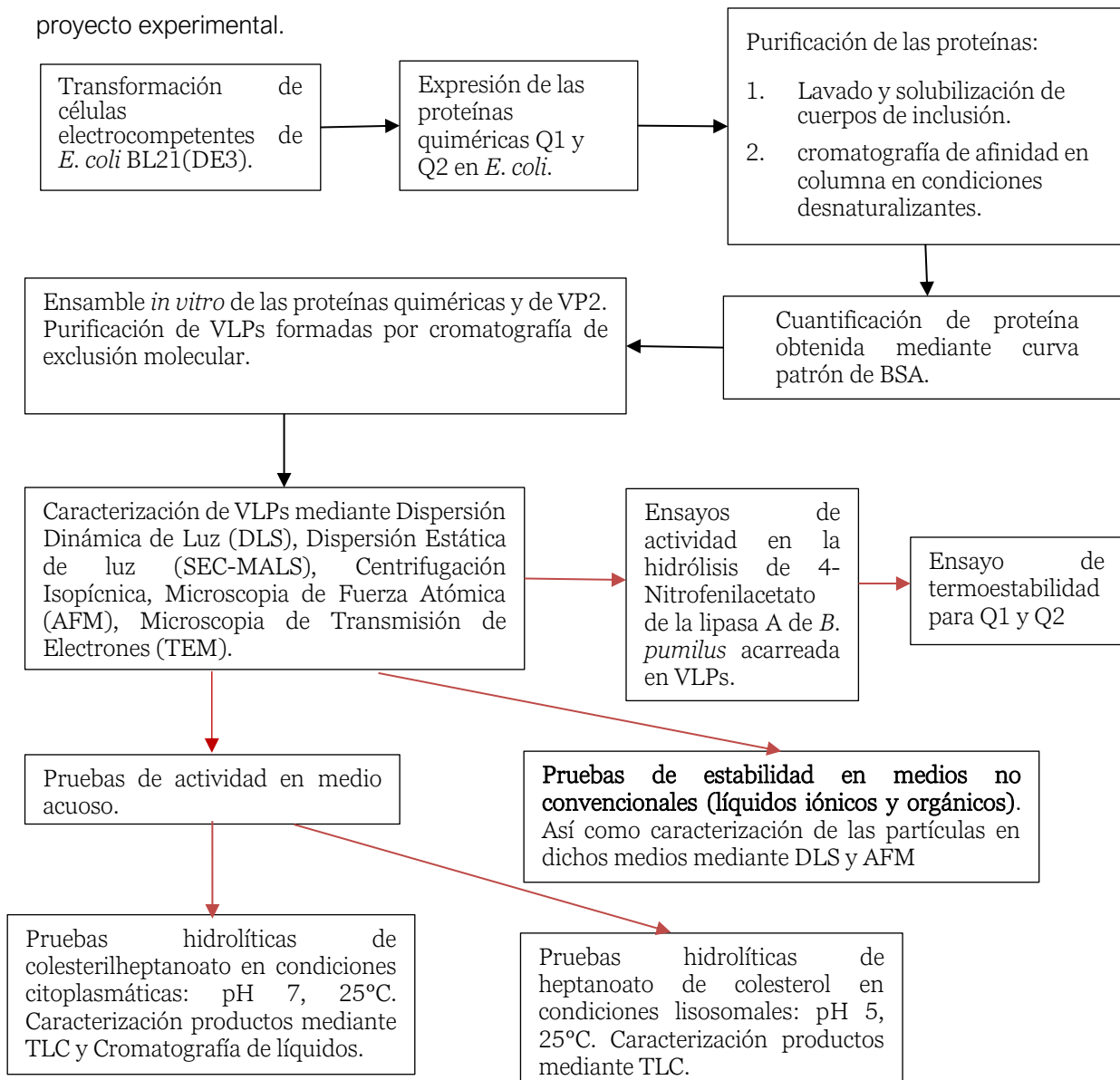


Figura 17. Esquema general del procedimiento experimental.

4.2 MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

4.2.1 Reactivos

| Reactivo | Marca | CAS |
|--|-------------------|-------------|
| Acetonitrilo anhidro | Merck | 75-05-08 |
| Acetonitrilo HPLC | Merck | 75-05-08 |
| Acetato de Etilo | Sigma-Aldrich | 141-78-6 |
| Acetato de Butilo | Sigma | 123-86-4 |
| Ácido bicinconínico Kit (BSA) | Sigma-Aldrich | - |
| Ácido clorhídrico | Sigma | 7647-01-0 |
| Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) | Sigma | 60-00-4 |
| Agar LB (Luria-Bertani) | Difco | 0446-07-5 |
| Ampicilina | Sigma-Aldrich | 69-52-3 |
| Clorhidrato de Guanidina (GdnHCl) | J.T. Baker | 50-01-1 |
| Cloroformo | Sigma-Aldrich | 67-66-3 |
| Cloruro de Cesio (CsCl) | Sigma | 7647-17-8 |
| Cloruro de Potasio (KCl) | Sigma | 7447-40-7 |
| Cloruro de sodio (NaCl) | Sigma | 7647-14-5 |
| Diclorometano (CH ₂ Cl ₂) | Sigma | 75-09-2 |
| Dimetilsulfóxido (DMSO) | Merck | 67-68-5 |
| Dodecilsulfato de Sodio (SDS) | Sigma | 151-21-3 |
| Etanol | Merck | 64-17-5 |
| Éter Etílico | Sigma-Aldrich | 60-29-7 |
| Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio [EMIM] ⁺ [EtSO ₄] ⁻ | Sigma | 342573-75-5 |
| Fosfato monobásico de Potasio (KH ₂ PO ₄) | Sigma | 7778-77-0 |
| Fosfato dibásico de Sodio (Na ₂ HPO ₄) | Sigma | 7558-79-4 |
| Fosfato monobásico de Sodio (NaH ₂ PO ₄) | Sigma | 7558-80-7 |
| Glicerol | Thermo-Scientific | 56-81-5 |
| Heptanoato de colesterol | sigma | 1182-07-6 |

| | | |
|---|----------------------------|-------------|
| Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio [BMIM] ⁺ [PF ₆] ⁻ | Sigma | 174501-64-5 |
| n-Hexano | Merck | 110-54-3 |
| Hidróxido de potasio (KOH) | Sigma | 1310-58-3 |
| Hidróxido de sodio (NaOH) | Sigma | 1310-73-2 |
| Imidazol | Fluka | 288-32-4 |
| Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) | Sigma | 367-93-1 |
| L-Arginina | Sigma | 74-79-3 |
| Matriz para cromatografía de afinidad | Protino™ Ni-TED | - |
| Matriz para cromatografía de exclusión molecular | GE Sephacryl S-500 HR | - |
| Matriz para cromatografía de exclusión molecular | GE Sephacryl S- 1000 HR | - |
| Medio LB (Luria-Bertani) | Sigma | - |
| Metanol | Química Delta | 67-56-1 |
| Metanol para HPLC | Sigma | 67-56-1 |
| Metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazolio [EMIM] ⁺ [MetSO ₃] ⁻ | - | - |
| Piridina | Sigma-Aldrich | 110-86-1 |
| Sulfato de Níquel (NiSO ₄) | Sigma-Aldrich | 10101-98-1 |
| Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio [BMIM] ⁺ [BF ₄] ⁻ | Sigma | 174501-65-6 |
| Tetrahidrofurano (THF) | Sigma | 109-99-9 |
| Tolueno | Sigma | 108-88-3 |
| Tris-HCl | Sigma | 1185-53-1 |
| Tritón X-100 | Sigma-Aldrich | 9002-93-1 |
| Xileno | J.T. Baker | 1330-20-7 |
| 1,4-Ditiotreitol (DTT) | Sigma | 3483-12-3 |

4.2.2 Cepas

| Cepa | Genotipo | Fuente |
|--------------------------|---|---------|
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | F ⁻ ompT ⁻ hsdS _B (rb ⁻ mb ⁻) gal dcm (λclts857 ind Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1) | Novagen |

4.2.3 Instrumentación

| Instrumento | Marca |
|---|-------------------------------|
| Balanza Analítica BP 221S | Sartorius |
| Baño refrigerante | Hoefer Scientific Instruments |
| Centrifuga refrigerada RC 6+ | Thermo Scientific-Sorval |
| Centrifuga refrigerada 5702 R | Eppendorf |
| Micro-Centrifuga refrigerada 5418 | Eppendorf |
| Cromatógrafo de líquidos de alta resolución | Waters |
| Cromatógrafo de líquidos | ÅKTA |
| Electroporador MicroPulser™ | Bio Rad |
| Espectrofotómetro CARY 400 | Varian |
| Micropipetas (5, 20, 100, 200, 1000 µL) | Eppendorf / Gilson |
| Membranas para diálisis | Sigma |
| Microscopio (TEM) JEM-1010 | JEOL |
| Potenciómetro pH 700 | Oakton |
| Sonicador CPX 750 | Cole Parmer |
| Trans-iluminador UV T1203 | Sigma |
| Termomixer confort | Eppendorf |
| Ultra centrifuga Optima™ XL-100K Class S | Beckman |
| Zetasizer µV | Malvern |

4.2.4 Amortiguadores

Tabla 4. Amortiguadores de pre-purificación

| Lisis | Lavados CI | Solubilización de cuerpos de inclusión (S _{CI}) |
|--|---|--|
| Tris-HCl 50 mM KCl 150 mM EDTA 2 mM pH =8.0 | Tris-HCl 50 mM KCl 150 mM EDTA 1 mM Triton X-100 2% v/v pH =8.0 | KH ₂ PO ₄ 50 mM KCl 300 mM GdnHCl 6 M pH =6.5 |

Tabla 5. Amortiguadores de purificación por columna de afinidad a Níquel (parte 1, purificación por FPLC).

| Equilibrado | Elución (E) |
|---|--|
| NaCl 500 mM NaH ₂ PO ₄ 50 mM GuHCl 5 M pH =7.0 | NaCl 500 mM NaH ₂ PO ₄ 50 mM GuHCl 5 M Imidazol 300 mM pH =7.0 |

Tabla 6 Amortiguadores de purificación por columna de afinidad a Níquel (parte 2, columna por gravedad) para Q1

| Equilibrado | Preparativo (P) |
|---|---|
| NaCl 500 mM NaH ₂ PO ₄ 50mM GuHCl 5 M Glicerol 5% v/v pH =7.0 | NaCl 500 mM NaH ₂ PO ₄ 50 mM GuHCl 5 M Imidazol 25 mM pH =7.0 |

| Elución A1 | Elución B1 | Elución C1 | Elución D1 |
|---|--|--|---|
| NaCl 500 mM NaH ₂ PO ₄ 50 mM GuHCl 5 M Imidazol 50 mM pH =7.0 | NaCl 500 mM NaH ₂ PO ₄ 50 mM GuHCl 5 M Imidazol 100 mM pH =7.0 | NaCl 500 mM NaH ₂ PO ₄ 50 mM GuHCl 5 M Imidazol 200 mM pH =7.0 | NaCl 500 mM NaH ₂ PO ₄ 50 mM GuHCl 5 M Imidazol pH =7.0 |

Tabla 7. Amortiguadores de purificación por columna de afinidad a Niquel (parte 3, columna por gravedad) para Q2

| Equilibrado | Preparativo (P) |
|--|--|
| NaCl 500 mM | NaCl 500 mM |
| NaH ₂ PO ₄ 50 mM | NaH ₂ PO ₄ 50 mM |
| GuHCl 5 M | GuHCl 5 M |
| Glicerol 5% v/v | Imidazol 4 mM |
| pH =7.0 | pH =7.0 |

| Elución A2 | Elución B2 | Elución C2 | Elución D2 |
|--|--|--|--|
| NaCl 500 mM | NaCl 500 mM | NaCl 500 mM | NaCl 500 mM |
| NaH ₂ PO ₄ 50 mM | NaH ₂ PO ₄ 50 mM | NaH ₂ PO ₄ 50 mM | NaH ₂ PO ₄ 50 mM |
| GuHCl 5 M | GuHCl 5 M | GuHCl 5 M | GuHCl 5 M |
| Imidazol 15 mM | Imidazol | Imidazol 60 mM | Imidazol 150 mM |
| pH =7.0 | pH =7.0 | pH =7.0 | pH =7.0 |

Tabla 8. Amortiguador de ensamble y amortiguadores para caracterizaciones

| Pre-Replegamiento (R _p) | PBS-arg | Amortiguador de gradiente (G _{ra}) |
|-------------------------------------|---|--|
| Tris-HCl 20 mM | NaCl 138 mM | NaCl 138 mM |
| NaCl 150 mM | KCl 3 mM | KCl 3 mM |
| EDTA 1 mM | Na ₂ HPO ₄ 8.1 mM | Na ₂ HPO ₄ 8.1 mM |
| GuHCl 5 M | NaH ₂ PO ₄ 1.5 mM | NaH ₂ PO ₄ 1.5 mM |
| DTT 1 mM | L-Arginina 0.2 M | EDTA 10 mM |
| pH =7.4 | pH =7.4 | Tritón X-100 0.5% v/v |
| | | pH =6.3 |

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Diseño de proteínas quiméricas

En estudios previos dentro del grupo, se analizaron las interacciones de las diversas asas expuestas en la superficie de las VLPs formadas por la VP2 (Aguilar, 2014). La secuencia de la proteína quimérica VP2-BpIA307 (Q1) se construyó mediante la inserción de la proteína BpIA, entre los residuos 307 y 308 de la VP2 (Bustos-Jaimes, et al., 2017). En el caso de la proteína BpIA-VP2, la inserción de la lipasa se efectuó en el extremo amino terminal con la adición de una proteína de fusión CBP (péptido de unión a calmodulina) (Segovia, 2018). Así mismo, se añadió en cada caso una etiqueta de 6 histidinas (His) en el extremo C-terminal. La secuencia de estas proteínas se utilizó para la construcción de la secuencia de nucleótidos y la posterior síntesis de esta secuencia (Fig. 18).

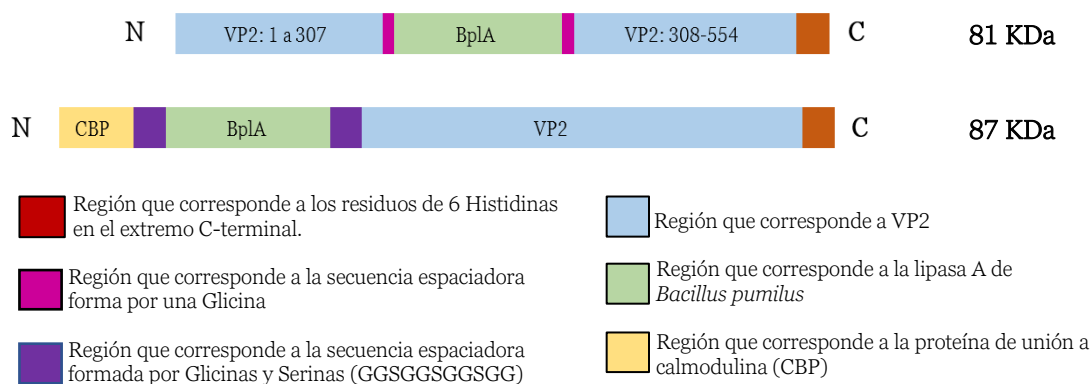


Figura 18. Esquema de la secuencia de aminoácidos de la proteína VP2-BpIA307 (Q1) y de BpIA-VP2 (Q2), en ambos casos la etiqueta de histidinas se encuentra en el extremo carboxilo terminal, mientras que en el caso de Q2 la CBP en el extremo amino terminal.

En el caso de la Q1, el gen sintético se encuentra entre los sitios de restricción NdeI y EcoRI del vector de expresión pET22b(+), pET22b-VP2-BPL307. En rojo está señalados los genes vp2-bpIA307 que codifican para la proteína (Fig. 19).

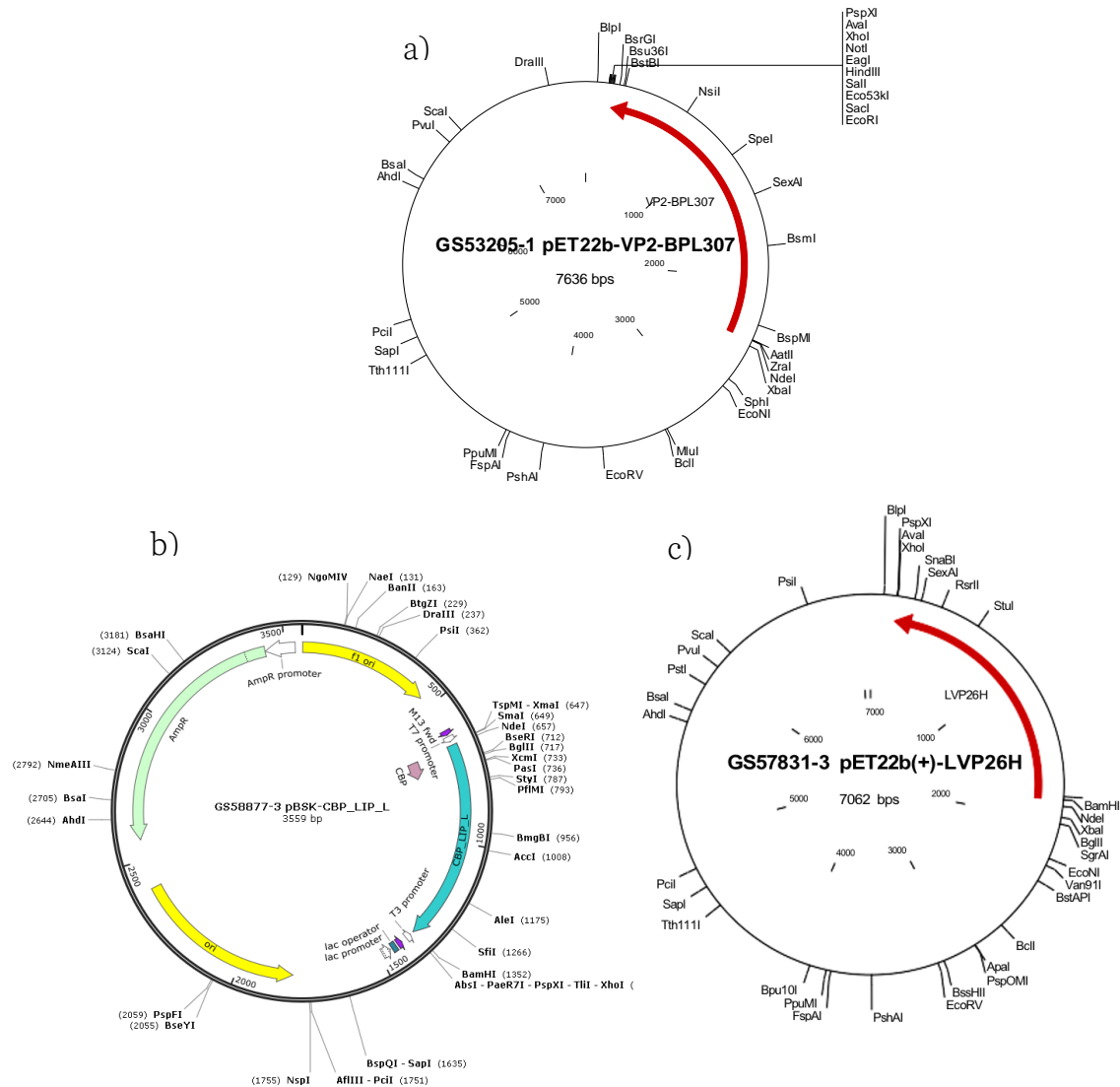


Figura 19. Plásmidos de las proteínas Q1 y Q2 respectivamente. **a)** Plásmido pET22b-VP2-BPL307 (Q1). En rojo está señalados los genes vp2-bpla307 que codifican para la proteína del inserto. **b, c)** Construcción para Q2. Plásmido pBSK- CBP_LIP_L, en verde agua están señalados los genes cbp-bpla. Plásmido pET22b- LVP26H En rojo está señalados los genes vp2 que codifican para la proteína.

Para la construcción de la proteína Q2, el gen sintético localizado (CBP_LIP-L) entre los sitios NdeI y BamHI del vector pBSK se escindió con estas enzimas y se ligó al vector de expresión pET22b-L-VP2 cortado con las mismas enzimas de restricción. En este vector, se encuentra el gen vp2 con la secuencia que codifica para el adaptador o linker (L) del lado 5' del gen vp2.

Esta secuencia contiene un sitio de corte para BamHI. Al ligar estos fragmentos de DNA la construcción CBP_LIP-L queda en el mismo marco de lectura que la proteína VP2, que a su vez cuenta con la etiqueta de His y el codón de término del pET22b+ (Segovia-Trinidad, 2018). Finalmente, la proteína VP2 se produce a partir del mismo vector y con la misma estrategia de purificación que se ha empleado en trabajos previos (Sánchez-Rodríguez et al., 2012).

4.3.2 Obtención de células transformantes de *E. coli* BL21(DE3)

Luego de transformar los plásmidos pET22b-VP2-BPL307 y pETCBP- LIP_L_VP26H en *E. coli* BL21 (DE3) se realizaron pruebas de expresión a las células transformadas. Se inocularon en tubos con medio LB y ampicilina (amp) 1X (concentración final) y se dejó incubando toda la noche a 37 °C con agitación orbital a 250 rpm. Luego se tomó 1 mL de cada uno y se volvió a inocular otro tubo con las mismas características que el anterior, se dejó incubar a las mismas condiciones hasta que llegaron a la fase exponencial de crecimiento (2.5 h), con una densidad óptica a 600 nm de 0.7. En este punto del cultivo se indujo la expresión de las proteínas con IPTG a una concentración final de 0.25 mM probando dos temperaturas de inducción 30 y a 37 °C. Después de esto se tomaron pequeñas muestras cada hora, para poder visualizar la expresión mediante SDS-PAGE.

4.3.3 Sobreexpresión de proteínas recombinantes

Para efectuar la sobreexpresión de las proteínas quiméricas se realizó un doble escalamiento del cultivo: Primero se colocó un inoculo del cultivo celular que expresara a cada proteína en dos tubos de 10 mL con medio LB y ampicilina, se dejaron en incubación por 12 h a 37 °C con agitación orbital de 250 rpm. Para el primer escalamiento, cada par de tubos fue puesto en incubación en un matraz de 500 mL con 100 mL de medio LB adicionado con ampicilina (50 µg/mL), durante 5 h, para finalmente, en un tercer paso ser escalados a un matraz de 2 L de

capacidad con 1 L de medio LB con ampicilina. Este matraz se incubó hasta llegar a la fase de crecimiento exponencial (4 h) en la que fue inducido con IPTG a una concentración final de 0.25 mM. Para la expresión de las proteínas quiméricas, los cultivos se incubaron a 37 °C, mientras que, para la VP2, el cultivo se incubó a 30°C. En todos los casos la incubación se realizó durante 12 h con agitación orbital de 200 rpm.

4.3.4 Purificación de proteínas Q1, Q2 y VP2

La purificación de las 3 proteínas se realizó en tres etapas: lisis celular, lavado de cuerpos de inclusión y purificación por cromatografía de afinidad a Níquel. Para la proteína VP2 se utilizó el protocolo de Sánchez-Rodríguez (2012) que ha sido ampliamente utilizado en nuestro grupo de trabajo.

4.3.4.1.Lisis

Luego de la inducción, las células fueron centrifugadas a 8,000 rpm durante 20 min a 10 °C. El pellet recuperado fue resuspendido en solución salina al 0.9%. Con la finalidad de eliminar los restos de medio de cultivo y otras impurezas celulares se centrifugó a 8000rpm a 4 °C durante 20 minutos. Estos lavados salinos se efectuaron 2 veces más, acumulando así 3 ciclos de limpieza (es recomendable realizar al menos dos ciclos). En el último ciclo el pellet obtenido se congeló a -20 °C durante 2 h (si se desea, puede almacenarse de esta manera para su tratamiento posterior).

Transcurrido el tiempo la biomasa congelada se mantuvo en baño de hielo y se resuspendió en 30 mL de amortiguador de lisis (ver lista de amortiguadores) frío. Las células se lisaron por sonicación empleando pulsos de 10 s con pausas de 15 s, durante 15 min en un baño de hielo. Finalmente, la muestra se centrifugó por 20 min 8,000 rpm y 4 °C.

4.3.4.2. Lavado de cuerpos de inclusión

En trabajos anteriores se describe cómo la proteína VP2 y otras proteínas quiméricas basadas en esta tienden a la formación de cuerpos de inclusión al expresarse en *E. coli*. Posteriormente Soto (2017) y Segovia (2018) comprobaron que las proteínas Q1 y Q2 respectivamente no eran la excepción. Por lo tanto, el protocolo empleado para la limpieza de los cuerpos de inclusión se realizó con base en los trabajos anteriores con algunas modificaciones.

Los sedimentos con los cuerpos de inclusión se mantuvieron en baño de hielo y se resuspendieron en 30 mL de amortiguador de lavado, se sonicaron durante 10 min (pulsos de 10 s y pausas de 15 s). Posteriormente se centrifugó durante 20 min a 8,000 rpm a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Este lavado se repitió 4 veces más, y en el último lavado se centrifugó durante 30 min a 10,000 rpm a 4 °C. Es importante mencionar que el éxito del lavado de cuerpos de inclusión radica en la composición del amortiguador, así como en la repetición de los ciclos de lavado para favorecer la señal sobre ruido (observada en los geles de poliacrilamida, en dichas fracciones), a sabiendas de que el rendimiento disminuirá, pero la pureza será mayor. La fracción insoluble obtenida en el último lavado se solubilizó con 40 mL de amortiguador S_{Cl}, que contiene 6 M de GuHCl, y se incubó durante 12 h a 37 °C y agitación orbital de 200 rpm, para facilitar la solubilidad. Los agregados y las fracciones insolubles fueron eliminados por decantación después de centrifugar durante 40 min a 10,000 rpm. Las proteínas solubilizadas se almacenaron a temperatura ambiente para su uso posterior.

4.3.4.3. Purificación de proteínas desnaturalizadas mediante cromatografía de afinidad

En trabajos anteriores se efectuó la purificación por gravedad de las proteínas quiméricas Q1 y Q2 en condiciones desnaturalizantes utilizando resina Protino TM Ni-TED, sin embargo, para el caso de la Q2 el rendimiento de la purificación al igual que la pureza obtenida era considerablemente menor que los obtenidos para la Q1 e incluso para VP26H, por lo que se realizó una exploración de condiciones de purificación por FPLC en condiciones

desnaturalizantes, para identificar las condiciones óptimas de purificación y así, implementar el protocolo en columnas por gravedad con la resina Protino™ Ni-TED.

Dichos experimentos se efectuaron en el laboratorio del Dr. Alfredo Torres Larios en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se utilizó una columna pre-empacada HiTrap™ HP de 5.0 mL en un equipo ÄKTA-FPLC a una longitud de onda de 280 nm, se utilizó un amortiguador PBS-Arg para equilibrar la columna, la elución se efectuó en un gradiente de 0 a 300 mM de imidazol, utilizando amortiguador E. Se realizaron corridas con 20mL de pellet lavado y solubilizado en amortiguador SCI con GuHCl 5 M.

De los resultados obtenidos en estos experimentos se elaboraron los protocolos modificados para la purificación de Q2 y Q1 en columna empacada manualmente con resina protino™, el cual se detalla a continuación:

| Q1 | Q2 |
|---|--|
| 1. 30 mL de Amortiguador de equilibrado, recolectar y descartar 2. 5 mL de muestra 3. 10 mL de Amortiguador de equilibrado 4. 10 mL de Amortiguador P1, recolectar volumen muerto | 1. 30 mL de Amortiguador de equilibrado, recolectar y descartar 2. 5 mL de muestra 3. 10 mL de Amortiguador de equilibrado 4. 10 mL de Amortiguador P2, recolectar volumen muerto |
| 5. 10 mL de Amortiguador de elución A1 6. 15 mL de Amortiguador de elución B1 7. 15 mL de Amortiguador de elución C1 8. 20 mL de Amortiguador de elución D1 Se recolectan fracciones de 5 mL a partir del paso 5. | 5. 15 mL de Amortiguador de elución A2 6. 20 mL de Amortiguador de elución B2 7. 20 mL de Amortiguador de elución C2 8. 10 de Amortiguador de elución D1 Se recolectan fracciones de 5 mL a partir del paso 5. |

Una vez purificadas las fracciones que contenían a las proteínas quiméricas fueron recolectadas y colocadas en centricones (corte de 50 kDa), en los que se realizaron 3 ciclos de centrifugación

para cambiar el amortiguador en el que se encontraban, y así eliminar el imidazol. Para esto, se colocaron 7.5 mL de proteína recolectada y 7.5 mL de amortiguador de pre-replegamiento (Rp: Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.15 M, EDTA 1 mM, GuHCl 5 M, DTT 1 mM, pH 7.4) y se centrifugó durante 40 min a 4400 rpm. Al terminar cada ciclo se volvió a colocar el volumen restante de amortiguador Rp, para aumentar la concentración de las proteínas de realizó un último ciclo de centrifugación sin adicionar amortiguador Rp. Posteriormente, se determinaron las concentraciones totales de las proteínas Q1, Q2 y VP2 obtenidas, midiendo absorbancia a 280 nm contra una curva patrón de BSA solubilizada en el amortiguador de pre-replegamiento (Rp).

4.3.4 Ensamble *in-vitro* de VLPs de proteínas Q1, Q2 y VP2

La proteína VP2 tiene la capacidad de ensamblarse por sí sola *in vitro* para formar VLPs, y se sabe también que las proteínas quiméricas derivadas de VP2 también pueden ensamblarse *in vitro* (Bustos-Jaimes et al., 2018). Para el ensamble de las VLPs a partir de VP2 se dializaron muestras de las proteínas puras a concentración total de 0.7 mg/mL y volumen final de 1.5 mL, contra 350 mL de amortiguador PBS-Arg durante 36 h. Para el ensamble de las proteínas quiméricas puras se realizó un cambio de amortiguador a las 36 h, dializando un total de 48 h. El uso de L-Arginina durante el replegamiento mejora la estabilidad coloidal de las VLPs (Sánchez-Rodríguez et al., 2016). Este aminoácido se utiliza en amortiguadores en los que se desea suprimir la agregación y floculación de proteínas, y se propone que esto es debido a la interacción entre el grupo guanidinio de la L-Arginina y los residuos de L-Triptófano de las proteínas (Tsumoto et al., 2004).

4.3.5 Caracterización de VLPs ensambladas

La caracterización de VLPs es compleja. Aquí analizamos a las partículas a través de dispersión dinámica de luz (DLS), centrifugación isopícnica, dispersión de luz estática multiángulo acoplada a columna de exclusión molecular (SEC-MALS), microscopía de transmisión de electrones (TEM) y pruebas de actividad hidrolítica de las lipasas.

4.3.4.4. Análisis del radio hidrodinámico de VLPs por dispersión dinámica de luz

La dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés, “Dynamic Light Scattering”) es una técnica hidrodinámica no invasiva que permite determinar el tamaño de moléculas y nanopartículas. Se fundamenta en el movimiento browniano de las partículas en una dispersión coloidal, las cuales provocan que la luz emitida por un láser sea dispersada con diferentes intensidades. Del análisis de estas fluctuaciones se obtiene el coeficiente de difusión (D) de las partículas y utilizando la ecuación de Stokes-Einstein, es posible conocer radio hidrodinámico (R_h) que corresponde al tamaño de la partícula solvatada. (Sharma, 2007)

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta R_h}$$

Esta relación nos muestra que, entre mayor sea el tamaño de la partícula, menor será el coeficiente de difusión, así mismo, dicho coeficiente no solo depende del tamaño de la partícula, sino de otros factores (además de la constante de Boltzmann k_b) tales como: la viscosidad del medio (η) y la temperatura (T) a la cual se efectúa el experimento.

Para ello se utilizó el equipo Zetasizer μ V estableciendo el índice de refracción y la viscosidad en 1.33 y 1.003 cP, respectivamente (Harvey et al., 1998). La temperatura de análisis se fijó en 20 °C y se empleó una celda de 500 μ L. Las muestras provenientes de los tubos de ensamble (diálisis) se microfiltraron con cartuchos de corte 0.45 μ m, de esta se tomaron 500 μ L y se pasaron por otro filtro de 0.22 μ m, para eliminar cualquier partícula que pudiera interferir con las mediciones.

A cada muestra analizada se le realizaron 8 determinaciones con 10 mediciones de 6 segundos cada una. El tamaño de las partículas fue determinado con el promedio de las mediciones realizadas.

4.3.4.5. Densidad de partículas ensambladas mediante centrifugación isopícnica

La centrifugación al equilibrio de gradiente o isopícnica, es un tipo de centrifugación zonal o en función de la densidad, en donde las partículas se distribuyen en fracciones de diferentes densidades de un fluido líquido, lo cual permite la separación de todos los componentes de una muestra. Esta técnica en particular nos permite separar partículas de tamaño similar, pero de diferente densidad, debido a que una de sus características principales es que la densidad máxima del gradiente final no debe exceder la densidad de las especies sedimentales. Por lo tanto, la muestra estará disuelta en una solución isocrática, lo que permitirá que las partículas o moléculas se muevan por el gradiente hasta alcanzar el equilibrio de su densidad con la del medio que las rodea. Después de este punto, no se producirá sedimentación debido a que las partículas flotarán sobre el material que posea mayor densidad que ellas, de tal suerte que, aunque se prolongue el tiempo de centrifugación, las partículas no irán al fondo, a su densidad en este punto se conoce como “bouyant density” (Hull, R., 2014).

Las VLPs analizadas por dispersión dinámica de luz se prepararon para la ultracentrifugación con gradiente de CsCl. Dicha solución se preparó a una densidad de 1.33 mg/mL con 40.8 g de CsCl disueltos en 79.22 mL de solución amortiguadora de gradiente (Gra). En 4 tubos (Ultra-Clear Beckman 11x60) con capacidad de 5 mL, se agregaron 3.5 mL de solución amortiguadora Gra, a 3 de los 4 tubos se les agregaron de manera independiente 500 µL de VLPs de Q1, Q2 y VP2, mientras que el cuarto tubo se utilizó como blanco, al cual contenía 4 mL del amortiguador. La ultra centrifugación se efectuó a 20 °C a una velocidad de 55,000 rpm durante 10 h y 45 min, utilizando un equipo Optima™XL-100K Class S con un rotor 60 Ti, ambos de marca Beckman. Posterior a la ultracentrifugación, se recuperaron las bandas generadas por el gradiente, fueron dializadas para eliminar el CsCl y poder ser caracterizadas también por gel de poliacrilamida.

4.3.4.6. Purificación de VLPs mediante cromatografía de exclusión molecular en HPLC y por SEC-MALS

De los ensambles analizados por DLS, se utilizaron algunos para ser purificados mediante: a) cromatografía de exclusión molecular en HPLC, y b) cromatografía de exclusión molecular acoplada a dispersión estática de luz (SEC-MALS). Ambas técnicas no son destructivas y permiten la separación por tamaño de las partículas, sin embargo, esta última permite la medición más precisa de la masa de los ensambles de las proteínas quiméricas en VLPs ya que la técnica MALS utiliza la intensidad y la dependencia angular de la luz dispersa para medir la masa molar absoluta y el tamaño de las moléculas (radio medio cuadrático, R_g) en solución, así como su separación de fracciones de agregados (masas mayores a las esperadas) o bien especies intermediarias gracias a la técnica SEC.

Para ambos casos, posterior a la diálisis contra amortiguador PBS-Arg y su análisis por DLS, las muestras de cada ensamble se pasaron por un filtro pirinola con tamaño de poro de 0.45 μm para poder ser inyectadas posteriormente a los equipos de HPLC.

A continuación se detalla la metodología utilizada en cada caso:

- a) Para la técnica de separación en HPLC se utilizó un sistema cromatográfico de alta resolución marca Waters con una columna empacada con resina Sephacryl® S-500, se utilizó un detector UV-Vis a una longitud de onda de 280 nm para dar seguimiento a la purificación. Como fase móvil se utilizó amortiguador de fosfatos con arginina (PBS-Arg), se mantuvo un flujo de 0.5 mL/min y a partir del minuto 20 se comenzó la recolección de las muestras en fracciones de 2.0 mL.
- b) Se utilizó una columna empacada con la resina Sephacryl® S-1000 la cual fue previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos con arginina (PBS-Arg), siendo este mismo el amortiguador de elución (NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, NaH₂PO₄ 1.5 mM, pH= 7.4), y mediante la técnica SEC-MALS fue posible la separación de cada ensamble de las proteínas Q1 y Q2 así como su caracterización por dispersión estática de luz, en donde a través de la medición de los cambios en índice de refracción de la muestra que sale de la columna y la manera en la que dispersa la luz desde diversos ángulos, nos arroja un valor de tamaño promedio mucho más preciso.

4.3.4.7. Caracterización de VLPs mediante microscopía de transmisión de electrones (TEM)

Para el análisis por TEM se utilizó un microscopio de transmisión JEOL JEM-1010, para lo cual se efectúa una tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 3% pH=7. Las muestras fueron analizadas utilizando un voltaje de 80 KV, para lo cual se preparó una dilución 1:1000 para cada proteína quimérica y se pasaron por un filtro de 0.22 μm , de estas se tomaron 10 μL que fueron colocados sobre una rejilla de cobre recubierta de formvar durante 5 min. Una vez transcurrido el tiempo, se quitó el exceso de volumen y se dejó fijar durante 1 min. Posteriormente se adicionaron 10 μL del medio de contraste (ácido fosfotúngstico al 3% pH=7) y se dejó durante 1 min. Se eliminó el exceso de volumen y se dejó secar a temperatura ambiente durante 1 h.

4.3.6 Pruebas de estabilidad en medios no convencionales

Una vez caracterizados los ensambles mediante las técnicas antes descritas, se efectuaron las pruebas de estabilidad en los medios no convencionales que se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Resumen de disolventes utilizados para las pruebas de estabilidad

| Disolventes | log P _{ow} | Líquidos Iónicos | Miscibilidad en agua |
|-------------------|---------------------|---|----------------------|
| DMSO | -1.3 | Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio [BMIM] ⁺ [BF ₄] ⁻ | miscible |
| Acetonitrilo | -0.33 | Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio [BMIM] ⁺ [PF ₆] ⁻ | inmiscible |
| THF | 0.49 | Metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazolio [EMIM] ⁺ [metSO ₃] ⁻ | inmiscible |
| Piridina | 0.65 | Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio [EMIM] ⁺ [etSO ₄] ⁻ | miscible |
| Acetato de etilo | 0.73 | | |
| Éter etílico | 0.83 | | |
| Acetato de butilo | 0.89 | | |
| Diclorometano | 1.5 | | |
| Tolueno | 2.73 | | |
| Xileno | 2.9 | | |
| Hexano | 3.98 | | |

En primer lugar, se realizó un tamizado de estabilidad con VLPs de VP2 en los medios antes mencionados y en aquellos en los que las partículas se conservaron se realizaron las pruebas con las VLPs quiméricas. Fue necesario mantener los disolventes en condiciones anhidras, para lo cual se utilizó malla molecular.

Para preparar los ensambles para los ensayos fue necesario realizar un cambio de amortiguador para disminuir la concentración de sales y eliminar la arginina antes de llevarlas a sequedad. El cambio de amortiguador se efectuó mediante una diálisis de 12 h contra PBS 0.5X, de ahí se tomaron alícuotas de 250 μ L que fueron congeladas en Nitrógeno líquido e inmediatamente colocadas en un speed-vac (centrífuga al vacío) durante 2 h. Las muestras secas se conservaron dentro de sus tubos en un desecador.

Para los ensayos de estabilidad, a cada tubo con los ensambles secos se le añadió 1 mL de disolvente y se mantuvieron en agitación orbital (500 rpm) durante 30 min para posteriormente ser analizadas por DLS. En los ensayos realizados para comprobar la estabilidad de las VLPs quiméricas en los medios seleccionados se siguió el mismo protocolo antes descrito.

4.3.7 Actividad hidrolítica de la lipasa BplA en VLPs

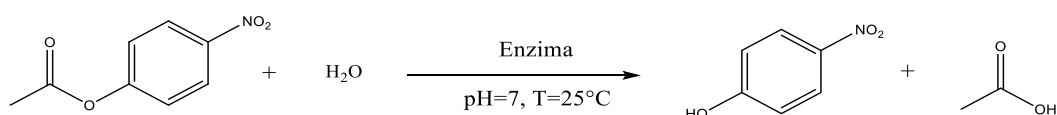


Figura 20. Reacción de hidrólisis de 4-nitrofenilacetato.

Como parte de la caracterización de las partículas ensambladas y purificadas por exclusión molecular, se determinó la actividad hidrolítica de los dominios de BplA presentados en la superficie de la VLPs, con la finalidad de identificar que dicha enzima se plegó adecuadamente durante el proceso de ensamble de las partículas. Para esto fue necesario realizar el experimento en el cual se lleva a cabo la hidrólisis del p- Nitrofenilacetato para producir p-

Nitrofenol (ver figura 20) que puede ser seguida en el espectrofotómetro a 410 nm, para lo cual se elaboró una curva patrón de p- Nitrofenol.

De los tubos de ensamble previamente purificados y caracterizados se tomaron alícuotas de 100 μL de cada una de las VLPs de las proteínas quiméricas, y fueron transferidos a una celda de 1 mL a la que se le adicionaron 890 μL de PBS (pH 7.4). Para iniciar la reacción se adicionaron 10 μL del sustrato (solución de 4 nitrofenilacetato (p-NFA) 10 mM disuelto en acetonitrilo (ACN)). Enseguida se midió el cambio de absorbancia a 410 nm durante 15 min en el espectrofotómetro (CARY 400, Varian) a 25 °C. El blanco fue una solución PBS (PBS-Arg 0.2 M) / ACN quedando este en concentración 5% (v/v), es decir 950 μL de PBS-Arg y 10 μL de p-NFA en acetonitrilo.

4.3.8 Termoestabilidad de BpIA soportada en VLPs

Se estudió la pérdida de actividad enzimática del dominio BpIA en las VLPs en función de la exposición a diferentes temperaturas para obtener constantes de inactivación térmica enzimática (k_{ie}), así como tiempos de vida media. Para los ensayos se ajustó la concentración de proteína a 1 mg/mL, por lo que fue necesario concentrar las fracciones obtenidas de la exclusión molecular. Para este ensayo, al igual que para el de actividad, fue necesario realizar una curva patrón de pNF, cuya pendiente ($Abs_{410} / \mu\text{M}$) nos permitirá calcular la actividad relativa o actividad inicial (A_0) en $\mu\text{M}/\text{min}$.

Se tomaron 5 alícuotas de 700 μL de cada proteína y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL, los cuales se incubaron a las temperaturas a evaluar, 20, 25, 30, 35 y 40 °C, a 500 rpm (Termomixer Comfort, Eppendorf). A tiempos determinados (10, 20, 30, 45, 60, 75 y 90 min) se tomaron 50 μL de cada enzima y se midió su actividad. Para esto, en una celda se colocaron 650 μL de PBS (pH 7.4), 50 μL de enzima y 50 μL de pNFA 10 mM en ACN para iniciar la reacción; la medición se efectuó durante 5 min. Como blanco se utilizó PBS con ACN al 6.7%. La pérdida de actividad de las enzimas se siguió por 90 min.

Los resultados obtenidos se ajustaron a la ecuación logarítmica: $\text{Ln}(A_t/A_0) = -(k_{ie})(t)$ y se graficaron con la ayuda del programa Prism 7.

4.3.9 Pruebas de hidrólisis de ésteres de colesterol por BpIA acarreada por VLPs.

4.3.9.1 Hidrólisis química de heptanoato de colesterol (CE)

Se efectuó la hidrólisis química del heptanoato de colesterol (Fig. 21) con la finalidad de reconocer que la reacción hidrolítica se efectúa y así poder contrastar los productos de reacción con estándares y conocer los tiempos de retención para cada uno de ellos. Este experimento nos servirá como control positivo de la reacción hidrolítica de dicho éster.

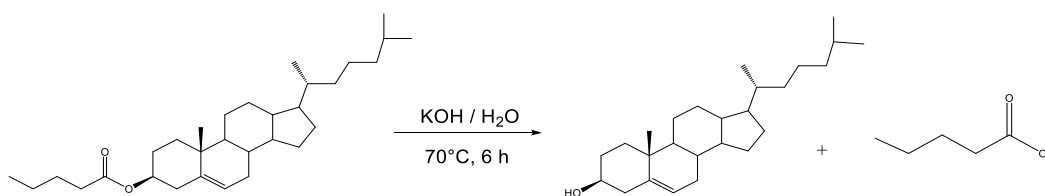


Figura 21. Esquema de reacción para la hidrólisis química del heptanoato de colesterol.

Para este fin se colocaron 20 mg de sustrato en un matraz de bola de 5 mL, al cual se le adicionaron 2 mL de una solución de KOH 0.2 M, y se dejó en agitación y baño a 70 °C durante 6 h.

A. Extracción de lípidos

De la mezcla de reacción se tomaron 4 alícuotas de 500 µL y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL. Por otra parte, se preparó una mezcla de 2 mL de cloroformo 700 µL de HCl (35% v/v) de la cual fueron adicionados 500 µL a cada tubo. Las mezclas de extracción se agitaron en vórtex durante 2 min, después fueron centrifugadas a 300 rpm durante 5 min. Se recuperó la fase orgánica y se transfirió a un tubo eppendorf de 0.6 mL para su análisis en capa fina.

B. Cromatografía en capa fina (TLC)

Para el análisis por TLC, se utilizó como fase estacionaria una placa de sílica gel. Para la fase móvil se efectuaron varias pruebas en función de lo reportado en la literatura para la separación de colesterol y ácidos grasos (Morris, 1963). Sin embargo, la mezcla que logró separar mejor la muestra fue hexano/acetato de etilo (7:3). La muestra con la mezcla de extracción fue colocada con un capilar en la marca asignada, así como el control negativo que fue el sustrato (heptanoato de colestereol disuelto en cloroformo).

Previamente, se preparó la fase móvil del sistema cromatográfico, hexano/acetato de etilo (7:3) y se depositó en una cámara de desarrollo. Es importante asegurar que la atmósfera de la cámara de desarrollo está saturada por el vapor de la fase móvil. Para ello se introdujo papel de filtro en la cámara y se dejó el sistema equilibrándose durante 2 h. Tras este tiempo, se introdujo la placa en la cámara de desarrollo equilibrada, y se mantiene hasta que finalice el ascenso de la fase móvil por la misma. En este momento se extrajo, con pinzas, la placa de la cámara de desarrollo y se dejó secar al aire. La placa se introdujo en una cámara de revelado con sílica gel con I₂ sólido en equilibrio con su vapor y se dejó por unos minutos. La placa fue extraída con pinzas y fue llevada a una cámara UV para ser revelada por completo.

4.3.9.2 Hidrólisis enzimática de heptanoato de colesterol (CE).

Para estos ensayos (Fig. 22) se contó con un estándar de colesterol (Sima-Aldrich), para realizar el control de las placas cromatográficas y la posterior cuantificación por HPLC.

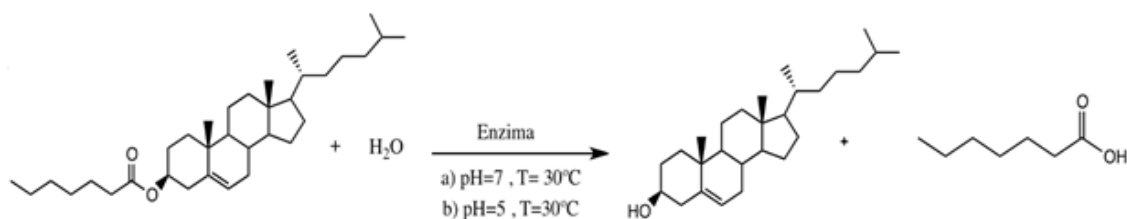


Figura 22. Reacción de hidrólisis enzimática de heptanoato de colesterol mediada por BpIA.

A. Reacción a pH 7.0 y 30 °C

Se colocaron 500 μL de las VLPs quiméricas en tubos eppendorf de 1.5 mL a los cuales se les adicionaron 100 μL de una disolución 1 mM de heptanoato de colesterol (CE) en cloroformo. La mezcla de reacción se colocó en un termo-mixer a 300 rpm y 30 °C durante 24 y 48 h. Una vez transcurrido el tiempo, se efectuó una extracción de lípidos con algunas modificaciones:

Se realizó una mezcla fría de MeOH-CHCl_3 (1:2)

1. Se agregaron 75 μL de esta mezcla directamente a los tubos en donde se efectuó la reacción.
2. Se agitaron vigorosamente en un vórtex durante 2 min para posteriormente ser centrifugados a 300 rpm durante 5 min. Se recuperó la fase orgánica.
3. La fase acuosa fue lavada una vez más con la mezcla de extracción, tal y como lo indican los pasos 1 y 2.

Una vez efectuada la extracción se obtiene un volumen aproximado de 100 μL por cada tubo de reacción, los cuales son guardados a 4 °C para ser utilizados posteriormente.

B. Hidrólisis de heptanoato de colesterol a pH 5.0 y 30 °C

Para estos experimentos, se utilizó amortiguador de citratos a pH 5, por lo que se efectuaron cambios de amortiguador a ambas proteínas ya ensambladas. Para evitar agregación de las VLPs el cambio se realizó en centricones con corte de 25 kDa.

De ahí se tomaron alícuotas de 500 μL que fueron colocadas en tubos eppendorf de 1.5 mL y, siguiendo el mismo protocolo de la reacción enzimática a pH=7.0, se dejó incubando por 24 y 48 h, para posteriormente efectuar la extracción de lípidos.

4.3.9.3 Determinación cualitativa de las reacciones de hidrolisis enzimática mediante cromatografía en capa fina.

Para analizar la reacción de hidrólisis del heptanoato de colesterol mediada por los dominios de BplA en las condiciones antes mencionadas, se analizaron los productos de dicha reacción mediante TLC de la misma forma que se hizo con la reacción de hidrólisis química.

Para cada reacción, se tomó una muestra con un capilar y fue colocada en placas cromatográficas de sílica gel, acompañada de los estándares de colesterol y otros controles. La elución y todo el demás procedimiento fue el mismo que el descrito en la sección **B** del apartado 4.3.9.2.

4.3.9.4 Detección y cuantificación por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).

Para la determinación de esteroides se utiliza la HPLC de fase reversa (RP-HPLC), ya que para separar analitos hidrofóbicos se requiere una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar, para que por la disminución del efecto hidrofóbico los analitos eluyan, considerando que entre más hidrofóbicos sean, el tiempo de retención será mayor.

Para la determinación cuantitativa de colesterol producido en las reacciones catalíticas realizadas por las quimeras, se efectuó en primer lugar un protocolo para identificar el tiempo de retención de colesterol y colesterol heptanoato de los estándares. En un segundo paso se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones de colesterol. Finalmente, en un tercer paso, se cuantificó el colesterol producido a través de su interpolación en la curva de calibración.

I. Detección de estándares

El equipo utilizado corresponde a un cromatógrafo Waters Alliance e2695, y una columna para RP-HPLC C18. Para la preparación de los estándares, se colocaron 100 μ L de un stock de colesterol 10 mM disueltos en cloroformo, se evaporó el disolvente en un termomixer a 60°C,

durante 1 min) y la muestra se redisolvió en 100 μL de hexano y se agregaron 400 μL de isopropanol y 400 μL de acetonitrilo, obteniendo así, una concentración final de 1 mM de colesterol. Antes de la inyección la muestra fue pasada por un filtro de 0.22 μm . Se efectuó el mismo protocolo para el estándar de heptanoato de colesterol.

La fase estacionaria fue llevada a 40 $^{\circ}\text{C}$, al igual que las muestras antes de la inyección. La fase móvil consistió en una mezcla acetonitrilo-isopropanol (50:50 v/v). El tiempo de corrida para cada inyección fue de 15 min con un flujo de 1 mL/min y el detector se fijó a una longitud de onda de 210 nm.

II. Detección y cuantificación de colesterol

Para el experimento preliminar se efectuó la reacción en un volumen 10 veces más grande al previamente usado, y se continuó con el protocolo de extracción de lípidos con metanol-cloroformo, escalado al tamaño de la reacción, obteniendo 1000 μL de dichas extracciones.

Las muestras extraídas fueron preparadas para la inyección;

- ✓ Se colocaron dos alícuotas de 500 μL extraídos en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se evaporó el disolvente (60 $^{\circ}\text{C}$, 5 min) y se re-disolvió en 50 μL de hexano, se adicionaron 950 μL de isopropanol y 50 μL de acetonitrilo, obteniendo un volumen total de 1 mL, se filtró con un cartucho de 0.22 μm y se colocaron en el cromatógrafo para la inyección.

III. Curva de calibración y cuantificación de colesterol producido.

Se realizó una curva patrón (estándar externo) para determinar la concentración del colesterol en la muestra. Esta curva comprendió valores de concentración de 0.1 a 1.0 mM.

La metodología de preparación de muestras fue la misma que la seguida en la sección de detección de estándares, solo que para esto se prepararon 5 concentraciones diferentes: 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mM. Cada inyección se realizó por triplicado, las condiciones de las corridas fueron idénticas a las de la detección de estándares.

Una vez obtenida la curva de calibración, se efectuó la cuantificación de colesterol producido en la reacción enzimática a pH=7 durante 24 y 48 h para cada quimera. Siguiendo el protocolo **B** de la detección preliminar se obtuvieron las concentraciones deseadas mediante la interpolación en la curva de calibración.

Capítulo 5. Resultados y Discusión

5.1 Obtención de células transformantes y sobreexpresión de proteínas quiméricas Q1 y Q2

Posterior a la electroporación, recuperación y crecimiento de células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con los plásmidos pET22b-VP2-BPL307 y pETCBP-LIP_L-VP26H, correspondientes a las proteínas Q1 y Q2 respectivamente, se sembraron en cajas Petri con medio LB con ampicilina. Posteriormente se realizó la selección de colonias aisladas para ser inoculadas en 10 mL de medio líquido LB con ampicilina y así corroborar la sobreexpresión de las proteínas a través de una serie de ensayos, agregando IPTG como agente inductor a una concentración final de 0.25 mM. Una vez constatada la presencia de las proteínas quiméricas mediante geles de poliacrilamida, se conservaron las células en glicerol al 50% v/v a -70 °C. Para la obtención de las proteínas se efectuó el protocolo descrito en la sección 4.3.3 utilizando IPTG 0.25 mM para la inducción, la cual transcurrió durante 12 h a 37 °C y 200 rpm para las proteínas Q1 y Q2, mientras que para la proteína VP26H se requirieron 16 h a 30 °C y 150 rpm. Se comprobó el nivel de sobreexpresión de las proteínas mediante SDS-PAGE (Fig. 23).

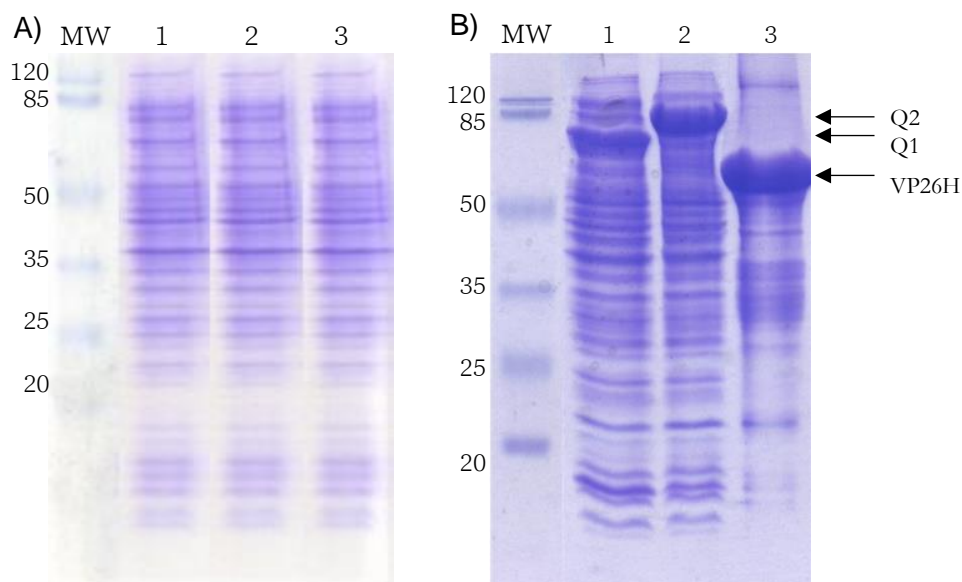


Figura 23. Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes para la comprobación de la obtención de proteínas Q1, Q2 y VP2. A) lisados celulares antes de la inducción. B) Sobreexpresión de proteínas recombinantes. Carril 1, proteína Q1 (81 kDa); carril 2, proteína Q2 (87 kDa); carril 3, proteína VP26H (58 kDa)

En todos los casos, el peso molecular estimado coincide con los reportados en trabajos anteriores, siendo de 58 kDa para la proteína VP26H, 81kDa para la proteína VP2-BpLA307 (Q1) y de 87 kDa para VP2-BpIA (Q2). Podemos añadir que a pesar de que la sobreexpresión de las proteínas Q1 y Q2 es bastante buena, la cantidad de proteína VP26H producida, es siempre superior a la de ambas quimeras.

5.2 Purificación de proteínas quiméricas.

Como se mencionó en el apartado de metodología (sección 4.3.4) la purificación, tanto de las proteínas quiméricas como de VP26H, se efectuó en varias etapas. La primera fue la lisis celular, seguida de un lavado y resuspensión de cuerpos de inclusión en condiciones desnaturalizantes y finalmente las proteínas de interés fueron purificadas mediante columna de afinidad a Níquel gracias a la etiqueta de histidinas con que cuenta cada proteína.

En la figura 24 se muestran los cromatogramas obtenidos de la purificación de ambas proteínas quiméricas, en estos, se observa claramente que Q2 eluye casi al iniciar el gradiente, a partir del 8% de la concentración final de imidazol, equivalente a 24 mM. Las fracciones que fueron recolectadas a partir de la elución al minuto 40 y hasta el final del pico 1A al minuto 48 superaron la pureza y el rendimiento obtenidos a través de los experimentos de purificación en IMAC por gravedad, en la figura 25c) se muestra el gel de poliacrilamida hecho a las fracciones recolectadas.

Para Q1, el tiempo de retención es mayor, además de observarse dos picos (1B y 2B), los cuales no logran separarse y además contienen a la misma proteína. Sin embargo, el segundo pico (2B) corresponde a la proteína con mucho mayor pureza.

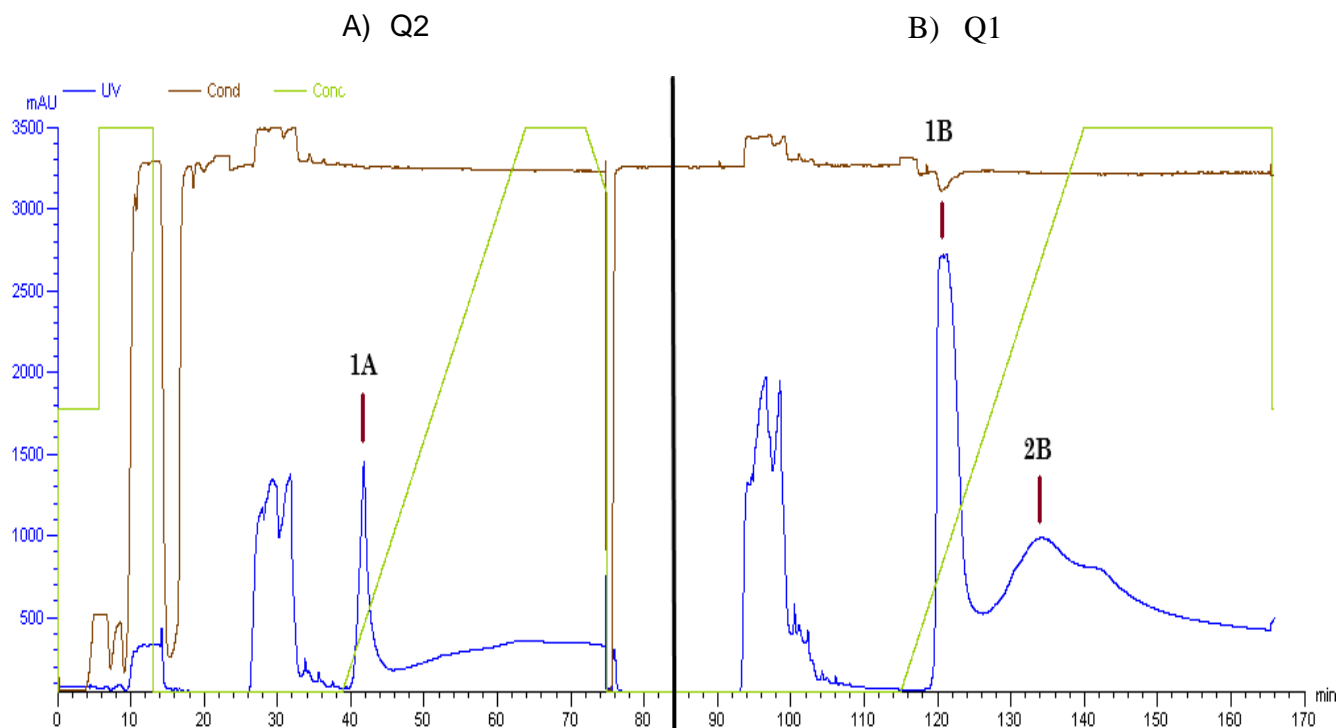
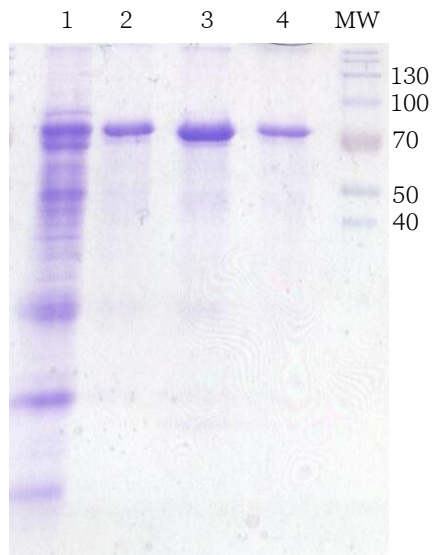


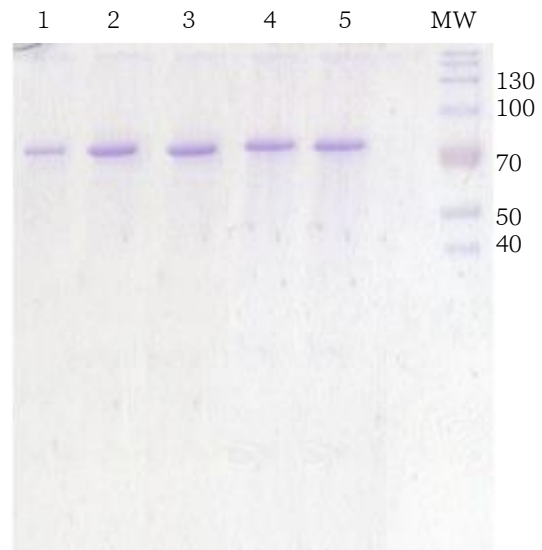
Figura 24. Cromatograma obtenido en la purificación de las proteínas quiméricas Q1 (B) y Q2 (A) a través de cromatografía de afinidad a Níquel, en condiciones desnaturalizantes. Línea azul, absorbancia a 28nm; línea café, conductividad; línea verde, gradiente de imidazol

Comparativamente, podemos resaltar la diferencia de afinidad de la Q1 y la Q2 por la columna, a pesar de que ambas poseen una etiqueta de seis histidinas, en Q2 la efectividad es menor. Esto podría deberse al aumento de tamaño de esta quimera en comparación con la Q1, el cual es de 6-7 kDa que, podría parecer poco, pero para proteínas tan grandes como éstas, una diferencia así de pequeña podría significar un gran impedimento estérico al momento de pegarse a la columna, provocando que mucha de la proteína se una débilmente con la resina o inclusive no lo logre.

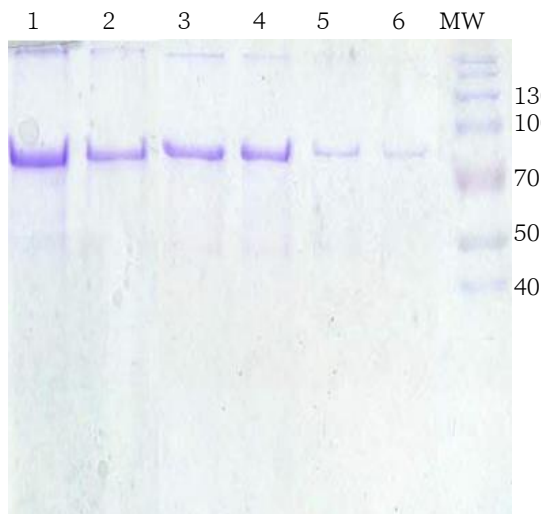
A) Q1 (1B)



B) Q1 (2B)



C) Q2 (1A)



D) VP26H

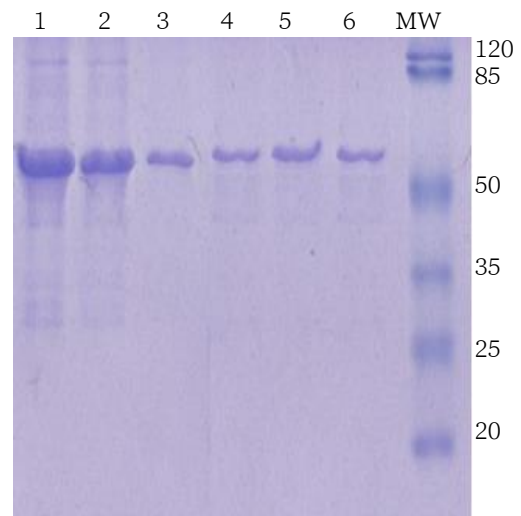


Figura 25. Perfil electroforético de las fracciones recolectadas durante la purificación por IMAC de las proteínas de interés. A y B) Purificación de Q1 mediante FPLC. A) Carriles 1-4, fracciones correspondientes al pico 1B; carril 5, marcador de peso molecular; B) carriles 1-5, fracciones correspondientes al pico 2B; carril 7, marcador de peso molecular. C) Purificación de Q2 mediante FPLC. Carriles 1-6, fracciones correspondientes al pico 1A; carril 7, marcador de peso molecular. D) Purificación de proteína VP26H por gravedad. Carriles 1-6, fracciones recuperadas durante el proceso de elución; carril 7, marcador de peso molecular.

A continuación, se resumen los valores de concentraciones y rendimiento obtenidos para cada una de las proteínas durante este proceso (se consideró el promedio de 3 experimentos, para cada proteína)

| <i>Proteína</i> | <i>Proteína (mg/mL)</i> | <i>Volumen obtenido de proteína (mL)</i> | <i>Proteína total (mg)</i> |
|-----------------|-------------------------|--|----------------------------|
| <i>Q1</i> | 3.21 | 18 | 57.78±0.16 |
| <i>Q2</i> | 2.98 | 16 | 47.68±0.13 |
| <i>VP26H</i> | 4.35 | 15 | 65.25±0.19 |

Estos resultados son incluso mejores a los previamente reportados para Q2 (30 vs. 48 mg/L) (Segovia-Trinidad, 2018) y para Q1 (42 vs. 58 mg/L) (Gutiérrez-Landa, 2014, Bustos-Jaimes, *et al.*, 2017)), mejorando también el grado de pureza de ambas proteínas. En función de estas observaciones, se diseñó un protocolo mejorado para la purificación por gravedad de ambas proteínas quiméricas, el cual se mostró en el apartado **4.3.4.3** del capítulo de metodología.

5.3 Caracterización de VLPs ensambladas

Una revisión reciente resume los métodos más recurrentes para la caracterización de VLPs, dentro de los que destaca métodos biofísicos como DLS, AF-MALS, TEM, AFM, Cryo-EM, centrifugación isopícnica y centrifugación analítica, entre otros. Igualmente se destacan métodos bioquímicos como SDS-PAGE, purificación con HPLC y MS (composición de aminoácidos y peso molecular). En este trabajo se echó mano de algunas de estas técnicas para la caracterización adecuada de las partículas, además se incluyeron experimentos de caracterización bioquímica de la enzima acarreada, tales como: actividad enzimática específica y termoestabilidad.

Una vez mejorado el protocolo de purificación para ambas quimeras, se procedió al ensamblado *in vitro* de VLPs a partir de las mismas, mediante la eliminación del agente caotrópico por diálisis contra amortiguador PBS-Arg y así abrir paso a su caracterización.

5.3.1 Caracterización por Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Posterior a la eliminación del agente desnaturalizante, fue necesario pasar las muestras por un filtro 0.22 μm para reducir la presencia de especies intermediarias y de agregados de las VLPs, derivados del ensamble *in-vitro*. En la figura 26 se muestran los diagramas de distribución por volumen obtenidos para las tres proteínas, para las cuales los resultados son consistentes con los reportados en trabajos anteriores.

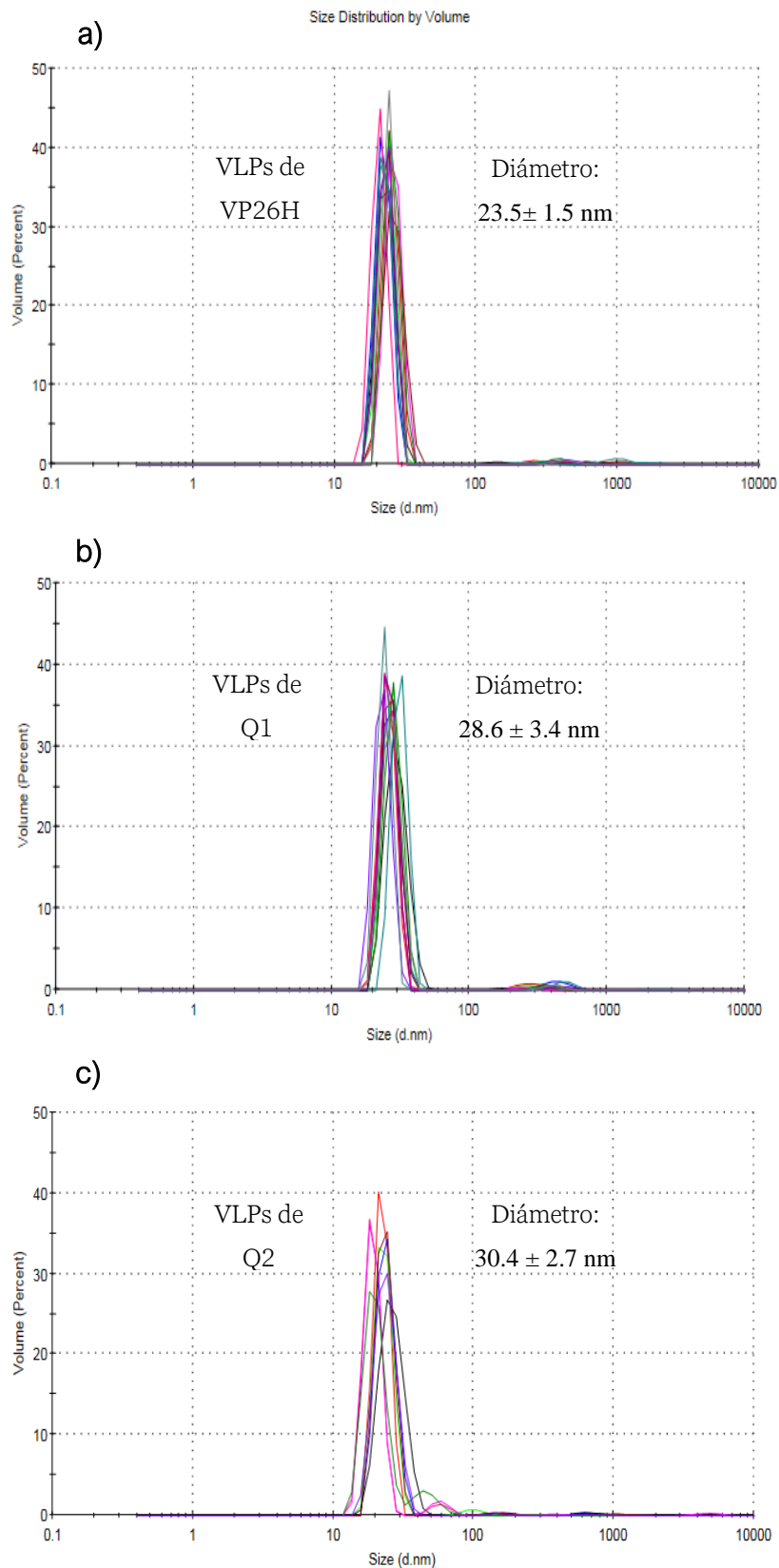


Figura 26. Distribución de tamaño de partícula por DLS para las especies formadas por las proteínas purificadas.

a) Ensamble de VP2 (42 h de diálisis). Distribución por volumen. Tamaño promedio: 23.5 nm. $Z = 174$ nm. Índice de polidispersidad: 0.312. **b)** Ensamble de Q1 (60 h de diálisis). Distribución por volumen. Tamaño promedio: 28.6 nm. $Z = 180.6$ nm. Índice de polidispersidad: 0.652. **c)** Ensamble de Q2, (60 h de diálisis). Distribución por volumen. Tamaño promedio: 30.4 nm. $Z = 154.7$ nm. Índice de polidispersidad: 0.460.

5.3.2 Caracterización de partículas ensambladas mediante centrifugación isopícnica

Las muestras obtenidas de los ensambles, previamente caracterizadas por DLS, se analizaron mediante centrifugación isopícnica en gradientes de cloruro de cesio para separar por densidad a las especies obtenidas (Figura 27).

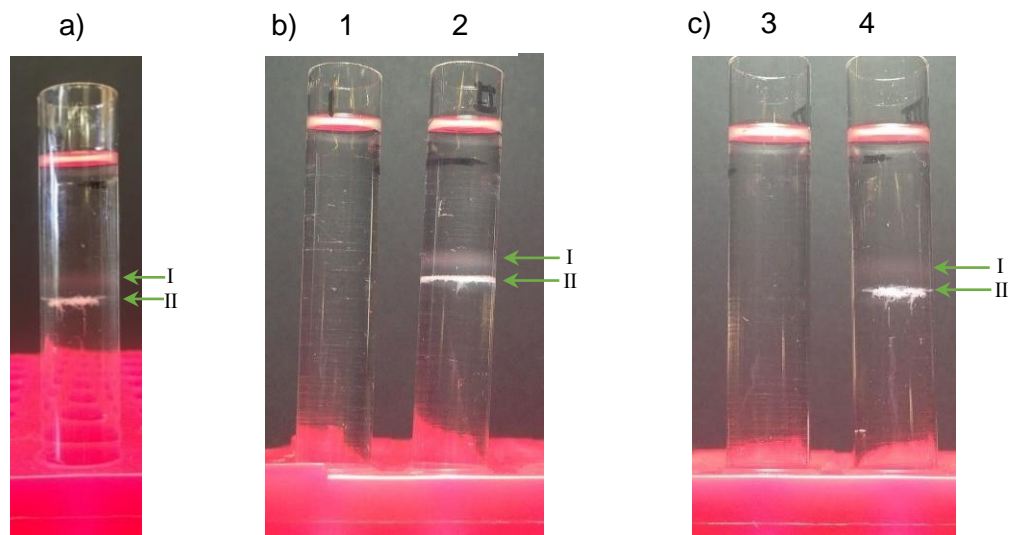


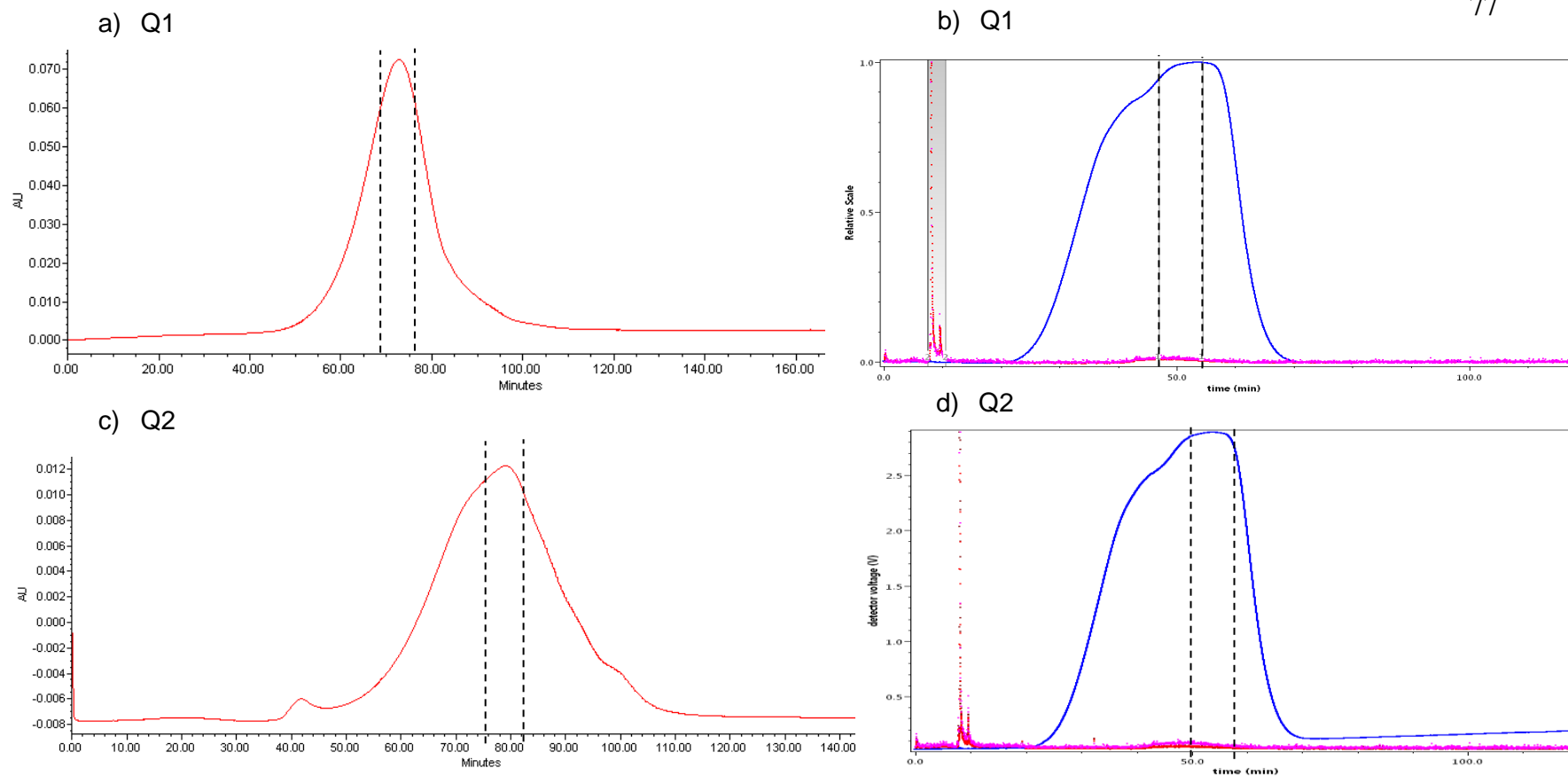
Figura 27. Análisis por centrifugación isopícnica en gradiente de CsCl. **a)** VP2. **b)** Control sin proteína (1), Q1 (2). **c)** Control sin proteína (3), Q2 (4). En todos los casos la banda superior (I) corresponde a especies intermediarias y la banda inferior (II) a las VLP.

En todos los ensayos se observaron dos bandas principales en los gradientes, lo cual concuerda con lo reportado en trabajos anteriores (Sánchez- Rodríguez et al., 2012), en donde se determinó que la banda superior corresponde a especies intermediarias (monómeros, capsómeros, oligocapsómeros), mientras que la banda inferior, de mayor densidad y más concentrada, corresponde a las VLPs. La banda de VLPs de VP2 migró a una densidad de 1.28 g/mL, tal y como ha sido descrito para estas partículas, en el caso de las VLPs de Q1 se obtuvo una densidad de 1.29 g/mL, mientras que para las VLPs de Q2 la densidad fue de 1.31 g/mL, lo que es consistente debido al tamaño de éstas en comparación con las VLPs de VP2.

5.3.3 Caracterización y purificación de VLPs por cromatografía de exclusión molecular.

Recordando lo dicho en el capítulo anterior, sección 4.4.3.1, para esta caracterización se realizó la purificación por cromatografía de exclusión molecular (SEC). Sin embargo, se utilizaron dos columnas diferentes, además de técnicas de detección y caracterización distintas. En la primera, para la purificación de las partículas de las proteínas quiméricas se utilizó un equipo HPLC con una columna Sephacryl S-500, para posteriormente analizar las fracciones obtenidas mediante DLS. En la segunda, se usó un equipo HPLC acoplado a un detector de dispersión estática de luz (SEC-MALS), en el cual además de observar el cromatograma y visualizar los tiempos de retención de las diversas especies es posible obtener los tamaños y pesos moleculares promedio de dichas partículas en cada fracción obtenida durante la corrida. Gracias a esto, es posible seleccionar inmediatamente la o las fracciones que corresponden exclusivamente a las VLPs de cada quimera sin necesidad de analizarlas posteriormente por DLS. Además, en este segundo experimento se utilizó una columna Sephacryl S-1000 que posee mayor tamaño de poro.

En la figura 28 se muestran los cromatogramas obtenidos para cada experimento, así como una tabla que resume los tiempos de retención obtenidos en cada experimento y el tamaño de partícula observado por DLS (no mostrados) para la técnica SEC correspondiente a las fracciones en la sección marcada con líneas punteadas y, en el caso de SEC-MALS, el tamaño reportado por el equipo en la sección marcada, la cual corresponde a las fracciones recolectadas que contenían a las VLPs de tamaño adecuado.



e)

| SEC | | |
|----------|---------------------------|--------------------------|
| Proteína | Tiempo de retención (min) | Tamaño de partícula (nm) |
| Q1 | 64 | 28.71±1.25 |
| Q2 | 76 | 30.26±1.49 |

Figura 28.

f)

| SEC-MALS | | |
|----------|---------------------------|--------------------------|
| Proteína | Tiempo de retención (min) | Tamaño de partícula (nm) |
| Q1 | 45 | 29.82±0.52 |
| Q2 | 50 | 31.05±0.34 |

Purificación y caracterización de VLPs por cromatografía de exclusión molecular. a) Cromatograma por SEC de Q1 en una columna Sephacryl S-500; b) Cromatograma por SEC de Q2 en una columna Sephacryl S-500; c) Cromatograma por SEC de Q1 en una columna Sephacryl S-1000; d) Cromatograma por SEC de Q2 en una columna Sephacryl S-1000; e,f) Tamaño de las partículas obtenida a partir de Q1 y Q2 por DLS y

5.3.4 Caracterización de partículas mediante microscopía de transmisión de electrones

En las micrografías mostradas en la figura 29, se puede observar que para ambas quimeras hay partículas de tamaño esperado, para Q1 alrededor de 28 nm y para Q2 de 31 nm aproximadamente. Sin embargo, también hay presencia de partículas más pequeñas a estas, las cuales son especies intermediarias de entre 18-20nm.

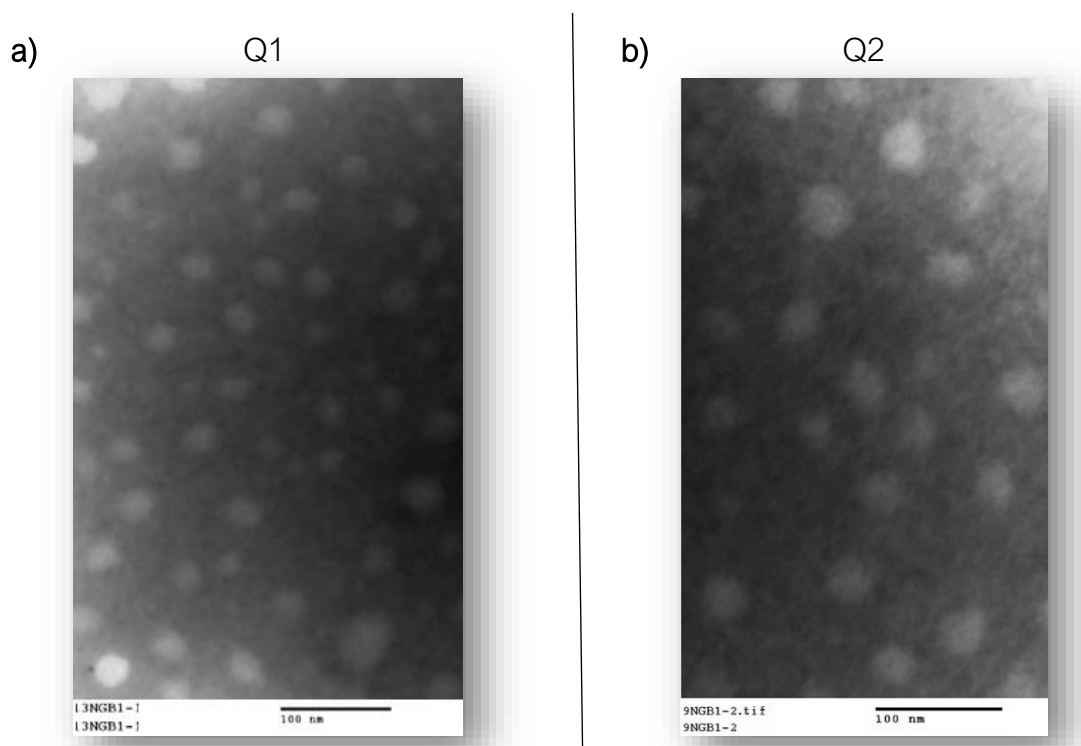


Figura 29. Micrografías de VLPs de proteínas quiméricas. a) Q1 con tamaños de aproximadamente 28 nm con aumento de 250000x. b) Q2 con tamaños de aproximadamente 31 nm con aumento de 250000x.

5.4 Actividad enzimática

Los ensayos de actividad de los dominios de BpIA en las VLPs nos permite evaluar la funcionalidad de estos. En esta metodología se determina la velocidad inicial (v_i) en el proceso de formación de p-nitrofenol (p-NP) obtenido de la hidrólisis de p-nitrofenilacetato (p-NFA) por acción de la enzima, y se relaciona con la cantidad de proteína (actividad específica). Para estos propósitos se elaboró una curva patrón de p-NP a una longitud de 410 nm y cuyo valor de la pendiente corresponde a $\epsilon \cdot l$ en $\left[\frac{L}{\mu\text{mol}_{p-NP} \times \text{cm}} \right]$ de acuerdo a la ecuación de Lambert-Beer:

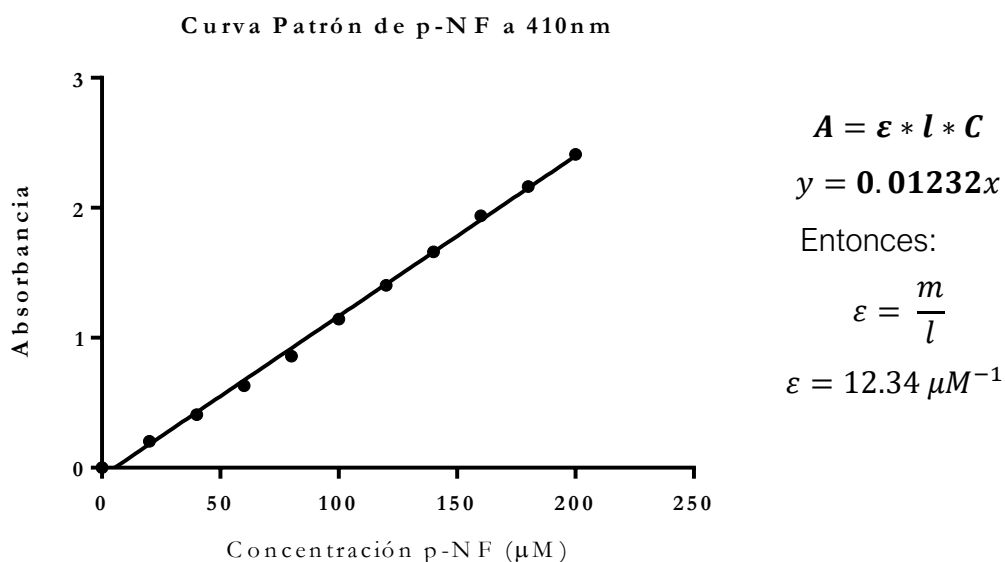


Figura 30. A) Curva patrón de p-NF a 410 nm.

El valor de la pendiente dividido entre el volumen del experimento (1 mL) y multiplicado por la longitud del paso de luz de la celda (1 cm) nos dará el coeficiente de absortividad molar (ϵ), que al relacionarlo con las velocidades iniciales obtenidas para cada proteína nos permitió calcular la actividad en unidades U $\left[\frac{\mu\text{mol}_{p-NF}}{\text{min}} \right]$.

Tabla 10. Cálculo de unidades (U) de actividad para Q1 y Q2.

| Muestra | \bar{v}_i [$\frac{Abs_{410}}{min}$] | ϵ [$\frac{Abs_{410}}{\mu mol}$] | $U = \frac{\bar{v}_i}{\epsilon}$ [$\frac{\mu mol}{min}$] | U_{p-NP} [$\frac{\mu mol}{min}$] | $U - U_{p-NP} = U'$ [$\frac{\mu mol}{min}$] |
|---------|--|---|---|---|--|
| Q1 | 0.103 | 12.34 | 8.34×10^{-3} | 1.47×10^{-3} | 6.88×10^{-3} |
| Q2 | 0.068 | 12.34 | 5.51×10^{-3} | 1.47×10^{-3} | 4.04×10^{-3} |

Segunda columna, promedio de las v_i obtenidas en los ensayos realizados por triplicado. Tercera columna, absorptividad molar hallado mediante la pendiente de la curva patón. Cuarta columna, unidades de actividad calculadas. Quinta columna, Hidrólisis espontánea de 4-NP. Sexta columna, U' correspondiente a la actividad corregida considerando la hidrólisis espontanea de p-NP.

El cálculo de la actividad específica de la proteína ($\frac{U}{mg_{enz}}$) es útil para evaluar a proteínas que poseen una masa molar muy parecida como es el caso de Q1 y Q2, pese a esto, la enzima BplA está soportada en el arreglo supramolecular de las VLPs que también aportan proteína a la muestra. Para evaluar el efecto de esta “inmovilización” con respecto a la BplA libre, tiene mayor sentido calcular la actividad específica por mol de sitio catalítico. En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos de las actividades específicas, así como la comparación con la actividad enzimática de BplA recombinante libre (Gutiérrez-Landa, 2014). La concentración de las proteínas se obtuvo mediante la técnica del ácido bicinonínico (BCA) utilizando como patrón albumina sérica (BSA).

Con la finalidad de comparar el efecto de la posición del dominio de BplA en la superficie de las VLPs, se promediaron las actividades por mol de sitio catalítico considerando 5 ensayos independientes para cada una de éstas, las cuales fueron obtenidas en lotes y días distintos. Los resultados se especifican en la tabla 12, adicionalmente y con el mismo fin, se efectuó el cociente de la actividad de BplA libre (reportada por Gutiérrez-Landa, 2014) y la obtenida experimentalmente para cada una de las quimeras (tabla 11).

Tabla 11. Actividades específicas de los dominios de BpIA fusionados a las VLPs.

| Muestra | U' $\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}\right]$ | Proteína | Actividad específica $\left[\frac{U'}{\text{mg}}\right]$ | $\frac{U'}{\mu\text{mol}_{\text{sitio catal}}}$ |
|---------|---|----------|--|---|
| BpIA* | 3.760×10^{-3} | 0.0004 | 9.400 | 202.0 ± 0.45 |
| Q1 | 6.88×10^{-3} | 0.03 | 0.229 ± 0.007 | 11.22 ± 0.81 |
| Q2 | 4.04×10^{-3} | 0.03 | 0.135 ± 0.04 | 9.58 ± 0.67 |

Se incluye el resultado del ensayo realizado Gutiérrez-Landa (2014), para la actividad específica de BpIA recombinante libre.

Tabla 12. Comparación de actividades enzimáticas promedio obtenidas para Q1 y Q2

| Muestra | $\left[\frac{U'}{\mu\text{mol}_{\text{sitio catal}}}\right]$ | $\frac{\left[\frac{U'}{\mu\text{mol}_{\text{sitio catal BpIA}}}\right]}{\left[\frac{U'}{\mu\text{mol}_{\text{sitio catal Q1,Q2}}}\right]}$ |
|---------|--|--|
| BpIA* | $202.0 \pm 0.45^*$ | 1 |
| Q1 | 10.75 ± 1.02 | 18.79 |
| Q2 | 8.83 ± 1.16 | 22.88 |

De acuerdo al reporte de Soto-Román (2017) y Segovia-Trinidad (2018), la actividad obtenida para ambas proteínas quiméricas es mucho menor en comparación con la reportada para la BpIA libre (Gutiérrez-Landa, 2014). El cociente de la actividad por mol de sitio catalítico de la enzima (BpIA) libre entre la obtenida para las quimeras 1 y 2 (tabla 13) revela que BpIA libre es entre 18 y 23 veces más activa que en las quimeras. Esta información muestra que existe un efecto en la actividad catalítica de la enzima provocado por su fusión en las VLP de VP2.

Si consideramos que BpIA se halla inmovilizada y el soporte de dicha inmovilización es un monómero de proteína VP2, entonces podemos pensar que nuestro sistema VPL-BpIA funciona de manera análoga a otros sistemas de inmovilización enzimática. Se ha discutido que tras un proceso de este tipo es posible que la actividad de la enzima disminuya a causa de dos factores principales: a) posibles interacciones entre residuos de la superficie del soporte (VLP) y residuos de la enzima involucrados directa o indirectamente con la actividad catalítica; b) disminución en la

movilidad/flexibilidad, que impida que la enzima adopte la configuración adecuada (en el sitio catalítico o en regiones cercanas a él para la entrada o salida del sustrato).

En el caso de Q1 la cual posee a BpIA fusionada en el asa 300-314 de VP2, la actividad de la enzima es 18 veces menor que la enzima libre (a pesar de ser un asa con gran movilidad), esto podría deberse a que al estar sujeta por ambos extremos de su secuencia, la flexibilidad de BpIA se vería comprometida y por ende su capacidad para generar los arreglos necesarios para configurar adecuadamente al sitio activo o bien para que el sustrato entre o salga de dicha región. En Q2 esta condición es diferente, ya que BpIA se encuentra fusionada solo por uno de sus extremos al N-terminal de VP2 quedando libre su extremo carbonilo por lo que, la movilidad de la enzima es mucho mayor y su flexibilidad no se vería tan afectada como en Q1. Esto nos hacía suponer que la actividad de BpIA en Q2 sería mayor que en Q1, sin embargo, los resultados muestran lo contrario, la actividad de la enzima en esta es 1.2 veces menor que en Q1.

Kaufmann y colaboradores reportaron en 2008 la estructura del eje de orden 5, en el que, de acuerdo a la Crio-EM efectuada, se encuentra la escisión o poro por el cual se externalizan los extremos N-terminal de VP2 y de VP1u (en el virión), dicha investigación reveló que, si los 5 extremos de VP2 quedarán en la superficie cerrarían el poro en el interior de la partícula impidiendo la extrusión de la región única de VP1u, la cual se ha demostrado, debe quedar expuesta debido a su función de fosfolipasa, por lo tanto, es muy probable que al menos uno de los extremos N-terminal de VP2 en esta región queden dentro de la partícula. Debido a esto, podemos decir que la actividad de BpIA en los extremos que se encuentren internalizados en las VLP no se ven reflejadas en los resultados, lo cual explica que la actividad medida en las lipasas en Q2 se ligeramente menor que la obtenida en Q1.

Con los datos de actividad obtenidos, no es posible efectuar una comparación real de cómo ésta se ve afectada por efecto de la posición de BpIA en la superficie de VLPs de Q1 y Q2, ya que para el cálculo de actividad por mol de sitio catalítico⁹ efectuado para cada una de ellas, se partió de la siguiente premisa:

“Ya que existen 60 subunidades de VP2 en cada VLP ensamblada y cada una de estas posee a BpIA fusionada, entonces, habrá 60 lipasas en la superficie de cada partícula”.

Lo cual, como fue descrito en párrafos anteriores, no es aplicable para Q2. Por lo tanto, para poder realizar dicha comparación, sería necesario conocer el número de dominios BpIA que quedan expuestos en la superficie de Q2 y por el momento, no contamos con la evidencia necesaria para determinar dicho número, además no es posible inferirlo con los datos obtenidos porque, hasta

⁹ Dato que es el punto de comparación entre ambas quimeras.

ahora, no se sabe si la internalización de los extremos N-terminal de VP2 en las VLPs quiméricas ocurre de forma específica (en la que siempre queden por dentro los mismos extremos) o más bien se trate de un fenómeno aleatorio, que obedezca a efectos estéricos (dependiendo de lo que se encuentre fusionado a este extremo) así como a nuevas interacciones que favorezcan el ensamble de la partícula, por lo tanto, dicho número sería diferente para cada VLP de una muestra.

5.5 Termoestabilidad

La desnaturalización de proteínas produce un cambio menor o mayor en la estructura tridimensional nativa de la proteína, sin alterar la secuencia de aminoácidos (Tanford, 1968; Lapanje, 1978). Este desdoblamiento puede comprometer la estructura del sitio activo, y por lo tanto puede resultar en la inactivación enzimática, que puede ser reversible o irreversible. Para calcular la constante de inactivación se consideró que nuestra enzima solo puede hallarse en dos estados; el nativo con actividad (A) y el desnaturalizado sin actividad (D), y que su inactivación debería obedecer una cinética de reacción de primer orden, donde la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración de la única especie inicial. De ahí es posible utilizar la siguiente ecuación:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_{ie}[A]$$

Donde k_{ie} es la constante cinética de inactivación de la enzima. La integración de la ecuación diferencial anterior nos da como resultado:

$$\ln\left(\frac{A_t}{A_0}\right) = -k_{ie}t$$

En donde A_t es la actividad residual de la enzima en el tiempo t , y A_0 es la actividad inicial de la enzima nativa ($t=0$). El gráfico de $\ln\frac{A_t}{A_0}$ vs tiempo en min de esta curva tendrá como pendiente negativa la constante de velocidad de primer orden, de la inactivación de la enzima (k_{ie}). (Fig.31) La actividad de las enzimas se siguió por 90 min ya que en trabajos anteriores (Mora, 2008) se reportó que a este tiempo y 40 °C BpIA pierde más del 70% de su actividad inicial. Las temperaturas que se evaluaron fueron 20, 25, 30, 35 y 40 °C. Los resultados obtenidos se ajustaron

a la ecuación logarítmica presentada con anterioridad y se graficaron con la ayuda del programa Prism 7.

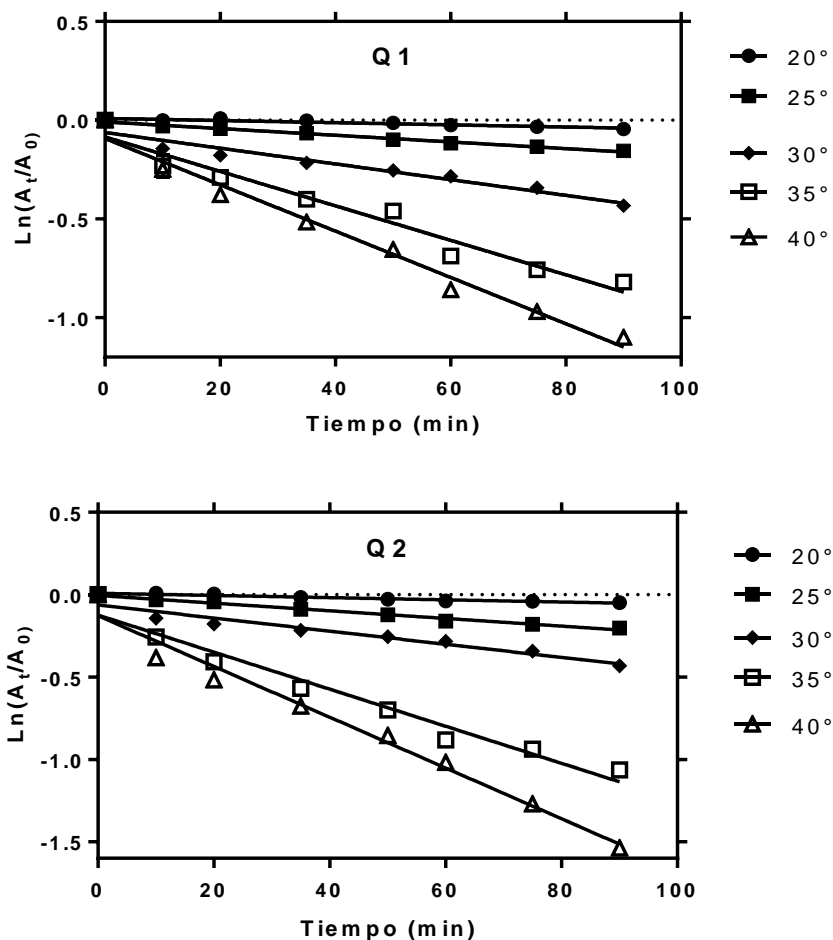


Figura 31. Termoestabilidad de lipasa BplA soportada en VLP's de VP2 a diferentes temperaturas. Las líneas continuas corresponden al ajuste lineal, en donde la pendiente de cada una corresponde a la constante de inactivación térmica k_{ie} en min^{-1} .

Los valores obtenidos para la k_{ie} a 40 °C son 0.012 y 0.014 min^{-1} para las proteínas quiméricas Q1 y Q2 respectivamente que, comparadas con BplA libre (0.089 min^{-1}) son aproximadamente 7.5 veces más lentas. Lo cual evidencia un efecto estabilizador sobre BplA por estar fusionada en la superficie de las VLPs de VP2. Es posible que esto se deba a que al estar unida a cada monómero VP2 se generen nuevas interacciones intermoleculares dentro de la BplA, así como con dichos

monómeros, las cuales provocarían una disminución en la dinámica molecular de la enzima y por ende en su flexibilidad, aumentando las energías de reorganizaciones locales, provocando que se conserve la estructura tridimensional de la enzima en condiciones distintas a las óptimas. Este efecto puede observarse en la inmovilización enzimática (Klibanov, 1984).

Se sabe que la estabilización estructural de una enzima, puede ocurrir al disminuir la tasa de desarreglos conformacionales, aumentando el número de interacciones intermoleculares en ciertas regiones de dicha proteína (Klibanov, 1985), por lo que, al inmovilizarla en un soporte adecuado, sería posible favorecer y propiciar interacciones que generen un aumento en la estabilidad térmica en dicha enzima.

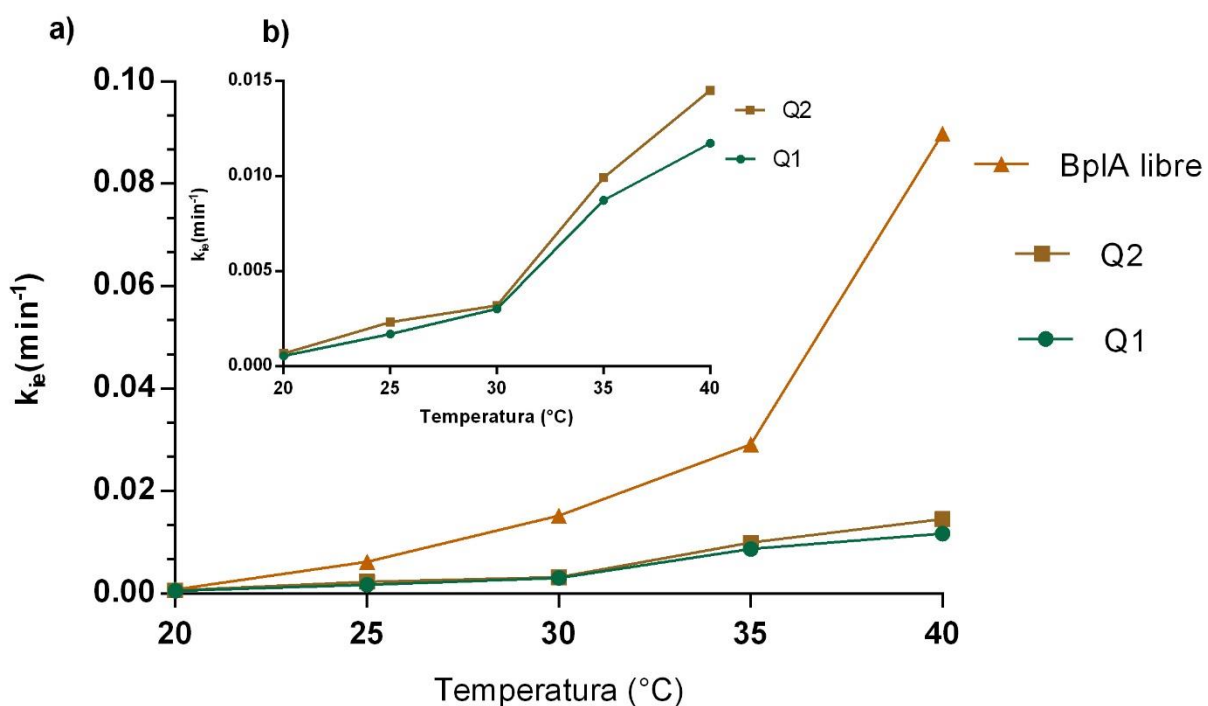


Figura 32. Gráfico de las constantes de inactivación térmica de (k_{ie}). a) Comparación entre las reportadas para enzima BpIA libre y la obtenida para las presentes en VLPs quiméricas Q1 y Q2. b) Comparación de las constantes (k_{ie}) de las quimeras.

De acuerdo a la forma en la que BpIA está soportada en cada una de las VLPs quiméricas, esperaríamos que la K_{ie} de la enzima en Q1 fuera considerablemente menor que en Q2, como consecuencia de una menor movilidad/flexibilidad que se debe a que ésta se encuentra unida por ambos extremos de su secuencia en el asa 300-314 de VP2, mientras que en Q2 está fusionada únicamente por su extremo C-terminal al extremo amino de VP2.

Sin embargo, en el gráfico b de la figura 32 se puede apreciar que la diferencia entre ambas (Q1 y Q2) es mínima y poco significativa, lo que nos hace pensar que la estabilización de BplA producida por la unión a VLPs de VP2 no está determinada por la región en la que ésta se encuentre unida, sino por las interacciones globales (además de la unión con VP2) que se generan dentro y fuera de ella, limitando su flexibilidad general y como consecuencia su estabilidad (Zavosky, *et al.*, 1998, Voutilainen, *et al.*, 2010). Tales interacciones parecen ser equivalentes por la manera en la que influyen en el proceso de inactivación térmica en cada quimera.

Tabla 13. Resumen comparativo de parámetros de estabilidad para la lipasa de BplA en las VLPs quiméricas y de BplA libre* (datos recolectados de Mora, 2008) a diferentes temperaturas.

| T(°C) | k_{ie} ($\times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$) | | | $t_{1/2}$ (min) | | |
|-------|--|------------|-------------|-----------------|------------|-------------|
| | BplA en Q1 | BplA en Q2 | BplA libre* | BplA en Q1 | BplA en Q2 | BplA libre* |
| 20 | 0.54 | 0.62 | 0.76 | 12836.0 | 11179.8 | 9120.4 |
| 25 | 16.91 | 23.42 | 61.74 | 410.1 | 298.5 | 112.3 |
| 30 | 30.20 | 31.92 | 152.50 | 229.5 | 217.2 | 45.5 |
| 35 | 87.27 | 99.24 | 291.40 | 79.4 | 69.9 | 23.8 |
| 40 | 117.3 | 145.2 | 898.10 | 59.1 | 45.6 | 7.7 |

En general, podemos decir que a partir de los 25 °C, BplA en ambas construcciones de VLPs es significativamente más estable que en la enzima libre de acuerdo con los datos reportados por Mora (2008), hecho que también se ve que se ve reflejado en la vida media obtenida para cada quimera (tabla 14) y que fue calculada a partir de la ecuación; $t_{1/2} = \text{Ln}(2)/k_{ie}$.

Con todo lo anterior, podemos concluir que las nuevas interacciones que se producen entre enzima y su soporte VLP, así como las que se generan dentro de BplA, disminuyen su flexibilidad y eliminan factores desestabilizantes que provocan un aumento en su energía de plegamiento, dándole mayor estabilidad, retardando su desnaturalización y por ende la pérdida de actividad (Lonhienne *et al.*, 2000; Kumar, 2001). Pero a la vez, todos estos cambios producidos en la enzima, disminuyen la posibilidad de que se generen los rearrreglos conformacionales adecuados, tanto, del sitio activo como de regiones cruciales para la catálisis, provocando una importante disminución en la actividad catalítica de la enzima (Garza-Ramos, *et al.*, 1990, D'amico, *et al.*, 2003).

5.5 Estabilidad de VLPs de proteína quiméricas y de VP2 en medios no convencionales

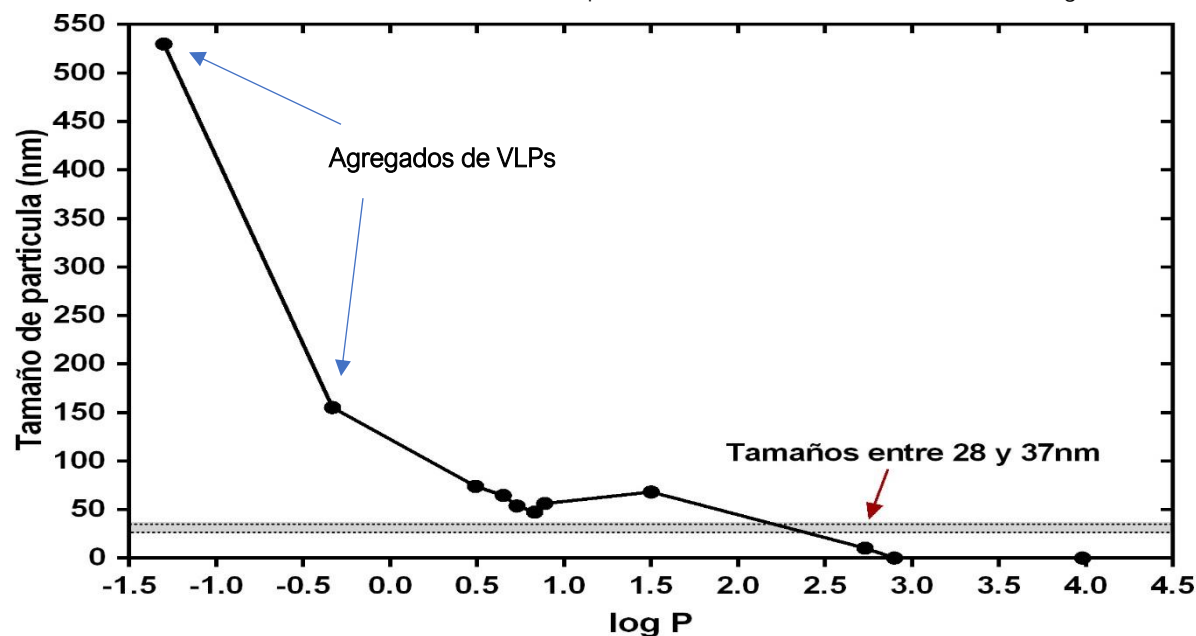
En los antecedentes de este trabajo se mencionó el potencial de las VLPs como acarreadores enzimáticos, no solo en el campo de la medicina y farmacia, sino también en el área de la catálisis, ya que estos podrían ser sistemas de inmovilización de enzimas. Debido a que la enzima soportada en nuestras VLPs es la lipasa A de *Bacillus pumilus*, la cual ha sido previamente estudiada en nuestro grupo de trabajo y ha presentado cualidades catalíticas en medios no acuosos, se decidió probar la estabilidad de dicha enzima y de las VLPs que las soportan en distintos medios.

Una vez caracterizadas, las VLPs quiméricas se prepararon para los experimentos de estabilidad, los cuales fueron monitoreados mediante dispersión dinámica de luz para poder observar el tamaño de las partículas, sin embargo, a pesar de los intentos y diversas metodologías utilizadas para preparar las muestras, no fue posible estabilizar a las partículas en ningún medio diferente al agua, lo cual, fue corroborado al observar partículas de tamaños tales que podrían corresponder a agregados de VLPs quiméricas (en el caso de los medios orgánicos más polares) o inclusive la posible desnaturalización de las proteínas en los medios menos polares (tabla 15).

Para los experimentos de VLPs de VP2 en líquidos iónicos se observa algo similar, la formación de agregados o la posible desnaturalización de las proteínas en tamaños de entre 50-65 nm (tabla 16). En 2012 Sánchez-Rodríguez y colaboradores reportaron estos tamaños en un experimento de desnaturalización de VP2.

Cabe mencionar que no se probaron mezclas binarias (agua-disolvente orgánico o agua-líquidos iónicos) ya que el interés inicial era realizar reacciones de esterificación de ácidos grasos de cadena corta, así como probar la enantioselectividad de la lipasa A de *B. pumillus* en la reacción con (*R,S*)-1-feniletanol con ácido hexanoico y así ser comparada con los resultados reportados por Bustos-Jaimes y colaboradores en 2013.

Tabla 14. Resumen de pruebas de estabilidad de partículas de las proteínas quiméricas Q1 y Q2. Tamaños de partículas obtenidas por Dispersión Dinámica de Luz en los medios orgánicos



| Disolvente | log P | Tamaño (nm) |
|-------------------|-------|-------------|
| DMSO | -1.30 | 530.0 |
| Acetonitrilo | -0.33 | 155.3 |
| THF | 0.49 | 74.1 |
| Piridina | 0.65 | 64.8 |
| Acetato de etilo | 0,73 | 53.9 |
| Éter etílico | 0.83 | 47.6 |
| Acetato de butilo | 0.89 | 56.4 |
| Diclorometano | 1.50 | 68.2 |
| Tolueno | 2.73 | 10.5 |
| Xileno | 2.90 | — |
| Hexano | 3.98 | — |

Tabla 15. Resumen de pruebas de estabilidad de partículas de VP2. Tamaños de partículas obtenidas por Dispersión Dinámica de Luz en distintos líquidos iónicos.

| LÍQUIDOS IÓNICOS | Miscibilidad en agua del disolvente | Diámetro de partículas (nm) |
|--|-------------------------------------|-----------------------------|
| Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio [BMIM]+[BF4]- | miscible | 64.7 |
| Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio [BMIM]+[PF6]- | inmiscible | 53.3 |
| Metanosulfonato de 1-etil-3-metilimidazolio [EMIM]+[metSO3]- | inmiscible | 48.4 |
| Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio [EMIM]+[etSO4]- | miscible | 176.2 |

Las VLPs son estructuras derivadas del autoensamble supramolecular en medio acuoso, que para poder mantenerse en su estado oligomérico de 60 subunidades (20 trímeros) en forma de cápside icosaédrica es necesario que todas las interacciones no covalentes que generan la estructura se conserven, además de las que puedan formarse con el agua.

Desde este punto se presentaron dos problemas, el primero fue al momento de eliminar el agua de los ensambles de VLPs, ya que lo único que provocó esta acción, fue la agregación de las partículas y no fue posible evitar que esto sucediera. Por lo tanto, el experimento estuvo sesgado al hecho de siempre partir de agregados secos y no de las partículas independientes.

El segundo problema fue al momento de agregar los disolventes, ya que como mencioné las VLPs son estructuras formadas gracias a interacciones no covalentes que dependen en gran medida del medio, al estar inmersas en medios no acuosos, la polaridad del medio, la fuerza iónica y la posibilidad de que los residuos expuestos formaran otro tipo de interacciones con el medio imposibilitó la estabilización de las VLPs en ellos.

5.6 Pruebas de hidrólisis de ésteres de colesterol por los dominios de BpIA acarreados en VLPs.

Los resultados de estabilidad de las VLPs en disolventes orgánicos no fueron lo que esperábamos. Sin embargo, las aplicaciones biocatalíticas de las VLPs con dominios de lipasa en la superficie no se limitan a los disolventes orgánicos. Como se mencionó anteriormente, existen casos en los que la falta de una actividad enzimática provoca una enfermedad. Tal es el caso de la lipasa ácida lisosomal; esta enzima hidroliza triglicéridos y ésteres de colesterol. Su ausencia produce Déficit de Lipasa Ácida Lisosomal (LAL-D), una enfermedad de depósito lisosomal autosómica recesiva en la que ocurre una acumulación sistémica de ésteres de colesterol y triglicéridos en el lisosoma celular. Las VLPs entran de manera natural al sistema lisosomal de algunas células. Al estar recubiertas con estos dominios de lipasa, sería posible que tuvieran una aplicación en el tratamiento de esta enfermedad. Se sabe que la BpIA es capaz de hidrolizar triglicéridos (Alcántara, 2009). Sin embargo, no se ha descrito su potencial para hidrolizar ésteres de colesterol.

Para evidenciar la actividad de colesterol esterasa, primero se desarrolló un método para detectar los productos de reacción por cromatografía en capa fina (TLC). Se saponificó un éster de colesterol modelo, el colesteril heptanoato y los productos se analizaron por TLC. La placa se reveló con I2 y se observó bajo luz UV (Fig. 33). Es claro que la hidrólisis del éster no fue completa, como ya ha sido reportado por Hansen y Wang en 2015.

De acuerdo con la naturaleza de la fase móvil se esperaba que el ácido heptanóico fuera el que corriera menos en la placa, mientras que el éster al ser el compuesto menos polar fuera el más alejado al punto de aplicación, quedando el colesterol en medio de estos dos, tal cual puede ser observado en la placa cromatográfica.

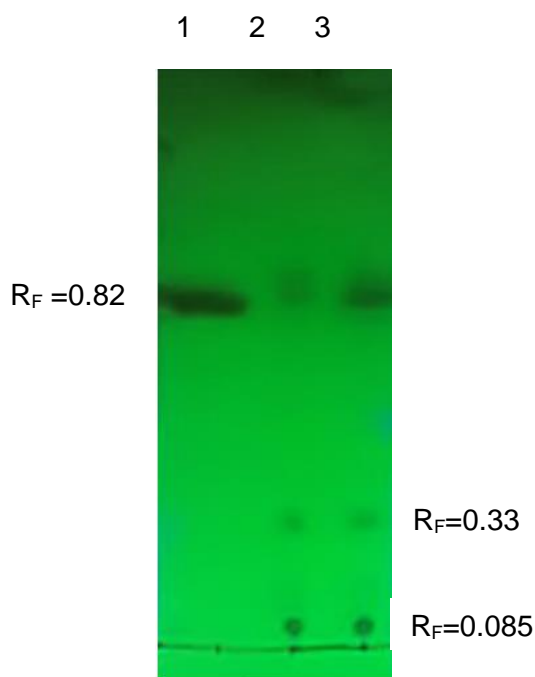


Figura 33. Avance los distintos lípidos en la fase estacionaria. Carril 1, colesteril heptanoato; carriles 2 y 3, productos de la saponificación del colesteril heptanoato (ácido heptanóico, colesterol y colesteril heptanoato sin reaccionar).

En cuanto a la hidrólisis con las VLPs construidas con las proteínas Q1 y Q2, los resultados obtenidos por TLC son mostrados en la figura 34. Como control positivo se utilizó el estándar de colesterol, como controles negativos el estándar del sustrato además la enzima en PBS y la mezcla de reacción antes de iniciar la reacción.

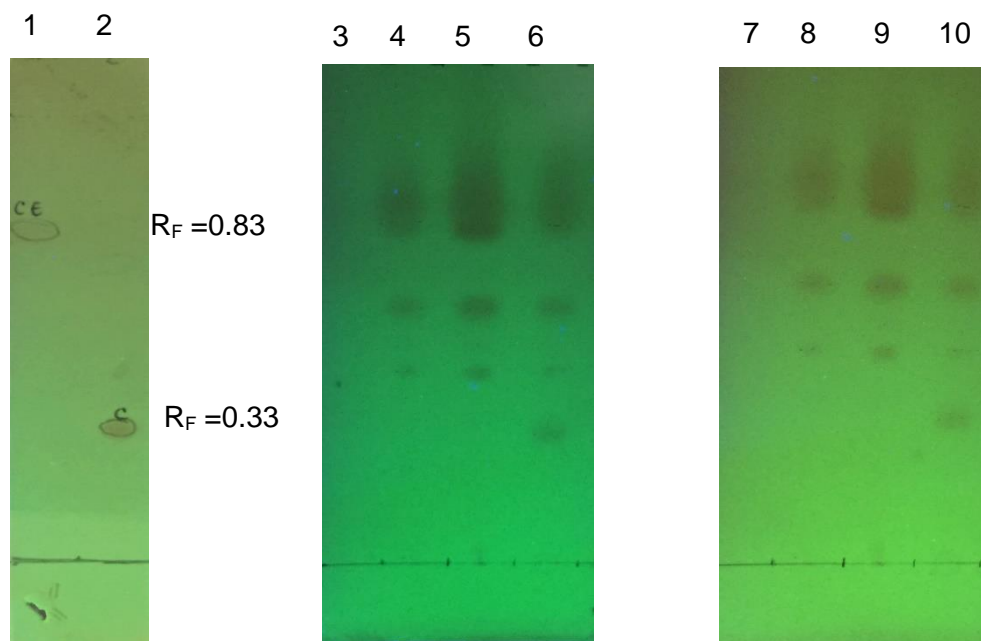


Figura 34. Avance de los distintos lípidos en la fase estacionaria, así como sus tiempos de retención. a)

Carril 1, colesteril heptanoato; carril 2, colesterol; carril 3, VLPs de Q1 en PBS; carril 4, colesteril heptanoato en PBS; carril 5, mezcla de reacción al inicio (VLPs de Q1+ colesteril heptanoato en PBS); carril 6, mezcla de reacción (VLPs de Q1+ colesteril heptanoato en PBS) después de 6 h a 30 °C y 300 rpm; carril 7, VLPs de Q2 en PBS; carril 8, colesteril heptanoato en PBS; carril 9, mezcla de reacción al inicio (VLPs de Q2+ colesteril heptanoato en PBS); carril 10, mezcla de reacción (VLPs de Q2+ colesteril heptanoato en PBS) después de 6 h a 30 °C y 300 rpm.

Es claro que ocurre la reacción de hidrólisis del colesteril heptanoato, ya que aparece la marca correspondiente al colesterol, con un R_f característico de 0.33 (Fig. 34, carriles 6 y 10). Con estos resultados, decidimos realizar otro experimento para ver si la enzima consumía todo el sustrato, dejando la reacción durante 24 y 48 h (Fig. 35). Sin embargo, el análisis por TLC muestra que no se consume todo el sustrato, debido muy probablemente a que a este tiempo la enzima ya haya sufrido inactivación térmica. Otra razón podría ser que el propio colesterol se comporte como inhibidor competitivo de la enzima. Este es un tema interesante que se podría estudiar en otro momento.

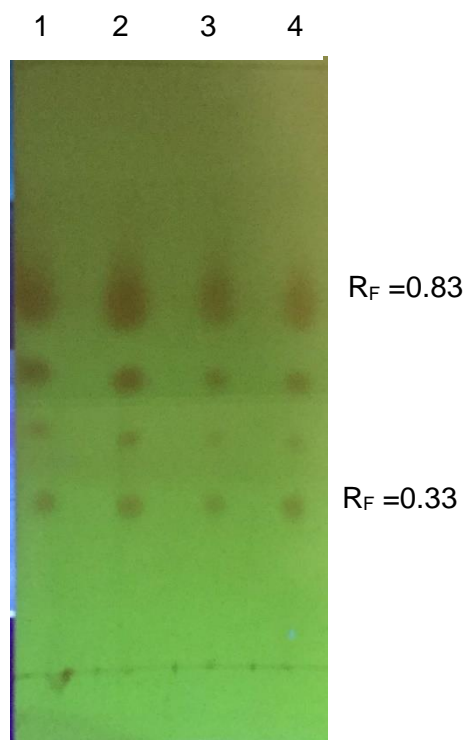


Figura 35. Placa de reacciones a 30 °C durante 24 y 48 h para ambas quimeras. Carriles 1 y 2 corresponden a las reacciones de la Q1 (24 y 48 h respectivamente). Carriles 3 y 4, reacciones de 24 y 48 h para la Q2.

Posteriormente se efectuaron las pruebas para la misma reacción, pero ahora a pH 5, acercándonos con esto a las condiciones en las que estaría la enzima acarreada por las VLPs dentro del lisosoma. Para estos experimentos, se utilizó amortiguador de citratos a pH 5, por lo que se efectuaron cambios de amortiguador a ambas proteínas ya ensambladas. Para evitar agregación de las VLPs el cambio se realizó en centricones. De ahí se tomaron alícuotas de 250 μ L que fueron colocadas en tubos eppendorf de 1.5 mL y, siguiendo el mismo protocolo de la reacción a pH 7 descrito en la sección anterior, se dejó incubando por 12 y 24 h (Fig. 36).

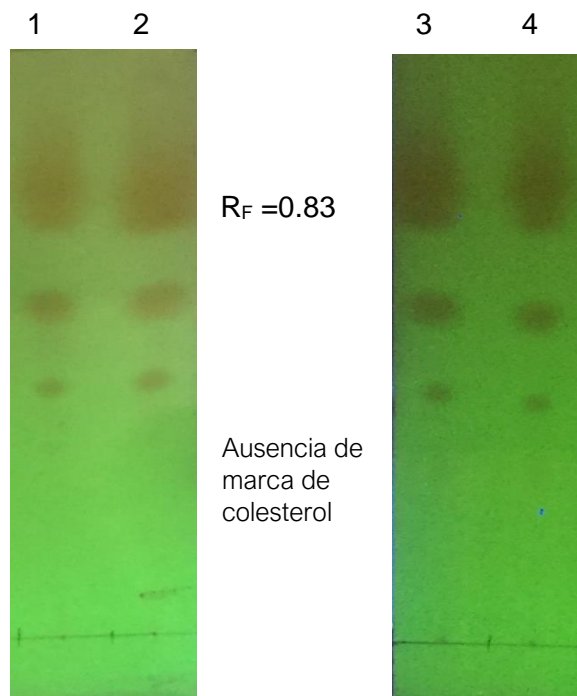


Figura 36. Placas de reacciones a 30 °C y pH 5, durante 12 y 24 h para ambas quimeras. A) Carriles 1 y 2 corresponden a las reacciones de la Q1 a 12 y 24 h respectivamente. B) Carriles 3 y 4, reacciones a las 12 y 24 h para la Q2.

Desafortunadamente no se detectó la aparición de colesterol libre, lo que implica que la reacción no ocurrió. Sabemos perfectamente que el efecto del pH sobre la actividad catalítica de las enzimas puede ser crítico. En trabajos anteriores (Alcántara, 2009), se reportaron reacciones de hidrólisis con la BpIA libre a pH=5.5 pero con muy baja eficiencia. Sin embargo, dichas reacciones se efectuaron a 20 °C,, temperatura de mayor estabilidad, de esta manera evitaron que la enzima se desnaturalizara por efecto térmico y solo se pudiese ver el efecto del pH. En este experimento se trabajó fuera de la temperatura óptima, recordando que a esta temperatura (30 °C) la kie de la BpIA en los ensamblados es 4.5 veces más lenta que la BpIA libre. Además, sumado al hecho de que a valores de pH menores a 5.5 la BpIA es menos activa, la estabilidad de las cápsidas también podría disminuir. En conjunto, las interacciones que existen entre la enzima y las cápsidas se ven modificadas por efecto del pH, por lo que, es muy probable que al combinar estas dos condiciones la enzima se haya desnaturalizado desde que comenzó el calentamiento o simplemente llegó a un estado en el que su actividad es imperceptible.

5.7 Cuantificación de colesterol producido en la reacción enzimática de BplA con colesteril heptanoato mediante RP-HPLC.

Con la finalidad de cuantificar la concentración de colesteril heptanoato producido durante la reacción catalítica a pH 7.4, se estandarizó un protocolo para la detección de los estándares tanto del sustrato como del producto de reacción. En la literatura se pueden encontrar diversos protocolos para la cuantificación de colesterol y sus derivados mediante HPLC, coincidiendo la mayoría, en efectuarse en fase reversa (RP) debido a la naturaleza no polar de los componentes de la muestra. En estos métodos, los componentes de la fase móvil son generalmente mezclas binarias o ternarias entre 2-propanol, acetonitrilo, metanol, agua y en algunos casos hexano.

De tal suerte que para nuestros experimentos se utilizó la cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) y una fase móvil 50:50 acetonitrilo:2-propanol. La adición de hexano a las muestras fue necesario para solubilizar tanto al colesterol como al éster y hacerlos miscibles con los disolventes de la fase móvil.

La detección de los estándares fue exitosa y se observaron picos definidos para cada una de las muestras (Fig. 37). Para el colesterol, el tiempo de retención es de 2.921 min, mientras que para el éster fue de 3.176 min. Este incremento en el tiempo de elución se debe a que el éster de colesterol tiene una cadena adicional de 7 carbonos, lo que lo hace más a fin a la fase estacionaria.

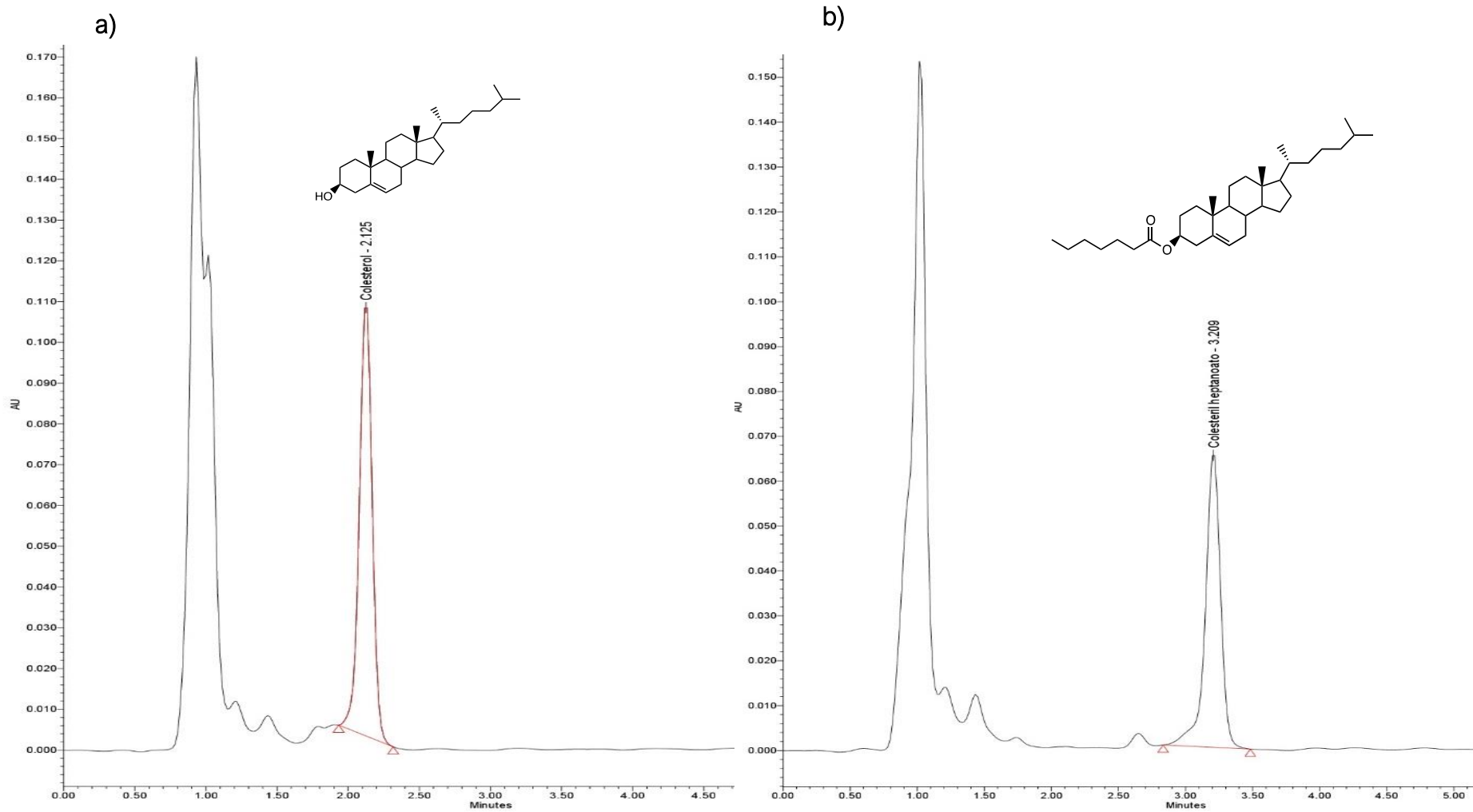


Figura 37. Cromatogramas obtenidos en la detección de estándares; a) colesterol 1 mM, b) colesterol heptanoato 1mM .

5.8.1. Curva de calibración para la cuantificación de colesterol.

Se realizó una curva de patrón (estándar externo) para determinar la concentración del colesterol en la muestra. Esta curva comprendió valores de concentración de 0.1 a 1.0 mM. La metodología de preparación de muestras fue la misma que la seguida en la sección anterior, solo que ahora se prepararon 5 concentraciones diferentes: 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mM. Cada inyección se realizó por triplicado, las condiciones de las corridas fueron idénticas a las de la detección de estándares. En la tabla 17 y figura 38, se muestran los promedios obtenidos del área bajo la curva, para cada concentración, así como la curva patrón para la cuantificación de colesterol.

| [colesterol] mM | Área promedio ($\mu\text{V}/\text{seg}$) |
|--------------------|---|
| 0.1 | 42477.000 \pm 6.703 |
| 0.25 | 137794.000 \pm 5.000 |
| 0.50 | 311544.300 \pm 5.686 |
| 0.75 | 479353.300 \pm 6.806 |
| 1 | 667930.800 \pm 10.535 |

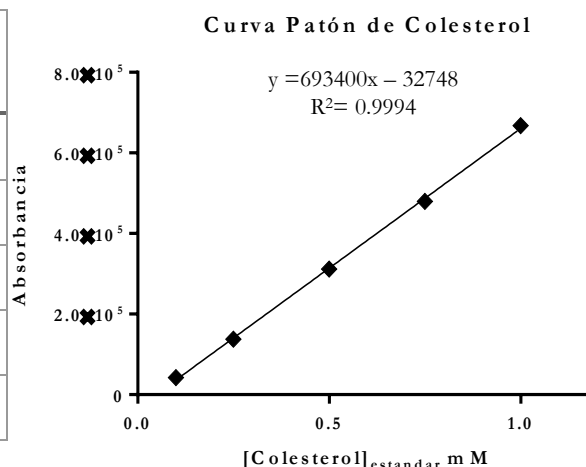


Tabla 16. Datos para curva patrón para colesterol, las mediciones se realizaron por triplicado

Figura 38. Curva de patrón de estándar interno para la determinación cuantitativa de colesterol.

Con esta información se realizó la cuantificación por triplicado del analito proveniente de la reacción enzimática efectuada por BpIA en cada una de las quimeras. Para lo cual se efectuó el protocolo de extracción de lípidos con cloroformo. Las muestras extraídas fueron preparadas para la inyección como se describe en el capítulo 4, se filtraron por un cartucho de corte 0.22 μm y colocadas en viales de 1 mL para su inyección en cromatógrafo.

En la figura 39 se muestra un cromatograma característico para la determinación de colesterol en la muestra, en el cual se observan los tiempos de retención tanto del analito como del éster de colesterol que queda sin reaccionar. Las concentraciones obtenidas de colesterol en las reacciones

catalizadas por ambas quimeras a tiempos de reacción de 24 y 48 h se calcularon en función del área bajo la curva obtenida en los cromatogramas y su interpolación en la curva patrón obtenida de los estándares de colesterol, cuya ecuación se muestra en la figura 38, en donde, x corresponde a la concentración de colesterol.

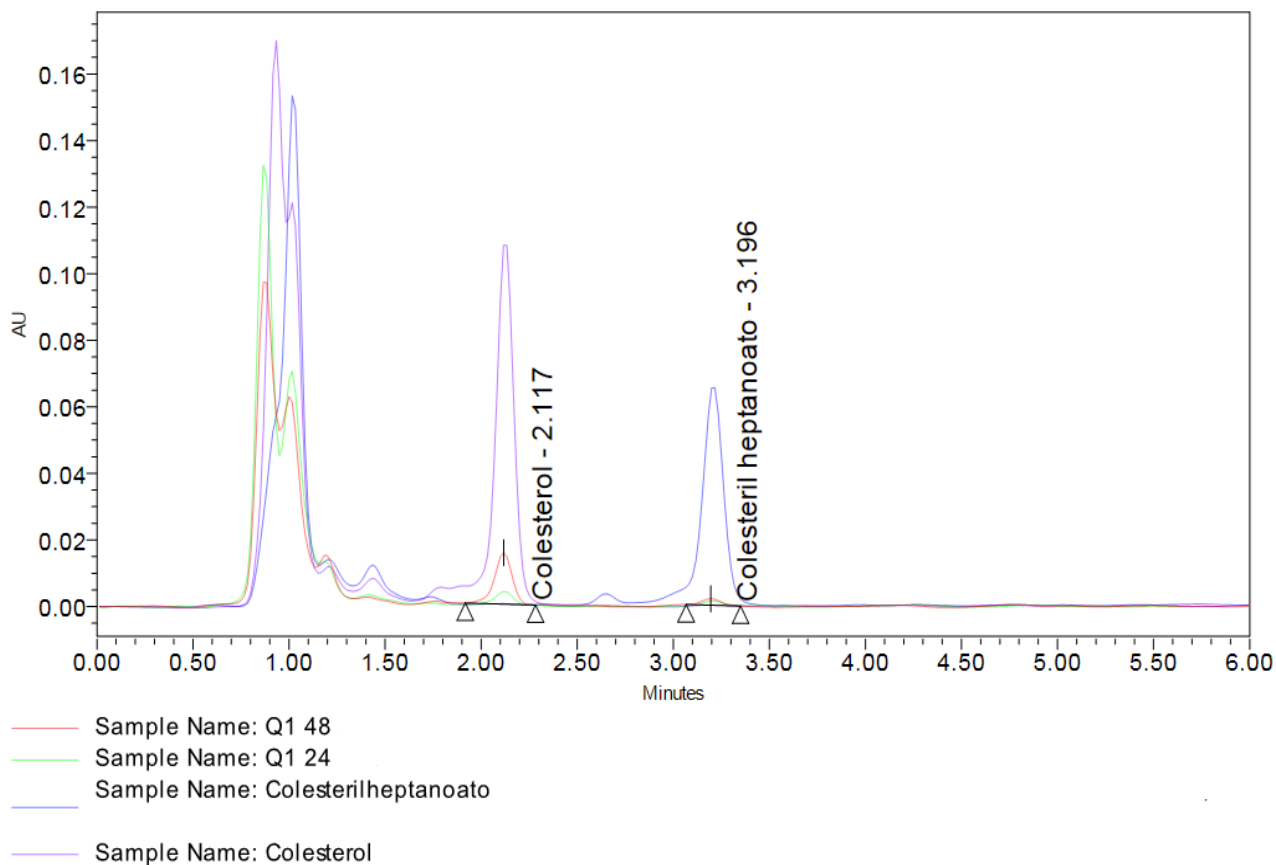


Figura 39. Cromatograma característico de la detección de los productos de la reacción de hidrólisis diluidos al 50% sobrelapado al de los estándares en concentración 1mM.

Una vez calculada la concentración correspondiente al valor del área bajo la curva, se efectuaron los ajustes a dicha concentración debido a la dilución 1:2 efectuada al preparar las muestras para el cromatógrafo. En tabla 17 se presenta un resumen de los resultados obtenidos, incluyendo el rendimiento en porcentaje para cada una de las quimeras en las condiciones de temperatura a las cuales se trabajó.

Lo que se puede observar en este experimento es que, una vez más, la diferencia entre la cantidad de sustrato que hidroliza el dominio de BplA acarreado en la superficie de las VLPs de Q1 y Q2 no es muy significativa. No obstante, Q1 posee mayor capacidad de hidrolizar al colesterol heptanoato, lo cual puede deberse muy probablemente a que para ésta se sabe que las 60 copias de BplA se encuentran en la superficie de los nanoacarreadores, mientras que es posible que para Q2 algunas de sus 60 copias no se hallen en la superficie, si no internalizadas en las VLPs.

Tabla 17. Resumen de resultados obtenidos en los experimentos de cuantificación de colesterol producido en las reacciones hidrolíticas efectuadas por BplA con colesterol heptanoato como sustrato.

| | Tiempo de reacción (h) | Área promedio ($\mu\text{V}/\text{seg}$) | [<i>Colesterol</i>] _{prod} (mM) | Ajuste de concentración por dilución (mM) | Rendimiento de reacción (%) |
|----|------------------------|--|--|---|-----------------------------|
| Q1 | 24 | 39748.67 \pm 15.37 | 0.109 | 0.218 | 21.8% |
| | 48 | 109867.70 \pm 12.50 | 0.206 | 0.412 | 41.2% |
| Q2 | 24 | 30793.33 \pm 8.74 | 0.092 | 0.184 | 18.4% |
| | 48 | 101760.00 \pm 13.15 | 0.194 | 0.388 | 38.8% |

Debido a que no se realizaron experimentos de actividades de BplA libre para este sustrato, no hay un valor que nos permita conocer hasta este momento la actividad de BplA sobre colesterol heptanoato. Si bien estos dominios de BplA podrían no ser muy activos in vivo, nuestros experimentos sugieren que un tamizado de lipasas/esterasas presentadas en VLPs de B19V podrían ser de alto valor terapéutico en las terapias de remplazo enzimático. La lipasa A de *Bacillus pumilus*, funcionó como enzima modelo, a la cual se le observaron nuevas cualidades, tales como hidrolizar un éster de colesterol de cadena mediana con rendimientos respetables en condiciones celulares, pero resulta ser un modelo poco útil para las condiciones necesarias dentro de los lisosomas, a donde se desea hacer llegar la enzima que sustituya la función de LAL (Lipasa Ácida Lisosomal).

El tratamiento con Sebelipasa (LAL recombinante) ha sido exitoso en la mayoría de los casos de deficiencia de lipasa ácida lisosomal de inicio tardío, los cuales han mostrado reducciones de hasta el 52% y 40% en los niveles de LDL-C y triglicéridos, respectivamente, y una mejora media del 37% en la HDL-C. Sin embargo, estos avances se han conseguido en pacientes adultos, a los cuales se les ha suministrado al menos 250 infusiones intravenosas (1 o 3 mg/kg, dependiendo la respuesta)

cada dos semanas, además de agentes hipolipidimiantes. Así pues, la búsqueda de nuevos sistemas para transportar a las enzimas sustitutivas e inclusive enzimas más eficientes puede mejorar dicho tratamiento. Utilizar sistemas de VLPs de VP2 que pueden acarrear en su superficie hasta 60 copias de la enzima deseada, podría resultar en un tratamiento con dosis más bajas o más espaciadas, además de encapsular en la misma VLP si así se deseara a los agentes hipolipidimiantes, generando un sistema completo para el tratamiento de la deficiencia de lipasa ácida lisosomal temprana y tardía.

Capítulo 6. CONCLUSIONES

1. Debido al tamaño de las proteínas recombinantes, se observó que la eficiencia de la etiqueta de Histidinas en la unión a la resina, durante la purificación por cromatografía de afinidad a Ni^{2+} en condiciones desnaturalizantes, es menor que la de la VP2, siendo Q2 la menos a fin, ya que es la de mayor tamaño y a pesar de que la diferencia con Q1 es de 7 KDa, en proteínas tan grandes como estas, una diferencia como esta es suficiente para generar mayor impedimento estérico al momento de la unión a la resina. Q2 puede ser purificada en una elución con golpes de imidazol entre 10 y 150 mM, mientras que Q1 con concentraciones entre 50 y 300 mM.
2. Es posible obtener partículas tipo virus (VLPs) de las proteínas quiméricas Q1 y Q2 *in-vitro*, lo cual corrobora que fusionar la proteína BpIA en el asa 300-3014 (Q1) y en el extremo amino terminal de la proteína VP2 a través de ingeniería genética, no impide la formación de las VLPs.
3. La actividad hidrolítica contra p-nitrofenilacetato de BpIA acarreada en las VLPs quiméricas, es de 12 a 20 veces menor que aquella de la enzima libre. El origen de este efecto posiblemente radica en los cambios dinámicos del dominio de BpIA al estar fusionado al resto de la proteína. La diferencia de actividad de BpIA por mol de sitio catalítico en las VLPs de Q1 y Q2 es poco significativa para poder concluir como afecta la posición de ésta es en la superficie a la actividad. Sin embargo, es muy probable que en el caso de las VLPs de Q2 algunos de los extremos amino terminal en los que se encuentra fusionada se hallen internalizados.
4. El estudio de estabilidad térmica para las proteínas quiméricas demostró que, el hecho de que la lipasa se halle unida en la superficie de las VLPs le confiere mayor estabilidad, disminuyendo el valor de la constante cinética de inactivación térmica k_{ie} .
5. La estabilidad de las VLPs estudiadas es pobre en todos los disolventes probados. Es posible que la estabilidad depende de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas formadas durante el proceso de autoensamble, desde la asociación de monómeros de VP2 para formar trímeros (capsómeros), hasta la estructura supramolecular de 20 capsómeros. Estas interacciones seguramente son posibles gracias al medio en el que fueron ensambladas.
6. BpIA soportada en VLPs de VP2 es activa en la hidrólisis de colesteril heptanoato a 30 °C y pH 7, liberando colesterol y ácido heptanoico. Sin embargo, a la misma temperatura, pero a pH=5 la enzima no presenta actividad.

Bibliografía

- Ahern, T.J. y Klivanov, A.M. (1985). The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100°C. . *Science*, 228, 1280-1284.
- Alcántara, M. (2009). “*Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica de Bacillus pumilus aislado de un producto lácteo tradicional mexicano*”. Tesis de Maestría UNAM.
- Berg K, Folini M, Prasmickaite L, Selbo PK, Bonsted A, Engesaeter BØ, Zaffaroni N, Weyergang A, Dietze A, Maelandsmo GM, Wagner E, Norum OJ, Høgset A. (2007). “Photochemical internalization: a new tool for drug delivery” *Pharmaceutical Biotechno. Pharmaceutical Biotechnology.*, 8 (6), 362-372.
- Bernstein D. Hülkova, H. Bialer, M. Desnick, R. (2013). Cholesteryl ester storage disease: Review of the findings in 135 reported patients with an underdiagnosed disease. *J Hepatol*, 58;1230-1243.
- Burton B.K, Balwani M, Feillet F. (2015). A phase 3 trial of sebelipase alfa in lysosomal acid lipase deficiency. *N Engl J Med*, 73:1010-1020.
- Bustos-Jaimes I, García-Torres Y, Santillán-Uribe H.C, Montiel C. . (2013). Immobilization and enantioselectivity of Bacillus pumilus lipase in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* , (89) 137-141.
- Bustos-Jaimes I, Hummel W, Eggert T, Bogo E, Puls M, Weckbecker A, Jaeger K.E. (2009). A high-throughput-screening method for chiral alcohols and its application to determine enantioselectivity of lipases and esterases. *ChemCatChem*, 1 (4); 445-448.
- Bustos-Jaimes, I., Soto-Román, RA., Gutiérrez-Landa, A., Valadez-García, J., Segovia-Trinidad, CL. (2017). Construction of protein-functionalized virus-like particles of parvovirus B19. *J Biotechnol.*, 263: 55-63.
- Caster J.M., Patel A.N., Zhang T., Wang A. (2017). Investigational nanomedicines in 2016: a review of nanotherapeutics currently undergoing clinical trials. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed.Nanobiotechnol.*, 9(1), doi:10.1002/wnan.1416.
- Cayetano-Cruz, M., Coffeen, C.F., Valadez-García, J., Montiel, C., Bustos-Jaimes, I. . (2018). Decoration of virus-like particles with an enzymatic activity of biomedical interest. . *Virus Res.*, 255, 1-9.
- Chun-Ju C, Wan-Sheung L, Chien-Chen Lai , Yi-Hung Liu , Shie-Ming Peng , Ito Chao, Sheng-Hsien Chiu. (2009). A Molecular Cage-Based [2]Rotaxane That Behaves as a Molecular Muscle. *Org. Lett.* 11 (2),, pp 385-388.

- Comellas-Aragonès M, Engelkamp H, Claessen VI, et al. (2007). A virus-based single-enzyme nanoreactor. *Nat Nanotechnol.*, 2(10):635–639.
- D'Amico, S., Marx, JC., Gerday, C y Feller, G. (2003). Activity-Stability Relationships in Extremophilic Enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 7891-7896.
- Daniel N. Tran y Kenneth J. Balkus. (Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes). 2011 . *ACS Catalysis*, 1 (8), 956-968.
- Ding, X. Liu, D. Booth, G. , Gao, W. and Lu, Y. (2018). Virus-Like Particle Engineering: From Rational Design to Versatile Applications. *Biotechnol. J.*, 13(5):1700324.
- Duglas T., Y. M. (2006). Virus: Making friends with old foes. *Science*, 312(5775): 873-875.
- E. Papaleo, L. Riccardi, P. Fantucci, C. Villa, and L. D. Gioia. (2006). Flexibility and enzymatic cold-adaptation: a comparative molecular dynamics investigation of the elastase family. *Biochimica Biophys Acta*, 1764, pp. 1397–1406.
- Faber, K. (2004). *Biotransformations in Organic Chemistry, 5th ed.* Berlin Heidelberg: New York: Springer Verlag.
- Fuchs B.S., Teuber R., Eibisch K., Schiller M. (2011). Lipid analysis by thin-layer chromatography--a review of the current state. *Journal of chromatography.*, 2754-2774.
- Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou M. y Gómez-Puyou, A. (1990). Enzyme catalysis in organic solvents with low water content at high temperatures. The adenosinetriphosphatase of submitochondrial particles. *Biochem.*, 29, 751-758.
- Gilbert, L., Toivola, J., White, D., Ihalaainen, T., Smith, W., Lindholm, L., Vuento, M., Oker-Blom, C., (2005). Molecular and structural characterization of fluorescent human parvovirus B19 virus-like particles. 331, 527-531.
- Goldstein, L.L. , Dana, J.R. Faust, A.L. Beudet , Brown, M.S. (1975). Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. Observations in cultured fibroblasts from a patient with cholesteryl ester storage disease. *J Biol Chem*, 8487-8495.
- Gutiérrez-Landa. (2014). "*Estudio de la quimera formada por la proteína VP2 del Parvovirus B19 y la lipasa de Bacillus pumilus*". CDMX: Tesis de Licenciatura. UNAM.
- Hansen, H., Wang, T. (2015). Does the Saponification-GC Method Underestimate Total Cholesterol Content in Samples Having Considerable Cholesterol Esters? *J Am Oil Chem Soc.*, (92) 1735-1738 .
- Horton, J. G. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 109(9):1125-1131.

- Hull, R. (2014). Chapter 13 - Assay, Detection, and Diagnosis of Plant Viruses. En R. Hull, *Plant Virology* (págs. 775-808). 5th Ed. Academic Press.
- Jain, K. (2008). Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice. *Medical Principles and Practice*. 17 (2), 89-101.
- Ju, H. W. (2011). Goose parvovirus structural proteins expressed by recombinant baculoviruses self-assemble into virus-like particles with strong immunogenicity in goose. . *BBRC*, 409(1):131-136.
- Kauffman B, Simpson A.A, Rossman M.G. (2004). The Structure of Human Parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 11628-11633.
- Kaufmann K.J, Nettelbeck M.D. (2012). Virus chimeras for gene therapy, vaccination, and oncolysis: adenoviruses and beyond. *Trends Mol. Med.*, 18, 365-376.
- Kiick, K. L.; Saxon, E.; Tirrell, D. A.; Bertozzi, C.R.,. ((2002)). Incorporation of recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation". *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A*, 99, 19-24.
- Klibanov, A. (1984). Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *En: Advances in Applied Microbiology, Academic Press*, pág. 1-27.
- Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. (2001). "Click! Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions" . *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, 2004-2021.
- Leisi R, Ruprecht N, Kempf C, Ros C. (2013). Parvovirus B19 uptake is a highly selective process controlled by VP1u, a novel determinant of viral tropism. *J Virol*, 87:13161-13167.
- Menéndez C., Zaldívar C., González-Quevedo A.,. (2002). Errores innatos del metabolismo: Enfermedades lisosomales. *Revista Cubana de Pediatría*, 74(1), pp 68-76.
- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. . (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. . *Biotechnology, biotechnological equipment*, , 29(2), 205-220.
- Mora, R. (2008). "*Propiedades catalíticas y termoestabilidad de la lipasa recombinante de Bacillus pumilus GMA1*". CDMX: Tesis de Maestría, UNAM.
- Morán-García, A.C., Rivera-Toledo, E., Echeverría, O., Vázquez-Nin, G., Gómez, B., Bustos-Jaimes, I. (2016). Peptide presentation on primate erythrovirus 1 virus-like particles: in vitro assembly, stability and immunological properties. . *Virus Res.*, 224, 12-18.
- Morris, L. (1963). Fractionation of cholesterol esters by thin-layer chromatography. *J. Lipid Res.*, 357-359.

- Ong, H. (2017). Virus like particles as a platform for cancer vaccine development. *PeerJ*.4053, Doi: 10.7717.
- O'Rourke J.P., Peabody D.S., Chackerian B. (2015). Affinity selection of epitope-based vaccines using a bacteriophage virus-like particle platform. *Curr Opin Virol*, 11:76–82.
- P. I. W. de Bakker, P. H. (199). Molecular dynamics simulations of the hyperthermophilic protein sac7d from *Sulfolobus acidocaldarius*: Contribution of salt bridges to thermostability. *J Mol Biol*, 285, pp. 1811–1830.
- Petros R. A., DeSimone J. M. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.*, (9), 615–627.
- Petros R.A., Desimone J.M. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9(8), 615–627.
- Peyret H, Gehin A, Thuenemann E.C. (2015). Tandem fusion of hepatitis B core antigen allows assembly of virus-like particles in bacteria and plants with enhanced capacity to accommodate foreign proteins. *PLoS One*, 10(4):e0120751.
- Plummer E.M, Manchester M. (2011). Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnol*, 3:174–196.
- R. Kumar y R. Nussinov, . (2001). How do thermophilic proteins deal with heat?., *Cell Mol Life Sci*, 58, pp. 1216–1233.
- Rajendran P., Gunasekaran P. (2007). “Nanotechnology for Bioremediation of Heavy Metals”. en: *Singh SN, Tripathi RD (eds) Environmental Bioremediation Technologies. Springer, Berlin, Heidelberg*, 211-221.
- Reiner, Z. Guardamagna O, Nair D, . (2014). Lysosomal acid lipase deficiency e An under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. *Atherosclerosis*, 21-30.
- Roco, M. (2003). Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology* 14 (3), , 337-346.
- Rurup W.F, Verbij F, Koay M.S.T, Blum C, Subramaniam V, Cornelissen J.L.M. (2014). Predicting the loading of virus-like particles with fluorescent proteins. *Biomacromolecules*, 15(2):558–563.
- S. P. Voutilainen, P. G. Murray, M. G. Tuohy, and A. Koivula,. (2010). Expression of *Talaromyces emersonii* cellobiohydrolase cel7a in *Saccharomyces cerevisiae* and rational mutagenesis to improve its thermostability and activity. *Protein engineering, design y selection: PEDS*, 23, pp. 69–79.

- Sánchez-Rodríguez, Münch-Anguiano S., Echeverría O. , Vasquez-Nin G., Mora-Pale M., Dordick S.J., Bustos-Jaimes I. (2012). Human parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability. *Biochimie*, 94:870-878.
- Santillán-Uribe, H. (2012). "*Estudio de la enantioselectividad hidrolítica de la lipasa de Bacillus pumilus*". CDMX: Tesis de Licenciatura. UNAM.
- Scollay, R. (2001). Gene therapy: a brief overview of the past, present, and future. *Ann N.Y. Acad. Sci.*, 953: 26-30.
- Scott SA, L. B. (2013). Frequency of the cholesteryl ester storage disease commonLIPA E8SJM mutation (c.894G>A) in various racial and ethnic groups. *Hepatology*, 58: pp 958-65.
- Scott, S.A., Liu B., Nazarenko, I. , Martis, S., Kozlitina, J., Yang, Y. (2013). Frequency of the cholesteryl ester storage disease commonLIPA E8SJM mutation (c.894G>A) in various racial and ethnic groups. *Hepatology*, 58: pp 958-65.
- Segovia-Trinidad, C. L. (2018). "*Construcción y caracterización de partículas tipovirus multifuncionales de parvovirus B19*". CDMX: Tesis maestría. UNAM.
- Servant-Delmas, A. M. (2016). Update of the human parvovirus B19 biology. *Transfusion Clinique et Biologique* , 23:5–12.
- Smith, MT., Hawes, AK., Bundy BC. (2013). Reengineering viruses and virus-like particles through chemical functionalization strategies. *Curr Opin Biotechnol*, 24: 620–626.
- T. Lonhienne, C. Gerday, y G. Feller. (2000). Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. *Biochim Biophys Acta*, 1543, pp. 1–10.
- Tu M ,Liu F ,Chen S, Wang M, Cheng A. (2015). Role of capsid proteins in parvoviruses. *Virology Journal*, 12:114.
- Vellodi, A. (2005). Lysosomal storage disorders (review). *Br J Heamatol*, 128:413-431.
- Wilson, P.W, Zoltick J.M. (2001). Regulated gene expression in gene therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 953: 53-63.
- Zavodszky, P., Kardos, J., Svingor, J.,y Petsko, G. A. . (1998). "Adjustments of conformational flexibility is a Rey event in the thermal adaptation of proteins". *Proc.Nat.Acad,Sic.USA*, 95, 7406-741.