



**Biotecnología de Plantas**  
Posgrado



**Cinvestav**  
Unidad Irapuato



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO  
POLITÉCNICO NACIONAL.**

**Unidad Irapuato.**

**Departamento de Ingeniería genética.**

**Tesis:**

*"Hacia la administración dirigida de fármacos: expresión, purificación, caracterización y funcionalización de partículas similares a virus del virus de la Hepatitis C expresadas transitoriamente en hojas de Nicotiana benthamiana".*

**Presenta:**

I.B.T Edgar Fernando Suarez Zamora.

**Para obtener el grado de:**

Maestro en Ciencias.

**En la especialidad de:**

Biotecnología de plantas.

**Director de Tesis:**

Dr. Miguel Ángel Gómez Lim.

**Asesores:**

Dr. Edmundo Lozoya Gloria.

Dr. José Juan Ordaz Ortiz.

Irapuato, Guanajuato. Septiembre 2017.



## Agradecimientos.

Este trabajo de maestría no hubiera podido haber sido posible sin el enorme apoyo de mi director de tesis el Dr. Miguel Ángel Gómez Lim, al cual quiero agradecer por sus atinados consejos, confianza, mentoría y apoyo en el complicado camino de la labor científica. Gracias por permitirme haber sido parte de la gran familia que es el laboratorio de biotecnología de plantas y microorganismos.

A la M en C Brisia Alejandra Aguilar Barragán, por su paciencia, asesoría, colaboración y apoyo técnico en las actividades de laboratorio, así como sus atinados comentarios y observaciones en el desarrollo del presente proyecto, pero principalmente por su amistad y apoyo en momentos difíciles.

A Diana Elizabeth Zavala Navarro (Dianita) quien dedicó mucho tiempo y esfuerzo a mi proyecto al momento de las largas agroinfiltraciones y crecimiento de las plantas, así como en las también largas charlas y pláticas de cualquier tema. gracias por tu amistad.

A los Doctores Edmundo Lozoya Gloria y Dr. José Juan Ordaz Ortiz, por sus atinados consejos y contribuciones durante el desarrollo del presente proyecto y sobre todo por sus paciencia y excelente apoyo moral y científico.

A mi familia, Elda, José Luis y Aldo, quienes son mi roca y sin los que no hubiera podido mantenerme cuerdo durante estos dos años, este es también su logro, los amo.

A Ale mi roomie, gracias por permitirme ser parte también de tu familia y por dejarme compartir más que una amistad, un lugar donde estar. Gracias también a tus papás por el gran apoyo que me brindaron.

A Pau, Paul, Elsa, Mayté, Fernan, Bety y Vincent, gracias por haber hecho estos 2 años uno de los mejores; gracias por sus risas, regaños, consejos, pero sobre todo gracias por haber sido unos excelentes compañeros y amigos.

A Adri, por apoyarme como nadie durante estos 2 años, eres alguien muy especial para mí, este también es tu logro pinu.

A todos mis compañeros de generación, con los que conviví mucho y con los que no tanto, gracias por sus enormes enseñanzas y buenas vibras.

A toda la familia del CINVESTAV y al CONACYT, quienes me permitieron realizar este trabajo de maestría, confiando en que mis capacidades para mejorar e impulsar el desarrollo tecnológico y científico de mi país.

A todos mis compañeros del laboratorio de plantas y microorganismos (Ara, Cris, Beto, Adri, Yare, Fer (Posdoc), Marco, Uriel, Lis, Eliana, Rafa, Yari) de los que aprendí no solo cuestiones técnicas, sino a como ser una mejor persona. Gracias por crecer conmigo, les estaré siempre agradecido.

A Dios, quien, aunque obre de maneras que no podemos aún entender, trasciende en todo nuestro trabajo.

## Abreviaturas

AHS	Estadohepatitis inducida por alcohol
ASG-R	Asialoglicoproteína
BSA	Albúmina de suero bovino
C-terminal	Carboxilo terminal
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor
Cb	Carbenicilina
CDER	Center for Drug Evaluation and Research.
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CMVs	Vesículas derivadas de membranas (CMVs)
CP	Proteína de cápside
cLD	Lipid droplet cistosólico
CV	Volumen de columna
DO	Densidad óptica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzimas
FDA	Administración de drogas y alimentos de EU
g	Gramo
GFP	Proteína verde fluorescente
HCV	Virus de la Hepatitis C
HSC	Células estrelladas hepáticas
HVR1	Región hipervariable 1
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IRES	Sitio interno de unión a ribosoma
IU	Unidades internacionales
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina





kV	Kilovoltios
L	Litro
LVP	Partícula lipoviral.
mbar	Milibar
MES	Ácido morfolino etanosulfónico
MET	Microscopio Electrónico de Transmisión
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N-terminal	Amino terminal
NaCl	Cloruro de sodio
NAHS	Estadohepatitis no inducida por alcohol
NLPs	Partículas similares a nucleocápsides
nm	Nanómetros
<i>npt II</i>	Gen de la neomicina fosfotransferasa
NS	No estructural
°C	Grados Celsius
OMS	Organización Mundial de la Salud
p/v	Relación peso/volumen
PBS	Amortiguador fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilén glicol
pH	Potencial de hidrógeno
PST	Proteína total soluble
RE	Retículo endoplásmico
Rf	Rifampicina
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RUBISCO	Ribulosa difosfato descarboxilasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio



SDS-PAGE

Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

siRNA

Ácido ribonucleico de silenciamiento

TBS

Amortiguador salino con Tris

TMV

Virus del mosaico del tabaco

UTR

Región no traducida

V

Voltios

VHC

Virus de la Hepatitis C

VLPs

Partículas similares a virus

VPs

Partículas virales.

WB

Wester blot

$\mu\text{M}$

Micromolar

$\rho$

Densidad

## Índice general.

<b>Agradecimientos.....</b>	<b>4</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>5</b>
<b>Índice general.....</b>	<b>8</b>
<b>Índice de tablas.....</b>	<b>10</b>
<b>Índice de figuras.....</b>	<b>10</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>12</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>13</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>14</b>
<b>Evolución de la administración controlada de fármacos.....</b>	<b>14</b>
<b>Limitantes de la administración dirigida de fármacos.....</b>	<b>15</b>
<b>Alternativas biotecnológicas para la administración controlada de fármacos.....</b>	<b>16</b>
Vesículas derivadas de membranas (CMVs).....	17
Células como bioreactores de fármacos y virus onco-específicos <i>in vivo</i> .....	17
Liposomas y Teranósticos.....	18
Virus, Virus Like Particles y Estructuras basadas en virus.....	19
Casos de éxito en el uso de VPs y VLPs en la administración dirigida de fármacos.....	23
<b>El hígado como órgano blanco para la administración controlada de fármacos.....</b>	<b>27</b>
Morfología y biofísica del hígado.....	27
Atributos esenciales para el diseño de sistemas de administración dirigida al hígado.....	29
Aspectos esenciales en la formulación de sistemas de administración dirigida a hígado.....	30
Los hepatocitos como linaje hepato-celular diana para la administración dirigida de fármacos.....	31
Limitantes de la administración controlada de fármacos utilizando VLPs y VPs hacia hepatocitos.....	33
<b>Partículas similares a virus del Virus de la Hepatitis C como sistema de administración dirigida de fármacos a hepatocitos.....</b>	<b>35</b>
Generalidades del Virus de la Hepatitis C.....	35
Biofísica y estructura del Virus de la Hepatitis C.....	36
Ciclo de vida (Entrada, replicación y ensamble del Virus de la Hepatitis C.....)	37
Sistemas de cultivo celular y tipos de partículas virales del virus de la Hepatitis C.....	43
<b>Molecular Pharming en la producción de VPs y VLPs.....</b>	<b>48</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>49</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>49</b>
Objetivo general.....	49
Objetivos particulares.....	49
<b>Hipótesis.....</b>	<b>50</b>



<b>Metodología.</b> .....	<b>51</b>
Sistema de expresión transitoria para la expresión de VHC en hojas de <i>N. benthamiana</i> .....	51
Agroinfiltración de hojas de <i>N. benthamiana</i> .....	52
Proceso de bioseparación de VLPs (VHC) de <i>N. benthamiana</i> .....	54
Purificación por gradientes de sacarosa.....	57
Análisis e identificación de proteínas. ....	59
Microscopía de transmisión electrónica.....	62
Formulación de liposomas. ....	62
Marcaje fluorescente de liposomas y VLPs.....	63
Fusión de liposomas y VLPs fluorescentes.....	63
Microscopía confocal de una sola partícula .....	63
<b>Resultados.</b> .....	<b>64</b>
Comprobación de expresión de sistema recombinante transitorio en <i>N. benthamiana</i> .....	64
Análisis proteico.....	65
Cuantificación proteica.....	67
Análisis por western blot.....	68
Purificación por columna de afinidad en AKTA FPLC de proteína soluble. ....	69
Microscopía de transmisión electrónica de fracciones recuperadas a partir de purificación por columna de afinidad (0-500mM NaCl ,30CV). ....	73
Purificación de fracciones A6 (82-99mM NaCl) utilizando gradientes de sacarosa. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Microscopía de transmisión electrónica de fracciones purificadas en 25% de gradiente de sacarosa. ....	77
Formulación de liposomas. ....	79
Funcionalización (Fluoróforo) y fusión de VLPs con liposomas.....	80
Microscopía confocal de una sola partícula. ....	81
<b>Discusión</b> .....	<b>82</b>
La heparina como sistema para la purificación de VLPs del VHC producidas en plantas. ....	82
Caracterización estructural de VLPs del VHC producidas en planta. ....	84
.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Comparación funcional y estructural entre cLD (Lipid Droplets de citosol), VLDL (Lipoproteínas de muy baja densidad) y LVP (Partículas Lipovirales)..	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Diseño de sistema LVPs + liposomas.....	95
Perspectivas en el uso del sistema VLP-Liposoma (Cargado de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos).....	100
<b>Conclusiones.</b> .....	<b>100</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>101</b>

## Índice de tablas

Tabla 1. Evolución de la administración controlada de fármacos	14
Tabla 2. VLPs utilizados para la administración dirigida de fármacos y biomoléculas.	24
Tabla 3. Receptores conocidos en linajes hepato-celulares	31
Tabla 4. Sistemas de administración dirigida de fármacos a hepatocitos	32
Tabla 5. Sistemas de expresión utilizados para la producción de partículas o proteínas virales del Virus de la Hepatitis C.	47
Tabla 6. Gradientes de sacarosa discontinuos.	57

## Índice de figuras

Figura 1. Principales modificaciones en VPs y VLPs para su utilización en aplicaciones biotecnológicas.	21
Figura 2. Sistemas de Encapsulación y liberación de moléculas en VLPs y VPs.	23
Figura 3. Evolución de la formulación en la administración dirigida de fármacos a través del uso de nanomateriales.	26
Figura 4. Morfología y distribución de linajes celulares en hígado.	28
Figura 5. Ciclo de vida del Virus de la Hepatitis C.	42
Figura 6. Evolución de los genomas auto-replicativos y de cultivo celular para VHC.	45
Figura 7. Secuencia sintética para la expresión de VHC en plantas.	51
Figura 8. Vectores de co-transformación para el sistema de virus des-ensamblado.	52
Figura 9. Método de preparación de gradientes de sacarosa.	58
Figura 10. Expresión de GFP en <i>N. benthamiana</i> utilizando el sistema de virus desensamblado	64
Figura 11. SDS-PAGE de fracciones proteicas después de la purificación por cromatografía de afinidad.	66
Figura 12. Quimioluminiscencia Anti-Core y Anti-E1 de fracciones purificada por columna de heparina.	68
Figura 13. Cromatograma purificación por columna de afinidad heparina (Gradiente lineal 0-1mM NaCl, 20CV).	69
Figura 14. Electroforesis en gel de fracciones de la purificación por afinidad (0-1M NaCl, 20CV).	71
Figura 15. Cromatograma de la purificación por columna de afinidad heparina (Gradiente lineal 0-500mM NaCl, 30CV).	72
Figura 16. Electroforesis en gel de fracciones de la purificación por afinidad (0-500mM NaCl, 30 CV).	73
Figura 17. Micrografía de transmisión electrónica fracción A6 (82mM-99mM NaCl).	74
Figura 18. Micrografía de transmisión electrónica de fracciones A3 (33mM-48mM NaCl).	75
Figura 19. Electroforesis en gel SDS-PAGE de fracciones recuperadas de ultracentrifugación en gradientes de sacarosa (20%-60%, Incremento 5%).	76
Figura 20. Microscopía de transmisión electrónica de fracción 25% de sacarosa (1.1036g/mL), en gradiente 20-60%, aumento 5%.	77
Figura 21. Micrografía de transmisión electrónica de fracción 25% de sacarosa (1.1036g/mL), en gradiente 20-40%, aumento 2.5%.	79
Figura 22. Formulación de liposomas de membrana sencilla.	80
Figura 23. Representación del marcaje fluorescente y fusión de VLPs de VHC y liposomas.	81
Figura 24. Microscopía confocal de una sola partícula en la fusión de liposomas y VLPs de VHC fluorescentes.	82
Figura 25. Análisis de distribución de tamaño de partículas de VLPs de VHC, elusión 82-99mM NaCl.	86



<b>Figura 26. Distribución de tamaños de VLPs de VHC en gradiente de sacarosa 20%-60%, aumento de 5%.</b>	<b>88</b>
<b>Figura 27. Distribución de tamaños de VLPs de VHC en gradiente de sacarosa 20%-60%, aumento de 2.5%.</b>	<b>89</b>
<b>Figura 28. Comparación en los tamaños de partículas de VLPs de VHC producidos en cultivo celular.</b>	<b>90</b>
<b>Figura 29. Comparativa entre VLPs de VHC producidas en <i>N. benthamiana</i> y VLPs infecciosas producidas en hepatocitos.</b>	<b>92</b>
<b>Figura 30. Comparación funcional y estructural entre cLD, VLDL y LVPs de VHC.)</b>	<b>94</b>
<b>Figura 31. Espectros de excitación y emisión de los marcadores fluorescentes DiD y DiO.</b>	<b>99</b>

## Resumen

El virus de la Hepatitis C (VHC) es un virus de RNA de cadena sencilla positiva perteneciente al género *Hepacivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*. Estructuralmente está compuesto por una nucleocápside (Core) rodeada por una membrana derivada del huésped la cual sirve de soporte para el anclaje de las glicoproteínas de envoltura E1 y E2. El VHC presenta un tropismo específico hacia los hepatocitos del hígado en humanos (hepatotropismo). Los sistemas de cultivo celular (cc) para la producción de partículas de VHC infecciosas (con capacidad de auto replicación) y no infecciosas (VHCcc) han sido desarrollados exitosamente en mamíferos, insectos y sistemas libres de células. En el presente proyecto, se reporta por primera vez la producción de VLPs de VHC en un sistema vegetal (*Nicotiana benthamiana*). La sobre-expresión transitoria del cDNA optimizado con codones para plantas de la cepa 1a de VHC resulta en la formación de VLPs de VHC con poblaciones con tamaños entre 50nm y 99nm en diámetro, coincidiendo en tamaño y morfología a partículas producidas en otros VHCcc. Para poder determinar si las VLPs de VHC pudieran funcionar como posible plataforma de administración dirigida, las partículas virales fueron marcadas fluorescentemente y fusionadas con liposomas fluorescentes. La co-localización de los liposomas y VLPs se observó utilizando microscopía confocal fluorescente adaptada a mediciones de una sola partícula. El sistema VLP-liposoma se obtuvo con buenos rendimientos y se espera que pueda ser utilizado posteriormente como administrador dirigido de fármacos *in vivo* y además para realizar estudios del ciclo de vida del Virus de la Hepatitis C en sistemas no mamíferos.

## Abstract.

Hepatitis C is an enveloped, positive-stranded RNA virus belonging to the *hepacivirus* genus in the *Flaviviridae* family. It is comprised of a nucleocapsid (Core) surrounded by a host-derived membrane containing the E1 and E2 HCV glycoproteins and has a specific tropism to liver hepatocytes. Cell-culture (cc) systems to produce infectious and non-infectious Hepatitis C Virus (HCV) particles (HCVcc) had been developed in mammals, insect and free cell systems. We report for the first time the successful production of HCV VLPs in a plant system (*N. benthamiana*). Transient overexpression of plant-codon optimized, cDNA of the structural proteins (E1, E2 and Core) from the strain 1a of Hepatitis C resulted in formation of fully assembled VLPs, showing pleomorphic particles populations ranging in size from 29nm to 110nm, with two mayor populations of 50nm and 99nm in diameter resembling particles produced in other HCVcc systems.

SDS-PAGE and western blot analysis showed the presence of 2 structural proteins at the previously reported buoyant density for HCVcc particles of 1.1g/mL.

VLPs were fluorescently labeled and fused with previously functionalized fluorescent liposomes. Co-localization was showed using single-particle multi-fluorophore confocal microscopy.

The VLP-liposome system was obtained in high yields and allegedly could be used for further vaccine discovery, targeted drug delivery to liver and for novel studies of Hepatitis C viral life-cycle in a non-mammal system.



## Introducción.

### Evolución de la administración controlada de fármacos.

El campo de la administración controlada espacio-temporal de fármacos (*Drug Delivery*) ha experimentado un crecimiento importante en el último siglo (a partir de la década de 1950), impulsado principalmente por el interés de generar tecnologías las cuales permitan: optimizar la administración de fármacos de alto valor agregado, generar un mayor tiempo de vida media de los mismos, así como, la disminución de los efectos secundarios producto de la distribución no específica en los sistemas a beneficiar. Se puede definir de manera muy clara 3 generaciones en la evolución del campo del "*Drug Delivery*" **Tabla 1.**

**Tabla 1. Evolución de la administración controlada de fármacos**

Generación (Décadas).	Características
<b>Generación 1</b> (50's,60's,70's)	<b>Bases de la administración controlada</b> Administración Oral. Mecanismos de administración de droga. Disolución, difusión, osmosis e intercambio iónico.
<b>Generación 2</b> (80's, 90's, 2000's)	<b>Sistemas de administración inteligentes.</b> Polímeros inteligentes. Sensibilidad al ambiente. Nanopartículas Administración génica, de péptidos y proteínas. Administración dirigida a tumores.

<p><b>Generación 3</b> (2010´s, 2020´s, 2030´s)</p>	<p><b>Sistemas de administración modular.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Liberación sensible a glucosa.</li> <li>Sistemas de administración prolongada.</li> <li>Liposomas</li> <li>Co-relación <i>in vivo in vitro</i></li> <li>Administración dirigida.</li> <li>Virus Like Particles</li> <li>Exosomas</li> <li>Teranósticos</li> </ul>
---	--

(Adaptada de [1]).

Aunque en el mercado se pueden encontrar fármacos pertenecientes a las tres generaciones, actualmente el campo de la administración de fármacos se ha enfocado principalmente en sugerir alternativas para poder tener un control prácticamente absoluto sobre la administración controlada en líneas celulares específicas e inclusive su distribución dirigida a tumores cancerosos.

### Limitantes de la administración dirigida de fármacos.

Existen dos barreras de distinta naturaleza al momento de administrar drogas *in vivo*: la formulación del fármaco y las barreras biológicas.

Dentro de la formulación del fármaco actualmente existen dos obstáculos que deben de ser superados: La administración oral de drogas poco solubles y la eliminación del abrupto inicio de la administración de formulaciones inyectables. Respecto a la primera, alrededor del 70%-90% de los nuevos fármacos candidatos no son solubles en agua por lo que es necesario generar nuevas formulaciones que puedan ser administradas sin utilizar excipientes poco compatibles con los pacientes. Con respecto a la segunda, se sabe que casi todas las formulaciones inyectables tienen

un abrupto inicio de dosificación, lo que resulta en altas concentraciones en sangre en los primeros días de su administración comparados con la concentración de la droga en el estado estacionario de la misma. Este abrupto inicio puede tener consecuencias clínicas, siendo las más comunes el rechazo de la droga por parte del sistema circulatorio o efectos secundarios, los cuales pueden no ser tolerados por los pacientes.

Las barreras biológicas son más difíciles de superar ya que muchas veces son más complicadas de predecir debido a la complejidad de los sistemas vivos y a las diferencias que existen entre individuos.

Debido a que las formulaciones orales son las más comunes, se ha podido observar que muchas drogas tienen una ventana limitada de absorción a través del tracto digestivo, por lo que es necesario administrar dichos fármacos de tal manera que su tiempo de retención por la vía digestiva sea mayor, o, utilizar un nuevo sistema de entrega y liberación más eficiente, el cual disminuya la pérdida del fármaco por la acción del metabolismo. [1]

### Alternativas biotecnológicas para la administración controlada de fármacos

Actualmente los biofarmacéuticos representan alrededor del 30% de las nuevas medicinas que llegan al mercado. El área de la administración controlada se ha visto beneficiada por los avances en la biotecnología, ya que diversos sistemas para la administración dirigida se han inspirado en sistemas biológicos y/o han utilizado elementos de los mismos, principalmente porque de manera natural pueden aumentar la posibilidad de éxito y favorecer la biodistribución de las drogas. Los

ejemplos más representativos que la biotecnología actualmente ofrece para el área de la administración de fármacos son:

*Vesículas derivadas de membranas (CMVs).*

De manera natural estas funcionan en el tráfico de moléculas y transferencia de información entre células por lo que son especialmente atractivos para ser utilizadas como acarreadores de fármacos *in vivo* [2]: Dentro de los diferentes tipos de CMVs, los exosomas son los que han sido más estudiados, ya que al ser acarreadores autólogos disminuyen drásticamente la respuesta inmune y físicamente han demostrado sobrepasar barreras importantes como el sistema hematoencefálico [3].

Dentro de las principales desventajas de los sistemas de administración con exosomas se encuentra la limitante sobre los métodos de carga de moléculas como siRNA, el cual se basa principalmente en la electroporación.

*Células como bioreactores de fármacos y virus onco-específicos in vivo.*

La bio-ingeniería de células ha demostrado ser una herramienta sumamente útil al momento de producir biomoléculas de interés farmacéutico y biotecnológico.

Si además de su producción se puede sumar la producción *in situ-in vivo* de una molécula de interés clínico, este sistema representaría un modelo inagotable de producción del fármaco el cual pudiera estar modulado además por el sensado en tiempo real de las condiciones del microambiente *in vivo*. Se ha avanzado en el desarrollo de este tipo de sistemas particularmente utilizando células madres mesenquimales para el tratamiento de cáncer, produciendo diferentes moléculas de

origen biológico anti-cáncer como son los antagonistas de factores de crecimiento interleucinas y las proteínas pro-apoptóticas [4]. Una de las desventajas de esta tecnología, es el posible daño al paciente si estos sistemas permanecen activos una vez que se ha erradicado un cáncer en particular [5].

Por otro lado, las células productoras de virus oncolíticos (los cuales infectan principalmente células tumorales sin dañar tejido sano) presenta una alternativa muy atractiva para eliminar células tumorales específicas, sin embargo; presentan diversas problemáticas como son: 1. Migración relativamente baja hacia la zona tumoral, 2. Posible respuesta inmune inespecífica, 3. Proliferación no dirigida [6].

Dentro de los retos que esta tecnología presenta se encuentra la selección de la mejor combinación de virus-línea celular.

### Liposomas y Teranósticos.

Los teranósticos [7] representan un área nueva en la administración dirigida de fármacos. Esta nueva biotecnología se basa en el principio de administrar en una misma formulación un fármaco o molécula de interés, así como un agente para monitorear y visualizar su administración. Esto es especialmente importante ya que el agente para su monitoreo puede ser cuantificado y permite determinar las tasas de dosificación además de la localización específica del agente terapéutico.

Los liposomas son biomoléculas compuestas principalmente de fosfolípidos los cuales, en solución acuosa, pueden formar estructuras de doble capa lipídicas cerradas en los que pueden atrapar en la parte hidrofílica moléculas con afinidad polar y, en las intersecciones apolares moléculas hidrofóbicas. Para que un

liposoma pueda tener un efecto terapéutico, la droga debe de ser dirigida a un sitio específico en altas concentraciones, por lo que una formulación óptima debe de poder maximizar el total de droga a encapsular, limitar el desperdicio durante la disposición sistémica y a su vez conjugarse con alguna molécula señal para su correcta deposición en el lugar de acción. Los liposomas deben de poder responder al microambiente (zona anatómica específica en algún sistema vivo) diana para poder liberar su contenido, por lo que son diseñados para responder ante señales específicas como: la disminución en el pH, hipertermia, campos magnéticos externos o ultra sonido [8].

Los parámetros de diseño en la formulación de liposomas los cuales tienen mayor importancia son: composición lipídica, permeabilidad, longitud de la cadena fosfolipídica, la tasa lípido-fármaco, carga, tamaño de partícula, carga remota de fármacos y el método de preparación para aumentar la eficiencia de encapsulación.

Los liposomas actualmente son considerados una de las plataformas más atractivas para ser utilizadas como teranósticos debido a su alta capacidad de carga de diferentes moléculas y sus funciones de encapsulación flexibles tanto para agentes de monitoreo e imagen como agentes terapéuticos [9].

**Virus, Virus Like Particles y Estructuras basadas en virus.**

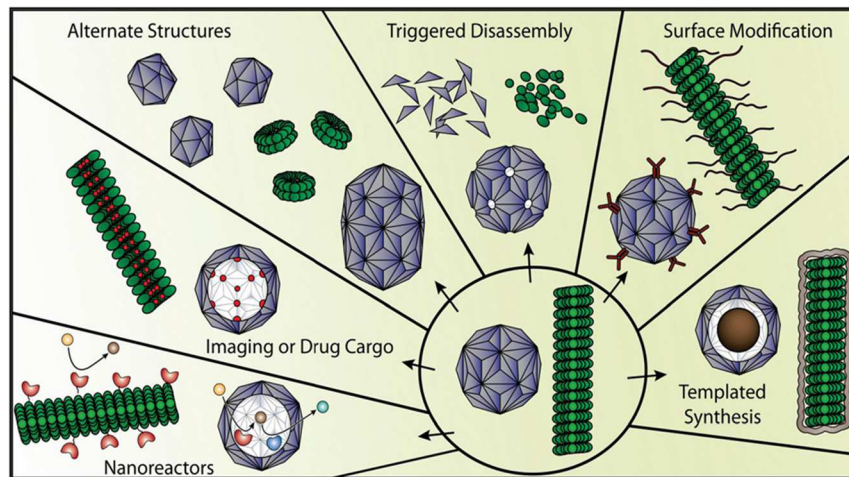
Las partículas virales (VPs) y partículas similares a virus (VLPs) tienen diversas características que los hacen excelentes candidatos para ser utilizados como agentes de administración dirigida de fármacos. El orden de magnitud de estas partículas, es decir, su escala nano ( $1 \times 10^{-9} \text{m}$ ), sus estructuras sólidas y bien

definidas, su naturaleza infecciosa, su facilidad y control de producción (infección específica de células, bacterias o plantas) así como la posibilidad de ser modificadas química y genéticamente, son solo algunas de las características que las posicionan como una de las tecnologías más promisorias para la administración controlada de fármacos [10].

La administración de moléculas dirigidas utilizando VPs y VLPs se basa en: **1.** Inclusión/encapsulación de componentes bio-activos; **2.** Liberación de los materiales encapsulados; **3.** Acumulación local específica en el lugar donde se pretende administrar la molécula; **4.** Excreción del hospedero; **5.** Tiempo de circulación y **6.** Respuesta inmune del cuerpo respecto a los agentes de entrega.

Los virus naturalmente necesitan replicarse dentro de un hospedero a través de la transferencia horizontal de material genético de una manera sumamente eficiente. Es por esto que, el aspecto más importante de los VLPs y VPs respecto a la administración controlada de fármacos, es la capacidad de estos de entrar a la célula y liberar de manera eficiente su contenido. En un inicio, el uso de estos vehículos para la entrega de moléculas fue a través de la encapsulación de ADN y ARN utilizando Adenovirus o Virus Adeno-Asociados [11]. Los virus, a diferencia de los polímeros sintéticos (como el PDMAEMA o el poli(2-dimetilaminoetilmecrilato)), tienen millones de años de evolución, en los cuales se han especializado en los requerimientos necesarios para entrar/infectar/transfectar células de manera eficiente.

Utilizar péptidos como elementos funcionales para la acumulación de alguna molécula de interés en combinación con VPs o VLPs es una estrategia que, dependiendo de la naturaleza del virus (envuelto, solo cápside, multi-proteico) puede aumentar la direccionalidad de la partícula hacia un tejido diana. Estas



**Figura 1. Principales modificaciones en VPs y VLPs para su utilización en aplicaciones biotecnológicas.** Modificaciones que se han realizado a VPs y VLPs para ser utilizados en aplicaciones biotecnológicas, a través de la modificación de su superficie, modificación de su estructura y el ensamble y desensamble de sus componentes. (Tomado de [12]).

modificaciones se pueden realizar de manera química o genética. La modificación genética se orienta a la modificación de residuos específicos (**Figura 1**), con el fin de funcionalizar regiones específicas en la superficie para poder conjugar después moléculas sintéticas utilizando técnicas como la química-clic o para expresar algún motivo proteico específico (Epítomos, moléculas señal, gluco-lípidos etc.). Esto permite una mayor selectividad (tropismo) de algún tejido en particular, generación de algún tipo de respuesta en el tejido diana y/o propiciar alguna función específica al sistema viral [13].



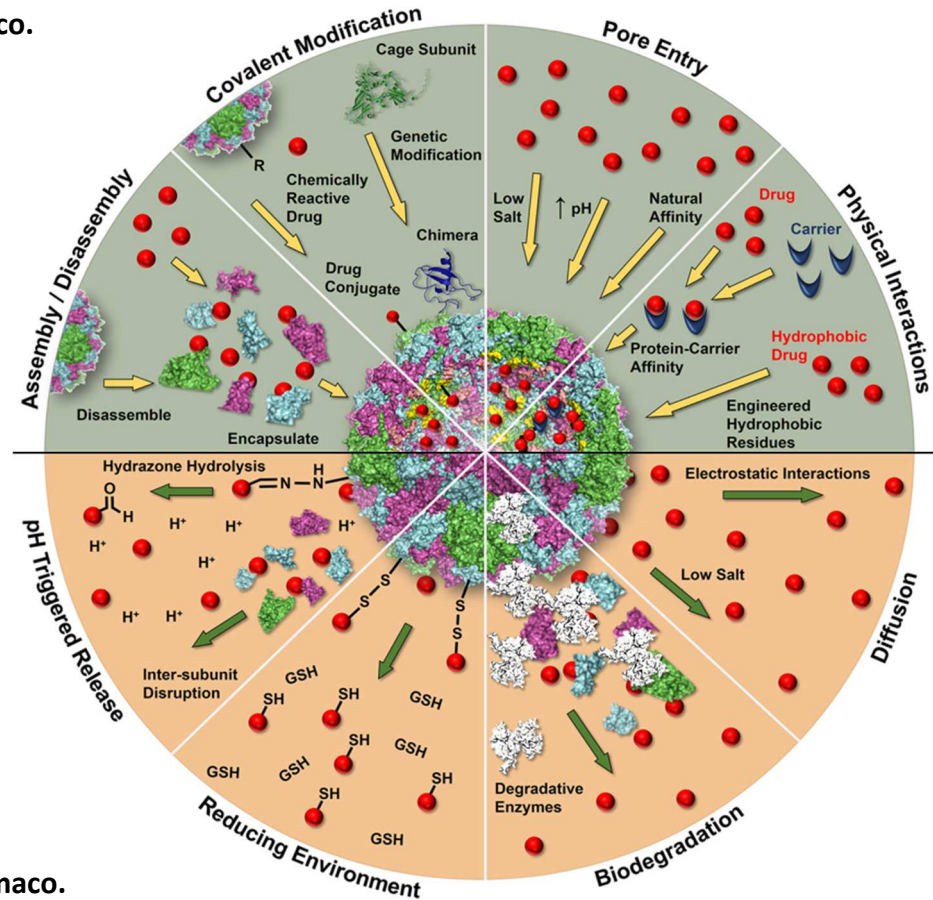
En particular, la administración de material no genético, utilizando VLPs y VPs se ha explotado en el tratamiento de tejidos cancerosos, debido a que estos presentan una porosidad mayor en el sistema vascular del paciente, facilitando su transporte en estos sitios de acción [14].

Las VLPs o VPs que están compuestas solamente por las proteínas de cápside (CP) las cuales forman una nucleocápside, se pueden considerar como "Cage Protein" es decir cajas proteicas, las cuales, pueden ser sujetas a proceso de ensamble y desensamble. Los métodos de ensamble y desensamble utilizan las propiedades físicas de las nucleocápsides de los virus, donde a través de la disminución de la fuerza iónica y/o la disminución del pH del buffer en el que se encuentran, es posible obtener CP en solución y libres. Una vez que un número de CPs se encuentran en condiciones lo más cercanas a las de una cápside WT nativa, pueden volver a formar una cápside, permitiendo así el atrapamiento de moléculas de interés en la cavidad de la caja proteica, normalmente a través de interacciones covalentes. [15]

Además de la técnica de ensamble y desensamble para el cargado de moléculas de interés, dependiendo de la naturaleza de la molécula y VP o VLP, existen diversas técnicas para la "encapsidación" (Internalización de moléculas externas al interior de cápsides virales) así como también diversas estrategias para poder liberar su contenido de una forma efectiva (**Figura 2**). Especialmente, la utilización de la interacción física de terceros acarreadores con cierta afinidad al centro de la cápside o zonas específicas de los VPs VLPs, se presenta muchas veces como una solución muchas veces adecuada a sistemas virales los cuales debido a su

complejidad (virus envueltos o multi-proteicos) no pueden ser sometidos al desensamble de sus capsómeros.

### Carga de fármaco.



### Liberación de fármaco.

**Figura 2. Sistemas de Encapsulación y liberación de moléculas en VLPs y VPs.** Principales mecanismos de encapsulación y liberación empleados en VPs y VLPs, basados en diferentes estrategias dependiendo del sistema a utilizar en la administración de fármacos y/o moléculas no genómicas. (Adaptado de [13]).

Casos de éxito en el uso de VPs y VLPs en la administración dirigida de fármacos.

Existen diversos casos de éxito reportados en el uso de VLPs y VPs y sistemas basados en virus, como nano-acarreadores para la administración dirigida de fármacos (**Tabla 2**, Adaptada de [12]) de los cuales algunos se encuentran en fases clínicas avanzadas o ya en el mercado.

**Tabla 2. VLPs utilizados para la administración dirigida de fármacos y biomoléculas.**

Adenovirus	Bleomicina	in vitro	Adenovirus dodecahedron como vector de administración de fármacos.	[16]
	Paclitaxel	in vivo	Paclitaxel covalentemente unido a Adenovirus, se administró a células cancerosas in vivo. Se logró la reducción en los efectos secundarios y se aumento la respuesta anti-tumor, comparada con la administración de la droga libre	[17]
Virus de la leucosis aviar	Recombinasa cre	in vitro	Proteínas moduladoras de la respuesta inmune se expresaron en la superficie del virus y enzimas activas fueron encapsidadas entro de VLPS para la interacción de los receptores de membrana y su posterior liberación intra-celular.	[18]
	5-FU			
	Caspasa-8			
	Interferon-Y			
Virus del moteado clorótico del caupí (CCMV)	TRAIL	in vitro	Dirección y muerte fotodinámica de patógenos microbiales utilizando arquitecturas de cajas protéicas funcionalizadas con un fotosintetizador.	[19]
	Ru (bpy2)Phen-IA			
Virus del mosaico del caupí	DOX	in vitro	Administración de CPMV-DOX	[20]
	Proflavin	in vitro	Proflavina y fluoróforo fueron encapsulados dentro de CPMV a través de la interacción del RNA nativo para su administración intracelular contra cancer	[21]
Virus del mosaico del pepino	DOX	in vivo	DOX encapsulado, fue dirigido a células cancerosas que expresan folato in vivo, mostrando una reducción en la cardiotoxicidad y un aumento en la respuesta anti-tumoral, comparada con la droga libre en su administración	[22]
Virus de la Hepatitis B	CCL19	in vivo	VLP cargadas con CCL19, IL-2 y HPV16, proveen de protección ante las respuesta de las células T en ratón transgénico HLA-A2	[23]
	IL-2		Motivos no metilados de CG empaquetados en VLPs generan respuestas protectoras citotóxicas de células T sin efectos secundarios.	[24]
	CpG		Administración sistémica de siRNA a través de Proteínas de cápside quiméricas, dirección específica a tumores y actividad de RNAi in vivo.	[25]
	siRNA			
Virus Hibiscus ringspot	DOX	in vitro	Ácido Fólico conjugado en cajas protéicas del virus HBR.	[26]
HIV-1	CD40L	in vitro	VLPs que contienen CD40L como candidatos de vacuna contra HIV-1, dirigidas a células dendríticas	[27]
JC Polyomavirus	Paclitaxel	in vitro	VLPs con cyclodextrinas removibles permiten la administración y liberación de glutatone en células.	[28]
	siRNA	in vivo	Administración dirigida in vitro e in vivo de IL-10, utilizando VLPs de JC polyomavirus.	[29]
Bacteriophago MS2	siRNA	in vitro	VLPs de MS2 fueron utilizadas para encapsular diversas moléculas terapéuticas a través de su unión covalente con el RNA nativo de las mismas.	[30]
	DOX		VLPs de MS2 utilizadas como un sistema de administración de drogas robusto y semisintético	[31]
	5-fluoracil	in vivo	Desarrollo de un sistema de administración de miRNA basadas en VLPs del bacteriófago MS2	[32]
	ricin toxin A-Chain			
miRNA				
	ssDNA anti-sentido		Administración de oligonucleótidos en anti-sentido dirigidos a células de lucemia a través de cápsides de MS2	[33]
Polyomavirus Murino	Metotrexano	in vitro	Administración intracelular de proteínas y moléculas de bajo peso molecular a través de VLPs de Polyomavirus recombinantes.	[34]
QB	EGF	in vitro	Administración celular a través de la utilización de VLPs de Qbeta expresando factores de crecimiento epidermal.	[35]
	Polifirín		Administración de el fotosensitizador porfirina utilizando VLPs de Qbeta.	[36]
	CpG	Fase 2 clínica	Fase clínica 2 de la administración de CpG a través de VLPs de Qbeta que expresan antígenos tumorales para la inmunoterapia ante melanoma.	[37]
Virus del mosaico necrótico del trébol rojo	DOX	in vitro	Cápside del Virus del mosaico necrótico del trébol rojo como nanopórtula de administración multifunciona celular	[38]
Rotavirus	DOX	in vitro	VLPS autoensambladas de Rotavirus para la administración dirigida de virus.	[39]
SHIV	CD40L	in vivo	Incorporación de ligandos de CD40 en VLPs de SHIV para la activación y aumento en la repuesta inmune ante HIV.	[40]

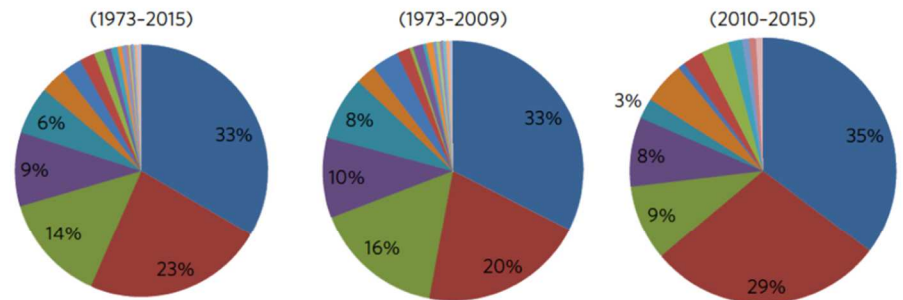
(Adaptado de [12]).



La administración dirigida de fármacos a través del uso de VLPs es una tendencia en crecimiento en el área biofarmacéutica y nanomédica. El centro para la investigación y evaluación de fármacos (Center for Drug Evaluation and Research, CDER), en conjunto con la Administración norteamericana de fármacos y alimentos (Food and Drug Administration, FDA) ha monitoreado el desarrollo en la solicitud de alrededor de 359 fármacos desde el año 1973 hasta 2015. Dicho registro, evidencia el aumento del uso de nanomateriales para la administración de fármacos. En particular, se ha visto un aumento considerable en los fármacos denominados complejos fármaco-proteicos (proteínas derivadas de virus y/o partes de los mismos) y liposomales (contiene liposomas de manera estructural), tal como se muestra en la **Figura 3**, debido al éxito en pruebas clínicas de fármacos formulados con este tipo de biomateriales. Este estudio clasifica a las formulaciones de administración controlada, dependiendo de 3 factores: **a)** Composición de la nanoformulación, **b)** Enfermedad o situación clínica hacia la cual el tratamiento está dirigido, **c)** Vía de administración.

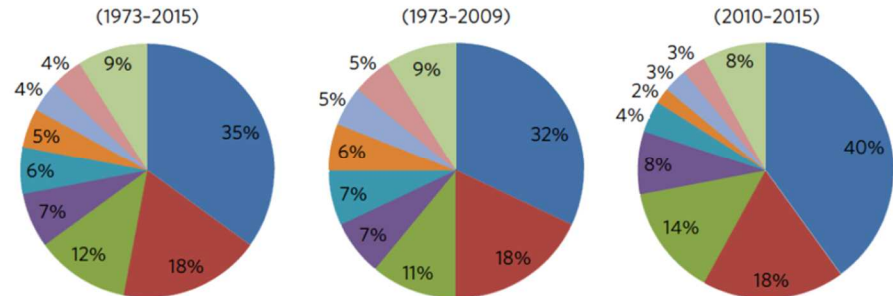
**a Composición de la Nano-formulación**

- Liposoma
- Nanocrystal
- Nano-Emulsión
- Complejo Hierro-Polímero
- Micelas
- Complejo Fármaco-protéico
- Complejo Fármaco-polímero
- Dendímeros
- Complejo Polímero-Nano-Partícula
- Nano-Burbujas
- Sílica (NP)
- Complejo Fármaco-Lípido
- Complejo Metal-NP
- Complejo Lípido-NP
- NP Fármaco
- NP Sólida de Lípidos
- Nanotubos
- Complejo Metal-Protéico
- Complejo Metal-No metal
- Complejo Metal-Polímero



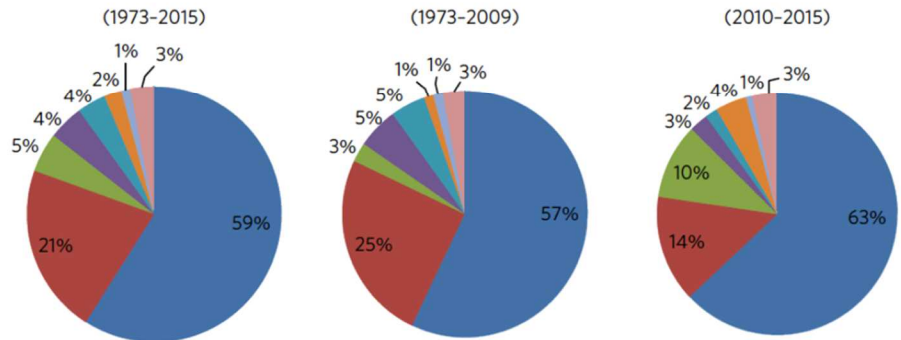
**b Tipo de tratamiento**

- Cáncer.
- Inflamación/Inmunológico/Dolor
- Infección
- Anemia
- Imagenología
- Nutrición Parenteral
- Desórdenes Endócrinos/Exócrinos
- Desórdenes Cardíaco/Vasculares
- Otros



**c Vía de administración**

- Intravenoso
- Oral
- Oftálmico
- Inhalación (Oral/Nasal)
- Tópico (Piel)
- Intramuscular
- Vaginal
- Otros



**Figura 3. Evolución de la formulación en la administración dirigida de fármacos a través del uso de nanomateriales. (Adaptado de [41]).**

En términos del tipo de tratamiento al que va dirigida la formulación, la solicitud de tratamientos dirigidos al cáncer han prevalecido, y representaron el 40% de dichas solicitudes de los años 2010-2015. Así mismo, la vía de administración con mayor presencia entre las formulaciones ha sido la administración intravenosa seguida de la oral. Se espera que el número de formulaciones para la administración controlada de fármacos siga en aumento (siendo el año con mayores solicitudes el 2006), y que el tipo y complejidad de nano-formulaciones siga en aumento en los próximos



15 años [41]. Así mismo, se prevé que el uso de nanopartículas de larga persistencia (Oro, Sílica, Níquel etc.) vaya a la baja principalmente porque de manera histórica ha sido difícil poder identificar como estos materiales afectan a la citotoxicidad total de las formulaciones y como es que son metabolizadas en los sistemas de entrega

### El hígado como órgano blanco para la administración controlada de fármacos.

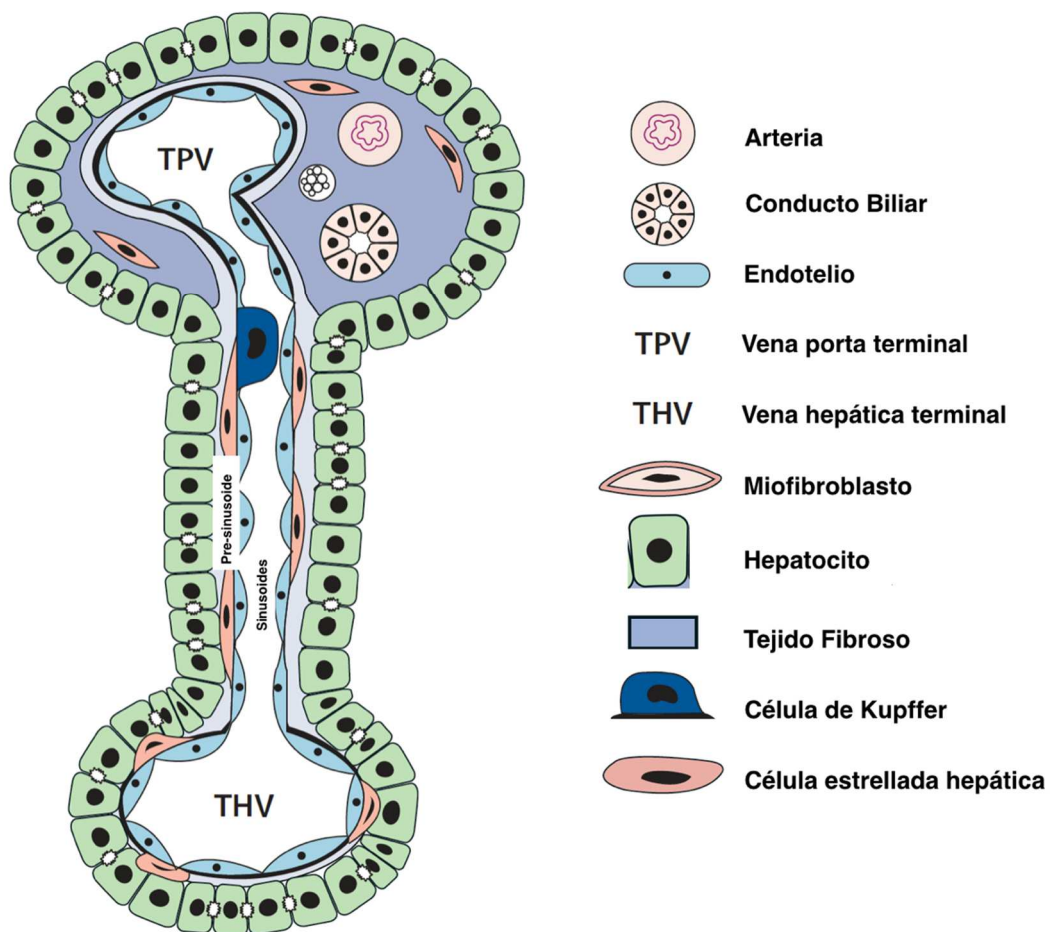
El hígado juega un rol crítico en el metabolismo de fármacos y la detoxificación del cuerpo. Es un excelente reservorio de diferentes acarreadores biológicos, enzimas metabolizantes y transportadores que pudieran utilizarse para la administración hígado-dirigida y así aumentar la eficiencia de administración de fármacos. Los hepatocitos son las unidades estructurales del hígado y son responsables de la bioconversión de xenobióticos lipofílicos en metabolitos que puedan ser eliminados a través de la vía urinaria o biliar.

El desarrollo de sistemas de administración dirigida a hígado, facilitarían en gran medida la completa bioconversión de los fármacos, aseguraría una alta biodisponibilidad y marcaría una reducción en la incidencia de efectos secundarios [43].

### Morfología y biofísica del hígado.

Dentro de las funciones más importantes del hígado, se encuentra el procesamiento de la sangre a través de su circulación de capilares semi-permeables denominados sinusoides, los cuales permiten alcanzar las venas hepáticas centrales. Los sinusoides son pequeños recipientes de sangre que varían su longitud entre 10 y

100µm de ancho y permiten el paso casi indistinto de componentes del plasma vascular hacia el espacio presinoidal (Espacio de Disse), donde se encuentran los hepatocitos (células parenquimales del hígado) los cuales representan el 80% del tipo celular en el hígado. Además de los hepatocitos (**Figura 4**), diversos linajes celulares tales como los miofibroblastos, células de Kupffer y las HSC (Células estrelladas hepáticas) realizan diversas funciones de mantenimiento, señalización y catálisis de componentes de la sangre.



**Figura 4. Morfología y distribución de linajes celulares en hígado.** Representación de los diferentes linajes celulares, distribución y morfología en una sección transversal de hígado sano (no cirrótico). (Adaptado de [42]).

Atributos esenciales para el diseño de sistemas de administración dirigida al hígado.

Para que un fármaco pueda ejercer su efecto deseado, debe de entrar en contacto físico con su tipo celular blanco, el cual puede tratarse de un receptor específico. El sistema de administración del fármaco debe de asegurar que tal interacción se lleve a cabo solo en la zona anatómica en la que se desea que el fármaco tenga efecto, es por esto que debe de seguir el siguiente criterio **[43]**:

1. Debe de ser capaz de atravesar todas las barreras anatómicas (i.e. estómago e intestino).
2. Debe de reconocer un receptor o cúmulo de señales receptoras a raíz de la cascada de señalización de un receptor inicial.
3. Los o el ligando externo debe de poder competir con los ligandos endógenos producidos naturalmente en la zona anatómica de acción.
4. El sistema de entrega debe de ser no tóxico, biocompatible, biodegradable y físico-químicamente estable en las células del hígado ya sea en pruebas *in vivo* o *in vitro*.
5. Debe de tener una distribución uniforme en el capilar sinusoide.
6. Debe de tener tasas controlables y predecibles de la liberación del fármaco de tal manera que solo una cantidad específica sea liberada a las células del hígado.
7. La liberación de la droga no debe de afectar a la distribución de la misma.



8. Debe de presentar una fuga mínima durante su paso a través del estómago, intestino y/o otras partes del cuerpo.
9. El acarreador utilizado para administrar el fármaco debe de ser eliminado del cuerpo sin mostrar algún tipo de toxicidad y ningún acarreador debe de modular o inducir algún efecto patológico.
10. La preparación del sistema de administración al hígado debe de ser fácil o razonablemente sencilla, reproducible y costo-efectiva.

#### Aspectos esenciales en la formulación de sistemas de administración dirigida a hígado.

Debido a su función, la mayoría de las drogas pueden ser rápidamente eliminadas a través del hígado. De manera normal, la mayoría de las drogas alcanzan la zona hepática en altas concentraciones, principalmente si son administradas vía intravenosa, sin embargo, sigue siendo necesario direccionar la administración de las formulaciones debido a que el hígado se encarga de la captura, detoxificación, transformación metabólica y la excreción de xenobióticos a través de la utilización de mecanismos basados en acarreadores [43]. El principal reto es obtener una acumulación específica del fármaco en un tipo celular específico y mantener los niveles de dosificación por periodos largos.

Existen diversos receptores y mecanismos de entrada presentes en cada uno de los diferentes tipos celulares en el hígado, los cuales se presentan en la **Tabla 3**.

**Tabla 3. Receptores conocidos en linajes hepato-celulares**

Células de Kupffer	Células hepáticas estrelladas	Hepatocitos
Manosa/N-Acetil amino glucosa R	M6P/IGF II	Asialoglycoproteinas (ASG)
Galactosa	Alfa 2 Macroglobulina	Lipoproteinas de alta densidad (HDL)
Fc (Complejos inmunes, materiales opsonizados)	Ferritina	Lipoproteinas de baja densidad (LDL)
Receptor Scavenger (Clase A1, B1, B2, MARCO, CD36)	Uroplasmogeno	IgA
Fibronectina (Receptores LDL)	Trombina	Scavenger Clase B1
	Compuestos de la matrix extra celular (Integrina, colágeno tipo VI, Fibronectina Cd44)	Transferrina
		Insulina

(Adaptado de [44]).

Los hepatocitos como linaje hepato-celular diana para la administración dirigida de fármacos.

Los hepatocitos son las unidades funcionales responsables de la mayoría de las actividades metabólicas del hígado. Normalmente, se considera que la administración satisfactoria de medicamentos al hígado se logra cuando el sistema de entrega alcanza la dosificación en los hepatocitos, principalmente porque estos representan el 80% del tipo celular presente, sin embargo; es sabido que existen diversos receptores que se encuentran además de los hepatocitos en otros linajes celulares como células de Kupffer o HSC además de los hepatocitos, los cuales pueden generar multi-especificidad en la administración la que puede llevar a la degradación o mala asimilación del fármaco en cuestión.

Un sistema de administración de alrededor de 150nm diámetro pudiera evadir ser atrapado por las células de Kupffer y a través de su difusión por los sinusoides podría atravesar hacia el espacio pre-sinusoidal y alcanzar la zona de hepatocitos.

Los hepatocitos son capaces de acarrear sistemas coloidales a través de pinocitosis y endocitosis mediada por receptores.

El receptor que se ha utilizado en mayor medida en sistemas de administración coloidales ha sido el receptor de la asialoglicoproteína (ASG-R) el cual reconoce carbohidratos, principalmente galactosa, sin embargo; el umbral para la absorción de coloides a través de este receptor es utilizando sistemas de menor de 90nm en diámetro [45, 46].

Los hepatocitos son las células principalmente afectadas en diversas patologías hepáticas tales como hepatitis viral (A, B y C), estatohepatitis inducida por alcohol (AHS), estatohepatitis no inducida por alcohol (NAHS) y algunas enfermedades genéticas como la enfermedad de Wilson, hemocromatosis, etc.

Para poder reducir los efectos secundarios y aumentar el efecto terapéutico de los medicamentos, se han desarrollado diversos sistemas de administración selectiva a hepatocitos, los principales se mencionan en la **Tabla 4**.

**Tabla 4. Sistemas de administración dirigida de fármacos a hepatocitos**

Tipo hepato-celular diana	Fármaco	Resultado	Referencia
Hepatocitos	Iododexyuridina	Al aislar las células hepáticas después de la inyección intravenosa de IDU, se pudo concluir que puede ser asimilado en Hepatocitos.	[47]
	Primaquina (PQ)	La emulsión preparada funciona como un sistema de entrega para dirigir su administración en hepatocitos en la terapia de <i>malaria vivax</i>	[48]
	5-Fluoracil (5-FU)	Nano partículas de Zeina fueron administradas en hígado a través de inyección intravenosa.	[49]
	Poletenil Gilcol, poli galactosidado, cubierto de polyetilamina (Gal-PEG-CHI-G-PEI)	Gal-PEG-CHI-G-PEI, aumenta la eficiencia de la transfección y la especificidad en hepatocitos in vivo e in vitro, con posible utilización para terapia génica	[50]
	Vitamina K5 y citosina arabinosa utilizando ácido L-glutámico y dextraan carboximetilado	Administración específica en Hepatocitos	[51]
	Liposomas Probucol	Hepatocitos pueden utilizar liposomas cargados con probucol	[52]
	Calceina, GFP	Proteína de envoltura L del virus de la Hepatitis B fue utilizada como nanopartícula en la administración de fármacos y fluoróforos a hepatocitos ex vivo e in vivo	[53]

Limitantes de la administración controlada de fármacos utilizando VLPs y VPs hacia hepatocitos.

Dentro de las alternativas que se han mostrado anteriormente en el ámbito de la administración dirigida de fármacos, las VPs y VLPs se perfilan como una alternativa eficiente que contribuye a los requerimientos necesarios para el diseño óptimo de administración de medicamentos de liberación espacio-temporal controlada.

Es de notar, que solo el trabajo realizado por Yamada *et al.* [53] ha utilizado un acercamiento a la administración dirigida de fármacos utilizando VLPs hacia hepatocitos. En este trabajo se reporta la utilización de la proteína de envoltura L del virus de la Hepatitis B, la cual contiene una zona denominada péptido pre-S1, donde los aminoácidos correspondientes del 108-119, funcionan como un ligando específico a hepatocitos. Sin embargo, el principal problema en la formulación y administración de dichas VLPs huecas se encontró en 2 factores principales: 1. biodistribución no óptima, ya que solo el 78% de las partículas alcanzaron su localización en la zona anatómica específica (hepatocitos) y, 2 los rendimientos de carga de calceína y GFP en las nanopartículas no supero el 35% w/w de encapsulación, debido a la utilización de electroporación como método de carga.

Diversos autores apuntan a la mejora en la funcionalidad, direccionalidad y distribución farmacéutica de las formulaciones dirigidas a alguna zona anatómica en particular. La mejora de estos parámetros se logra al combinar elementos presentes en el microambiente anatómico, así como de elementos externos los cuales puedan ser modulados bajo estímulos propios de alguna etiopatología (Tumores, Fibrosis, aumento en la vasculatura) o bajo la modificación de los



sistemas de administración (Sistemas conjugados con receptores celulares específicos, recubrimiento con biomateriales (Lípidos) o sintéticos (PEG)). Sin embargo, a la fecha las modificaciones ya sea utilizando materiales sintéticos o biológicos, se han visto limitadas por la naturaleza de la interacción de dichos conjugados, es decir, es necesario modificar la estructura nativa de los sistemas virales de entrega a través de modificaciones genéticas para poder permitir la inclusión de ligando externos.

La ventaja que representa la utilización de un sistema con tropismo evolutivamente adquirido el cual a su vez esté conformado solamente de los elementos necesarios para cumplir su función como sistema de administración hepato-dirigido puede ser la solución a diversos problemas a los presentes problemas de la utilización de VLPs como sistemas de administración hacia los hepatocitos. Aunado a esto, los procedimientos para la encapsidación de drogas de interés, deben de ser mejorado considerablemente.

Partículas similares a virus del Virus de la Hepatitis C como sistema de administración dirigida de fármacos a hepatocitos.

#### Generalidades del Virus de la Hepatitis C

El virus de la Hepatitis C (VHC) es un virus de RNA de cadena sencilla positiva, perteneciente al género *Hepacivirus* de la familia *Flaviviridae*. Es el responsable de la Hepatitis tipo C en la cual, si no es tratada en etapas tempranas, desencadena en fibrosis hepática y cirrosis, las cuales posteriormente llevan a problemas severos de cáncer hepático (carcinoma hepatocelular) y finalmente a falla hepática y muerte [54].

Según información de la OMS actualmente se estima que existen de 130 a 150 millones de personas están infectadas con el virus de la Hepatitis C, correspondiendo al 3% de la población actual, con un promedio de 3 a 4 millones de nuevas infecciones cada año [55].

VHC es un virus envuelto, es decir, además de su estructura primaria (nucleocápside) cuenta con una membrana adquirida en el momento de su maduración proveniente de la membrana del retículo endoplásmico del hospedero donde se replica. La longitud del RNA positivo es de 9.6 Kb, el cual codifica un simple origen de replicación (ORF) de 3,006-3037 codones. El genoma viral es traducido directamente para producir una poli-proteína que es co y post-traduccionalmente procesada por proteasas virales y celulares en 10 proteínas.

La región amino terminal de la poli-proteína codifica 3 las proteínas estructurales, las cuales forman la estructura final del viroide: core, que forma la nucleocápside, y 2 glicoproteínas de envoltura E1 y E2.

Las proteínas no estructurales (NS): p7, Ns2, NS4, NS5A y NS5B son codificadas mediante el carboxilo terminal de la poli-proteína. Las proteínas no estructurales son expresadas en células infectadas por los virus, pero no son incorporadas en las partículas virales y funcionan para coordinar los aspectos intracelulares de la replicación del VHC, incluyendo la síntesis de RNA, modulación de la defensa del hospedero y el ensamble viral [56].

### Biofísica y estructura del Virus de la Hepatitis C

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación, la estructura de las glicoproteínas o una reconstrucción 3D del virón permanecían aún elusivas. Las partículas producto del desarrollo en líneas celular híper-permisibles de hepatocitos y/o de pacientes infectados con el virus, consisten de una nucleocápside la cual contiene el genoma viral, envuelta por una doble membrana derivada del retículo endoplásmico del hospedero que sirve de zona de anclaje donde 2 glicoproteínas (E1 y E2) se proyectan sobre la superficie a través de su ensamble como heterodímeros [56-59]. VHC fue propuesto como un nuevo virus infeccioso en 1975 [60] y formalmente identificado en 1989 [61], desde entonces diversos grupos alrededor del mundo han podido identificar un total de 7 genotipos y 67 sub-tipos [62].

Diversos estudios de microscopía electrónica (EM), han indicado que partículas maduras del HCV pueden variar desde 40-100 nm en diámetro, son pleiomórficas, es decir que carecen de simetría regular obvia y no muestran elementos característicos en su superficie. Además, contiene centros muy densos en electrones [63].

Una de las características más interesantes de partículas altamente infecciosas (bajas tasas de partículas virales por unidad infecciosa) de VHC producidas en cultivo celular (VHCcc) o aisladas de pacientes infectados, es su inusual densidad de flotación ( $\leq 1.10\text{g/mL}$ ) [64], la cual es muy baja comparada con otros tipos de virus de RNA. Esta baja densidad de flotación se explica por la interacción con lipoproteínas tanto en el suero de pacientes como en los medios extra-celulares de los cultivos. Además de lipoproteínas nativas de los sueros, diversos estudios han demostrado que las partículas de VHC también se ven asociadas con apolipoproteínas como: ApoA-I, apoB-48, ApoB-100, apoC-I y ApoE [65]. Debido a esta asociación con lipoproteínas sugiere que las partículas del VHC forman híbridos denominadas "Partículas Lipovirales (LVP)" las cuales pueden facilitar la entrada del virus hacia los hepatocitos y protege al virus de una neutralización inmunogénica [57].

Ciclo de vida (Entrada, replicación y ensamble del Virus de la Hepatitis C.

El ciclo de vida de un virión de VHC infecciosos (que tiene material genético para replicarse) consiste de 3 grandes pasos: 1. Entrada, 2. Replicación y 3. Ensamble y maduración.

### **Entrada.**

Es quizá el elemento más estudiado de su ciclo de vida. En primera instancia, las partículas de VHC circulan en la sangre, abriéndose paso hacia el hígado, donde a través de la vena porta pueden llegar a los sinusoides y después al espacio de Disse (pre-sinusoide) donde se encuentran con la pared de hepatocitos altamente polarizados. Una vez que la partícula se encuentra cerca de la superficie de un hepatocito, reconoce diversos receptores en su membrana y después de un



complejo juego de cascadas de señalización, el virión es internalizado a la célula a través de endocitosis mediada por clatrina [68].

La clatrina es un andamio celular utilizado por las vesículas de unión a membrana celular, conocidos como endosomas en citoplasma de los hepatocitos. Diversos virus utilizan la internalización mediada por clatrina y regularmente requieren la interacción con solo algunos receptores para iniciar el proceso de endocitosis, sin embargo VHC requiere la interacción con diversos receptores en los cuales son necesarios para diversos propósitos como cambios conformacionales, inducción de señal celular y la primación de las glicoproteínas de envoltura de VHC para poder iniciar el proceso de la internalización mediada por clatrina y su posterior acidificación (**Figura 5**). Existen 5 receptores esenciales para que el virión pueda entrar a la célula: CD81, receptor scavenger clase B miembro 1 (SRB1 o SCARB1), claudina 1 (CLDN1), ocludina (OCLN) y el receptor de absorción de colesterol Niemann-Pick C1 tipo 1 (NPC1L1) [68]. Aunque el proceso de entrada del VHC sigue aún en debate, por consiguiente el proceso de identificación e internalización es el siguiente:

1. El anclaje inicial de HCV hacia los hepatocitos ocurre a través de interacciones de baja afinidad de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL-R) y glicosaminoglicanos (GAGs) presentes en los proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPGs), los cuales forman parte de la matriz extra-celular del hígado de manera nativa [66]. El receptor de LDL-R puede no ser esencial, pero puede ser necesitado para una replicación óptima del virus en células infectadas [67].

2. Posteriormente, la actividad de transferencia de colesterol de SRB1, putativamente pudiera funcionar como disociador las partículas lipoproteínas de VHC. Así mismo, debido a que la zona de anclaje de E2 esta enmascarada por una zona hipervariable, diversos estudios han demostrado que la interacción con SRB1 lleva a cabo un cambio conformacional en E2 antes de que este receptor pueda ser utilizado en el siguiente paso por CD81 [69].

3. Un paso clave en la entrada del HCV es el movimiento lateral de las partículas de HCV unidas a CD81 hacia las "Tight-junctions" (Zonas lateral de unión entre 2 hepatocitos) de los hepatocitos hacia su interacción con el siguiente receptor CLDN1.

CD81 fue el primer receptor identificado, es miembro de una familia de proteínas de superficie relacionada que tienen 4 dominios, definida como una tetraspanina, la cual es expresada de manera casi absoluta en la superficie de hepatocitos y se ancla a la proteína de E2 de manera estable. Las tetraspaninas contienen pequeños amino terminales y largos carboxilos terminales de manera extracelular los cuales contienen motivos conservados de residuos de cisteínas unidos a través de puentes de disulfuro.

Estudios han indicado que la interacción con CD81 puede ayudar a primar las glicoproteínas de HCV mediante su activación a pHs bajos durante su entrada.

4. El tráfico de las partículas unidas a CD81 hacia las "Tight-junctions" de manera paralela, desencadena diversas traducciones de señales, incluyendo al receptor EGFR y las cascadas de señalización río abajo de la GTPasa de RAS, así como las GTPpasa Rho, el cual remodela actina cortical [70].

5. La interacción de VHC-CD81 con CLDN1, induce la endocitosis mediada por clatrina [71].
6. Una vez fusionada las partículas de VHC, el genoma putativamente es liberado en el citosol, donde es directamente traducido para producir la poliproteína viral e iniciar la replicación posteriormente del virus.

### **Replicación y maduración.**

El proceso de replicación y ensamble, aún no es bien entendido, sin embargo; diversos estudios realizados utilizando cultivo celular de hepatocitos han identificado los siguientes pasos:

Una vez que la nucleocápside ha sido desasociada dentro del citosol, empieza la replicación de diversas copias del RNA, donde partículas de VHC nacen a partir de su procesamiento y ensamble en el retículo endoplásmico, en un proceso donde las proteínas estructurales core, E1 y E2 deben de ser empaquetadas de una manera coordinada junto con el RNA para su replicación.

Nuevas partículas virales transitan a través de la vía secretoria (Aparato de Golgi y RE rugoso), donde llevan a cabo diversos procesos de maduración y probablemente adquieren su baja densidad de flotación [72]. Un proceso importante pre-ensamble es la interacción de "Lipid Droplets" citosólicos (liposomas de doble membrana que sirven de almacenamiento de lípidos y ácidos grasos como colesterol) (cLD) y la proteína core, la cual se cree que puede servir para primar el RNA fuera de la replicación hacia la traducción y el ensamble de los viriones [73]. De manera similar,

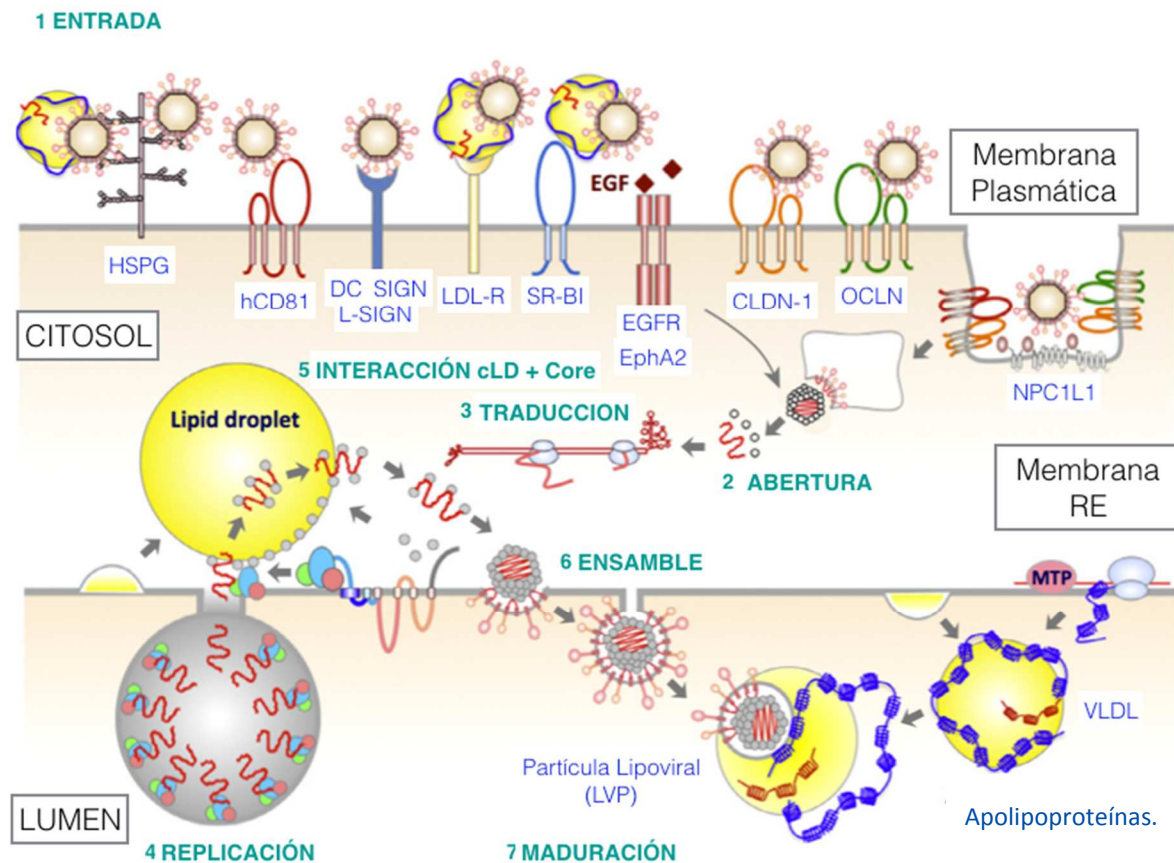


el complejo p7(viroporina)-NS2 (proteína no estructural) ensamblan el complejo E1-E2 y NS3-4A (proteína no estructural).

La interacción entre los complejos p7-NS2 y NS3-4A recluta la proteína core de los cLDs hacia los sitios de ensamble viral (Membrana del retículo endoplásmico y lumen del mismo), presumiblemente a través de una interacción proteína-proteína o a través de empacamiento dependiente de RNA facilitado por la helicasa del hospedero y posteriormente se lleva a cabo el ensamble de la nucleocápside en el mismo sitio **[74]**.

Durante el proceso de maduración, las partículas de VHC adquieren sus características bajas densidades de flotación, a través de la interacción con VLDL y la apolipoproteína ApoE.

Las glicoproteínas de VHC son modificadas para formar complejos glicanos, y sus puentes de disulfuro son reorganizados **[75]**.



**Figura 5. Ciclo de vida del Virus de la Hepatitis C.** 1. **Entrada:** VHC identifica diversos receptores en la superficie de hepatocitos y es internalizada a la célula a través de endocitosis mediada por clatrina; 2. **Abertura:** la acidificación en el citoplasma permite la liberación del material genético; 3. **Traducción:** RNA + permite la traducción de las proteínas estructurales core, E1 y E2; 4. **Replicación:** mediante el replicosoma dentro del lumen RE se produce más RNA de cadena +; 5. **Interacción cLD + core:** proteína estructural core interactúa con el RNA replicado y lipid droplets en citoplasma; 6. **Ensamble:** en la membrana de RE, core, E1 y E2 son ensambladas con el RNA+ para generar un virión; 7. **Maduración:** Viriones de VHC interactúan con LD en lumen de RE para generar viriones maduros de VHC. (Adaptado de [65]).

## Sistemas de cultivo celular y tipos de partículas virales del virus de la Hepatitis C.

El VHC es un patógeno estrictamente humano, por lo que su caracterización y desarrollo de sistemas de replicación fuera de su hospedero natural ha llevado un largo proceso desde que fue identificado como un virus patógeno tipo no VHA ni VHB en 1989. La propagación de VHC en procedimientos estándar de cultivo celular tal como la inoculación de células de hígado humanas no funcionó de manera tan eficiente como se esperaba [76]. En la ausencia de un modelo animal sencillo, el establecer un sistema de replicación robusto basado en cultivo celular fue uno de los principales retos, resultando en un desarrollo de 10 años desde que se logró clonar el primer genoma de VHC [77], antes de que se pudiera obtener un cultivo celular modelo [78].

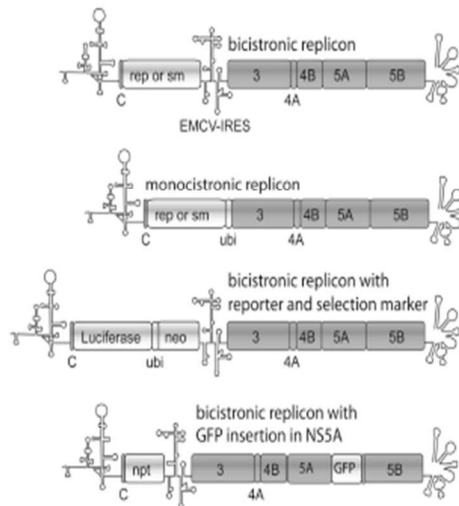
Los primeros intentos de infectar líneas celulares con VHC contenido en el suero de pacientes infectados mostraron muy bajos rendimientos, y teniendo en todos los casos una replicación muy variable y baja, por lo tanto; se necesitaba hacer uso de técnicas muy sensibles, basándose principalmente en métodos de RT-PCR, y donde la detección de proteínas virales por western blot o inmunofluorescencia era prácticamente imposible.

Con la disponibilidad del primer genoma clonado de VHC, los sistemas basados en transfección se volvieron una realidad. Estos sistemas consisten en el uso de una copia de cDNA completo de VHC insertado río abajo de un promotor de un bacteriófago, usualmente del T7 y un sitio de restricción colocado justo en el extremo 3' del final de la secuencia viral. El vector es restringido con esta enzima y

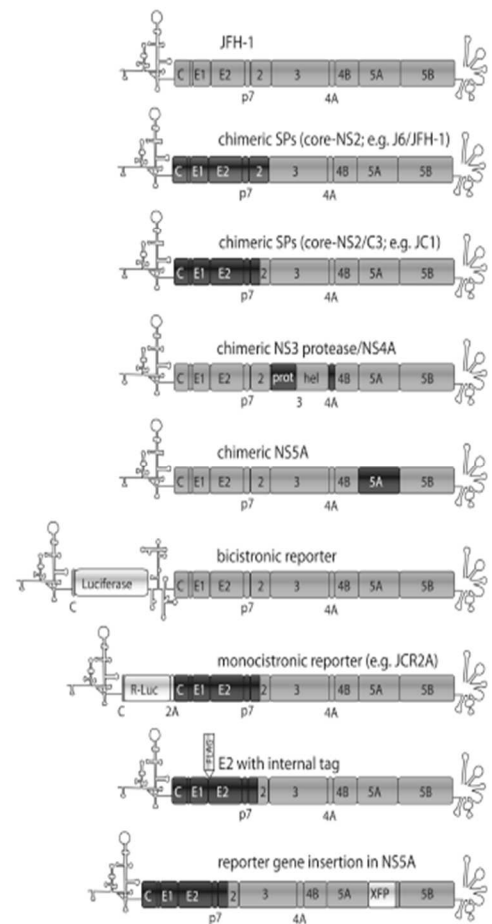
el cDNA viral se utiliza para una transcripción *in vitro* utilizando la polimerasa de RNA de T7, la cual genera transcritos con los extremos 5' y 3' del RNA viral. Sin embargo, diversos problemas como la correcta maduración y problemas de la detección de partículas por técnicas de microscopía o inmunofluorescencia dificultaron este desarrollo. Aunado a esto, no se conocía que línea celular sería totalmente permisible para la replicación de VHC, existían secuencias incorrectas o incompletas en los extremos 5' y 3' del genoma debido a que es sumamente complicado obtener clonas de estructuras de segundo o mayor orden y los genomas virales utilizados pudieran contener mutaciones no deseadas [79].

Estas predicciones terminaron por ser ciertas cuando se determinó por 2 grupos de investigación [80, 81], y que de manera independiente identificaron el verdadero extremo 3' a partir de secuencias consenso de VHC, específicamente utilizando el genotipo 1a de la cepa H77; demostraron que estos genomas eran infecciosos, al inocular de manera exitosa chimpancés. Sin embargo, la cepa H77 no pudo ser replicada en células de cultivo celular. Eventualmente, diversos sistemas de auto-replicación autónoma se generaron partiendo de la mejora de selección de los sitios IRES de replicación y de la selección de la inserción de las secuencias de las proteínas estructurales maduras. Los diversos sistemas de replicación tanto auto-replicativos como líneas que pudieron utilizarse en cultivos celulares (VHCcc) se muestran en la **Figura 6**.

**A HCV replicons**



**B HCVcc**



**Figura 6. Evolución de los genomas auto-replicativos y de cultivo celular para VHC.** Desarrollo y evolución de **A.** Replicones de VHC completos y **B.** sistemas no auto replicativos del VHC expresados en diversos sistemas de producción heteróloga y no heteróloga. Tomado de [79].

Los sistemas mencionados anteriormente, se componen de diversos elementos no estructurales, incluyendo secuencias de inicio para poder generar sistemas que puedan proveer de un número elevado de copias de VHC. Esto principalmente para poder conocer su ciclo de vida y desarrollar estrategias para combatir su virulencia, a través del desarrollo de Drogas de acción directa (DDD), las cuales han culminado en los tratamientos que actualmente se utilizan para tratar la Hepatitis C crónica en pacientes alrededor del mundo. Sin embargo, actualmente no existe una

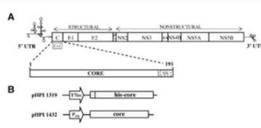
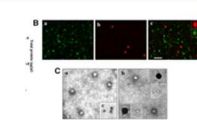
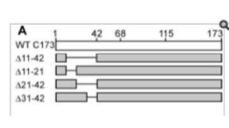
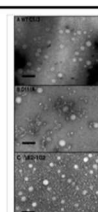
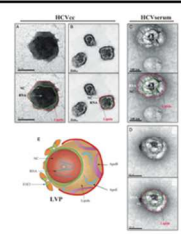
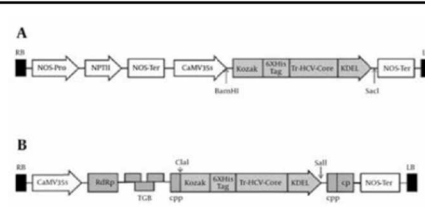
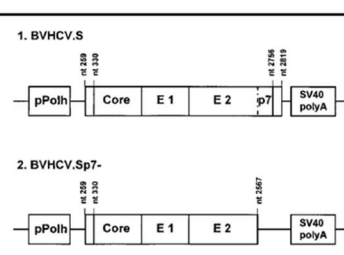
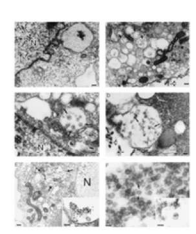
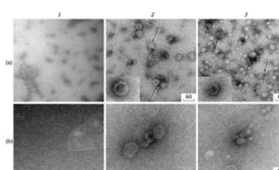
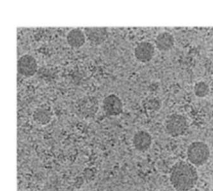


vacuna de acción profiláctica (reacción humoral, sistémica y celular) contra el VHC, principalmente por su alta tasa de mutabilidad, el gran número de genomas y sub-genomas, el reducido número de modelos animales y cultivos celulares para su reproducción y la naturaleza compleja de la respuesta inmunológica. [82].

Actualmente, existen diversos reportes de la producción de partículas virales completas, es decir, viriones auto-replicativos en sistemas celulares como hepatocitos y algunos más utilizando sistemas de replicación *in vitro*, así como utilizando células de insecto. En la **Tabla 5** se sintetizan los diversos sistemas utilizados para la expresión tanto de viriones completos como de VLPs (compuesto solo de proteínas estructurales).

Aunque normalmente las partículas virales ya sean en forma de VLP o como sistemas auto-replicativos o viriones completos se han producido en cultivo celular de linajes celulares, diversos esfuerzos por producir partículas virales en sistemas heterólogos como en células de insecto [88], han probado ser alternativas viables y han podido demostrar que es posible producir VLPs de VHC utilizando las secuencias de solo las proteínas estructurales.

**Tabla 5. Sistemas de expresión utilizados para la producción de partículas o proteínas virales del Virus de la Hepatitis C.**

Modelo de expresión	Vector de transferencia	Genotipo VHC	Proteínas expresadas	TEM	Referencia
Sf9 Células de insecto ( <i>Spodoptera frugiperda</i> )		1a	Core		[83]
Sistema de replicación libre de células		VHC 1b	Core nativa y mutantes		[84]
Células Huh 7.5 (Hepatocitos hiperpermisibles)		JFH1, genotipo 2a	Virion Completo		[58]
<i>N. Tabacum</i>		ND	Core	ND	[85]
vVHCV.S- <i>ii</i> infectado BSC-1		VHC genotipo 1b, cepa J	E1, E2 and Core	ND	[86]
Sf9 Células de insecto ( <i>Spodoptera frugiperda</i> )		VHC genotipo 1b, cepa J	Core, E1 and E2		[87]
Sf9 Células de insecto ( <i>Spodoptera frugiperda</i> )	Baculovirus: bv-C bv-E1 bv-E2 bv-E2660 bv-CE1 bv-CE1E2 bv-C+E1+E2660 (cotransfección)	Genotipo 1b, cepa 274933RU	Core, E1, E2, E2 truncada.		[88]
Sf9 Células de insecto ( <i>Spodoptera frugiperda</i> )	Bac.HCV.1a.S utilizando una sistema de expresión BAC-to-BAC en Baculovirus	HCV 1a genotipo (cepa H77)	E1, E2 y Core		[89]

## Molecular Pharming en la producción de VPs y VLPs.

La producción de fármacos (no exclusivo de biomoléculas ni proteínas de virus) a través de la expresión transitoria en modelos vegetales (Molecular Pharming) representa una alternativa bastante atractiva desde el punto de vista de escalabilidad, costo y seguridad, ya que presentan un bajo riesgo de contaminación con endotoxinas o patógenos humanos.

Las plantas han sido una plataforma económica y segura para el desarrollo de VLPs principalmente en el diseño de vacunas virales, mostrando que una gran variedad de VLPs pueden ser producidas de manera rutinaria. Debido a su maquinaria de modificación postraducciona, no tan alejada de los animales, les ha permitido producir VLPs que muestran una respuesta inmune protectora en modelos de animales [90].

Aunado a estas ventajas, el poder producir virus heterólogos en un ambiente totalmente diferente al nativo, pudiera ayudar a entender sus mecanismos de acción y estudiar diversos elementos de su ciclo de vida hasta ahora no entendidos o poco estudiados.

Respecto a la producción del VHC en plantas, hasta la fecha solo se tiene registro de la producción de la proteína core en plantas [85] utilizando una variedad de *N. tabacum* Iraní como sistema de expresión en un modelo transitorio en hojas. Sin embargo, aunque este grupo reporta geles de SDS-PAGE y pruebas inmunológicas específicas (western blot) contra la proteína core producida, no se reportan imágenes sobre la formación de nucleocápsides a partir de esta proteína estructural.



## Justificación.

Este trabajo se justifica por la necesidad de implementar mejores y nuevos sistemas de administración dirigida de fármacos, los cuales se vean favorecidos por su estructura, tamaño, tropismo y biocompatibilidad, los cuales permitan la protección de las drogas durante su traslado al sitio anatómico de acción y una dosificación modular.

También por la necesidad de generar nuevos sistemas de expresión para el Virus de la Hepatitis C, los cuales puedan ayudar a mejorar el conocimiento de su biogénesis y ciclo de vida, y, funcionar como plataforma económica y segura para la producción y uso en la generación de nuevas terapias anti-virales y el desarrollo de una vacuna profiláctica.

## Objetivos.

### Objetivo general

Expresar, purificar, caracterizar y funcionalizar partículas similares a virus (VLPs) del virus de la Hepatitis C genotipo 1a producidas de manera transitoria en *N. benthamiana*, para su uso como sistema de administración dirigida de fármacos a hepatocitos.

### Objetivos particulares

1. Expresar de manera transitoria las proteínas estructurales core, E1 y E2 del Virus de la Hepatitis C en hojas de *N. benthamiana* a través de la utilización de un vector de expresión optimizado con codones para plantas y utilizando ubiquitinas como linker del casete de expresión policistrónico.



2. Optimizar el proceso de purificación de VLPs de VHC a través de purificación por columna de afinidad y gradientes isopícnicos de sacarosa.
3. Caracterizar el sistema VLP-VHC producidos en planta a través de análisis proteicos, inmuno-ensayos, determinación de su densidad de flotación y microscopía de transmisión electrónica.
4. Funcionalizar VLP-VHC a través del marcaje fluorimétrico de las partículas y fusionar con liposomas fluorescentes como prueba de concepto para su utilización como sistema de administración dirigida a hepatocitos.

## Hipótesis.

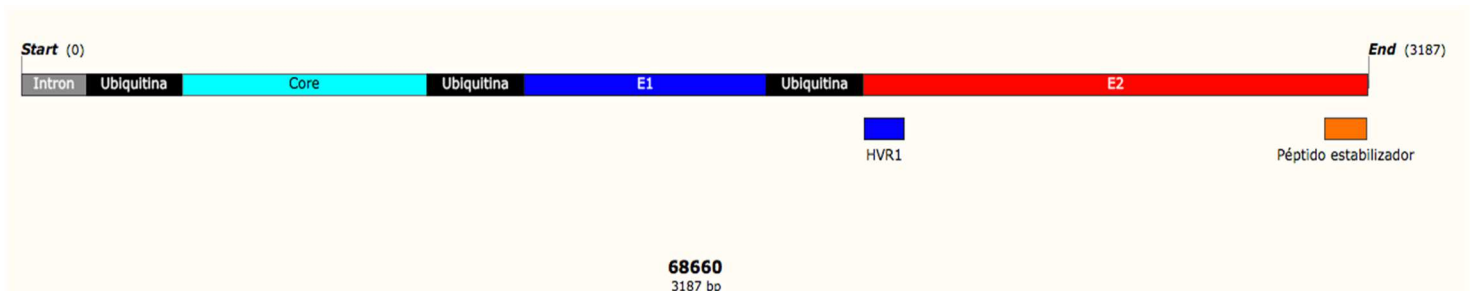
Es posible purificar, caracterizar y funcionalizar partículas similares a virus del virus de la Hepatitis C genotipo 1a, a partir de la expresión transitoria de las proteínas estructurales core, E1 y E2 en hojas de *Nicotiana benthamiana* y su fusión con liposomas para la administración dirigida de fármacos.

## Metodología.

Sistema de expresión transitoria para la expresión de VHC en hojas de *N. benthamiana*

Anteriormente se diseñó un vector de expresión con codones optimizados para plantas, el cual ha demostrado ser útil para la producción de partículas similares a virus del VHC.

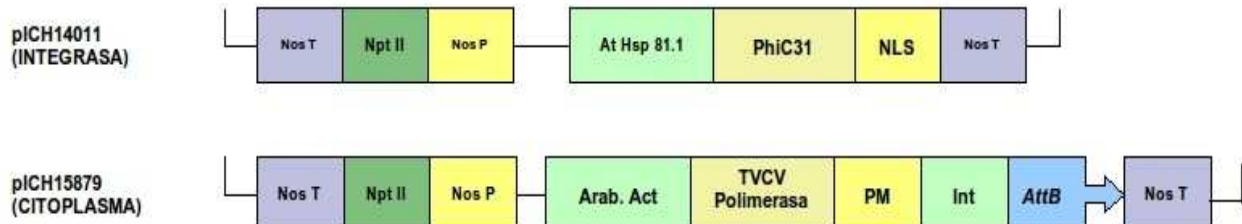
Dicho vector fue denominado 68660 (**Figura 7**), y está compuesto de un enhancer del virus del Jaspeado del tabaco, un péptido estabilizador y las tres proteínas estructurales (core, E1 y E2, genotipo 1a) del virus de la Hepatitis C fusionadas utilizando monómeros de ubiquitina. La secuencia fue sintetizada a través de Gene Script Co. (EUA) y contiene los sitios de reconocimiento y corte de las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* flanqueando todo el casete.



**Figura 7. Secuencia sintética para la expresión de VHC en plantas.**

El vector 68660 fue clonado dentro del vector de expresión 11599, utilizando los sitios de unión y corte de las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. El vector 11599, permite la selección de transformantes debido a diversos genes de resistencia, así como sitios de auto-recombinación para incorporarse a sistemas vegetales, utilizando la maquinaria y co-transfección de otros vectores de expresión como el vector de incorporación a citoplasma (pICH15879) y la recombinasa de bacteriófago PhiC31

de *Streptomyces* (pICH14011) [91]. En la **Figura 8** se muestran los vectores utilizados en la expresión en hojas de *N. benthamiana*, dicho sistema de vectores se denomina virus des-ensamblado.



**Figura 8. Vectores de co-transformación para el sistema de virus des-ensamblado.**

**Nos T:** Promotor del gen de la nopalina sintasa, **NptII:** gen de la neomicina fosfotransferasa II; **Nos P:** Promotor del gen de la nopalina sintasa, **At Hsp 81.1:** Promotor de la proteína de choque térmico Hsp81.1, **PhiC31:** gen de la recombinasa del bacteriófago PhiC31 de *Streptomyces*, **NLS:** Señal de localización nuclear, **Arab.Act:** Promotor del gen de la actina 2 de *Arabidopsis*, **TVCV Polimerasa:** gen de la polimerasa del pararetrovirus de la aclaración de las venas del tabaco, **PM:** proteína de movimiento, **Int:** Intrón, **AttB:** Sitio de unión a la recombinasa del bacteriófago PhiC31 de *Streptomyces*.

#### Agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana*.

Se realizaron pre-inóculos de las cepas de *A. tumefaciens* 3101 con los vectores de expresión: pICH14011 (Integrasa), pICH15879 (Citoplasma), 11599/68660 y como vector control (pICH7410 (GFP), utilizando medio de cultivo selectivo líquido (5mL) YEB/CB/Rf (extracto de levadura 10g/L; peptona 10g/L, cloruro de sodio 5g/L; pH 7.0; Carbenicilina 100 mg/L; Rifampicina 50 mg/L). Se realizó la incubación de los pre-inóculos durante 48h en agitación a 28°C.

Pasadas las 48h, los pre-inóculos previamente preparados fueron escalados a matraces de 250mL, utilizando el mismo medio de cultivo selectivo YEB/CB (230mL), /100mg/mL Cb) con una incubación de 24h a 28°C con agitación.

Se midió la densidad óptica (D.O) de los cultivos en matraz a una longitud de onda de 600nm en espectrofotómetro ajustando la D.O entre 0.15 y 0.3.

Se mezclaron volúmenes iguales de las suspensiones de las cepas 11599/68660, pICH14011 y pICH15879 para la mezcla de infiltración del gen, y de las cepas pICH7410, pICH14011 y pICH15879 para la mezcla de infiltración de GFP. En todos los casos, se centrifugaron las mezclas a 4000 rpm durante 5 minutos y fueron resuspendidas en un amortiguador 10 mM MES (ácido morfolino etanosulfónico) pH 5.5 suplementado con 10 mM de MgSO<sub>4</sub>. Se agregó acetosiringona al buffer, para alcanzar una concentración final 200 μM.

Se realizó la agroinfiltración de plantas de *N. benthamiana* crecidas en laboratorio de 5 a 6 semanas, a través de la infiltración en la parte abaxial de las hojas con mayor tamaño utilizando una jeringa sin aguja de 5mL.

Se incubaron todas las plantas en cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16h luz y 8h oscuridad a 25°C manteniendo la humedad, de 5 a 7 días, cuidando que el tejido no se marchitara o deshidratara.

Se observó la expresión de la planta control agroinfiltrada con GFP utilizando una lámpara ultra violeta en cuarto oscuro.

Finalmente, las hojas fueron cosechadas, congeladas con nitrógeno líquido y guardadas a -70°C para su posterior extracción.



Proceso de bioseparación de VLPs (VHC) de *N. benthamiana*.

*Preparación de buffer de acetatos a pH 5.*

Se prepararon las soluciones A (0.2M ácido acético (11.55ml en 1L)) y B (0.2M acetato de sodio (16.4g de  $C_2H_3O_2Na$  en 100mL)) a pH 5.

Para preparar un volumen de 200mL totales de buffer de acetatos, se utilizaron 29.6mL de la solución A + 70.4mL de solución B, aforado a 200mL.

Para un lote (30 plantas~300g hojas peso seco) se utilizó alrededor de 1.5L de buffer de acetatos a pH=5.

Para preparar 1.5L de Buffer de acetatos a pH=5, se agregaron 222mL solución A + 528mL solución B, aforado a 1.5L de agua-milli-Q estéril.

*Lisis enzimática de N. benthamiana.*

50g de hoja congelada de *N. benthamiana* anteriormente agroinfiltrada con el vector 11599/68660, fueron pulverizadas utilizando nitrógeno líquido, mortero y pistilo. El polvo de tejido fue transferido a un frasco Erlenmeyer de 250mL y se añadió 200mL de buffer de acetatos pH=5, 80U de viscozym (alrededor de 690 $\mu$ L por cada 50g de hojas) y 200  $\mu$ L de leupectina (1-2  $\mu$ g/mL) o 200  $\mu$ L del coctel inhibidor de proteasas y se incubó la solución en agitación a 37°C por 2 h.

Es importante realizar la lisis enzimática utilizando como máximo 50g en 200mL de buffer de acetatos pH=5.0 para evitar la saturación de enzima en el medio.

*Centrifugación:*

Una vez terminada la reacción de la enzima hidrolítica, se realizó la centrifugación para obtener la fracción de las proteínas solubles, a 9,000rpm por 20min a 4°C.

### *Remoción de debris (Cheesecloth o tapa-bocas).*

Después de la centrifugación, se utilizaron tapabocas (sin resorte) y embudo para filtrar todo el volumen del sobrenadante recuperado después de la centrifugación a baja velocidad. Después de la filtración, se obtuvo alrededor de 160mL-180mL por cada 200mL de sobrenadante, sin debris.

### *Microfiltración.*

Después de la remoción de debris celular, fue necesario filtrar el sobrenadante, por lo que este fue filtrado por 3 diferentes filtros: 0.8 $\mu$ m, 0.45 $\mu$ m and 0.22 $\mu$ m utilizando bomba al vacío y unidad de filtrado Milli-Pore, iniciando por el filtro de 0.8 $\mu$ m para evitar saturación, continuando con el filtro de 0.45 $\mu$ m y finalmente el de 0.22 $\mu$ m. Finalizando la microfiltración, se obtuvo alrededor de 140mL-170mL de sobrenadante por cada 200mL de sobrenadante inicial.

### *Diálisis.*

Se utilizó 1L del buffer Tris 100mM, pH=7, para realizar la diálisis a través de una membrana de corte de 3.5KDa. Se utilizó 150mL de sobrenadante previamente microfiltrado, dentro de alrededor de 40-45cm (longitud) de membrana, en 1Lt de Tris 50mM, pH=7.0 toda la noche (al menos 16h), utilizando agitación con agitador magnético (utilizando clamps y de ser necesario hilo para asegurar el sobrenadante al momento de la agitación), sin exceder el límite de 150mL de sobrenadante en 1L de Tris 50mM, pH=7.0. Se guardaron todos los dializados a 4°C previo a su posterior purificación.

### *Purificación por columna de afinidad.*

Una vez realizada la diálisis del sobrenadante la cual contenía la fracción soluble y a las partículas del VHC, se realizó la purificación por afinidad utilizando una columna de heparina (HiTrap Heparin HP, 5mL, GE) la cual ha sido reportada en la purificación de partículas virales del virus de la Hepatitis C producidos en células de hepatocitos y otros virus [92]. El proceso de purificación se llevó a cabo de 10 a 11 veces (para utilizar todo el volumen de un lote de plantas completo) utilizando un FPLC, Akta Purifier 100 de GE, realizando el siguiente ciclo de purificación:

**1er Lavado:** Lavado de la columna con 10 a 15CV (1CV (volumen de columna) =5mL) de Agua Mili-Q estéril y filtrada.

**Equilibrio:** Equilibrio de la columna utilizando de 10 a 15 CV con el Buffer A = 50mM Tris, pH=7.0.

**Paso de columna:** Se utilizaron 45mL of de sobrenadante anteriormente dializado con el buffer a través de su disposición utilizando el administrador de muestra (superloop, 50mL)

**2ndo lavado:** Se lavó la columna con 1 volumen de columna de buffer A, para eluir toda aquella proteína que no se absorba en la columna.

**Gradiente Linear:** Se realizó un gradiente lineal aumentando de 0 to 50% en la concentración de Buffer B (50mM Tris, 1M NaCl pH=7.0) durante 30 volúmenes de columna. Cada volumen eluido fue recolectado a través de un colector de muestras automático para su posterior procesamiento.

**Concentración de elusiones:** Se recuperaron todas las fracciones pertenecientes a la elusión A6, correspondiente en porcentaje de buffer B a 8.2% y 9.9% y en

concentración en NaCl de 82mM a 99mM y 50mM Tris, pH=7. Posteriormente cada elusión fue concentrada utilizando centricones de 30KDa de corte con capacidad de 5mL a través de la centrifugación (4 a 5 veces a 6,000RPM durante 5 min a 4°C). Las muestras concentradas fueron guardadas a 4°C hasta su posterior purificación.

Purificación por gradientes de sacarosa.

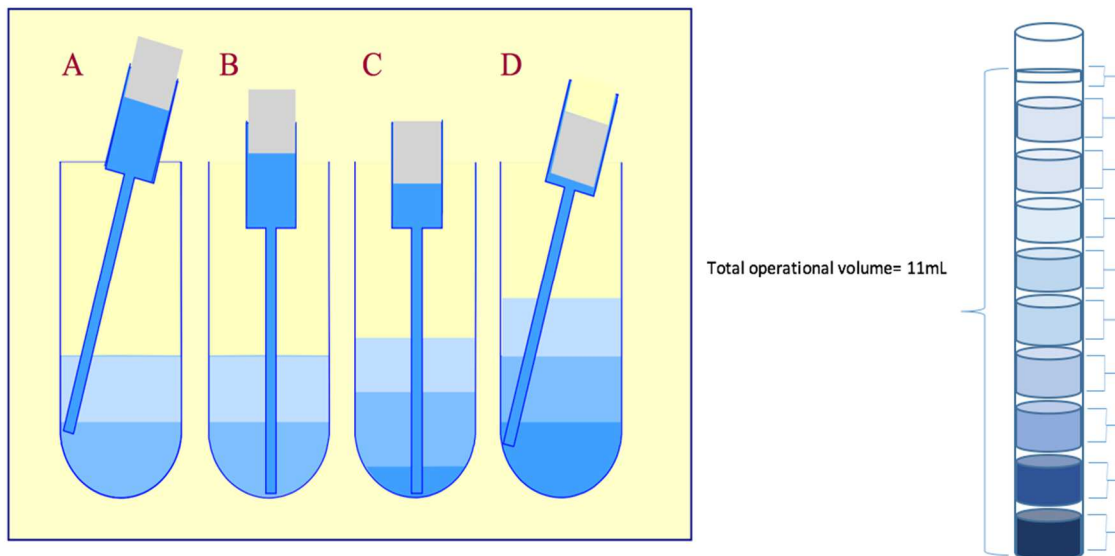
Se generaron gradientes de sacarosa no continuos (escalonados), de 20% a 40%, con un aumento entre cada concentración de 2.5%, y de 20% a 60% con aumento de 5%, a partir de una solución stock de sacarosa 80% en Buffer Tris, 50mM, pH=7.0, como se muestra en la siguiente tabla.

**Tabla 6. Gradientes de sacarosa discontinuos.**

<b>Gradiente de sacarosa 20%-60% (Aumento 5%)</b>				
Volumen final de fracciones(mL)	%Sacarosa (v/v)	% del Stock de Sacarosa	Volumen del Stock (mL)	Volumen de Buffer Tris 50mM (mL)
15	20	80	3.75	11.25
	25		4.69	10.31
	30		5.63	9.38
	35		6.56	8.44
	40		7.50	7.50
	45		8.44	6.56
	50		9.38	5.63
	55		10.31	4.69
	60		11.25	3.75
<b>Gradiente de sacarosa 20%-40% (Aumento 2.5%)</b>				
Volumen final de fracciones(mL)	%Sacarosa (v/v)	% del Stock de Sacarosa	Volumen del Stock (mL)	Volumen de Buffer Tris 50mM (mL)
15	20	80	3.75	11.25
	22.5		4.22	10.78
	25		4.69	10.31
	27.5		5.16	9.84
	30		5.63	9.38
	32.5		6.09	8.91
	35		6.56	8.44
	37.5		7.03	7.97
	40		7.50	7.50

Se utilizaron tubos, Beckman, Thinwall, Ultra-Clear, 13.2mL, 14x89mm, con un volumen máximo de operación de 10mL (incluyendo la muestra).

Cada fracción de arriba hacia abajo, se formuló con un volumen máximo de 1mL. La preparación de los gradientes se realizó utilizando la siguiente técnica: Se superponen soluciones más densas debajo de las menos densas (de 20% a 60%) iniciando por la solución de 20% de sacarosa, utilizando una jeringa quirúrgica de largo alcance (**Figura 9**). Entre cada super-posición es importante realizar lavados de la jeringa con el Buffer de Tris, para evitar problemas de mezcla con las concentraciones anteriores.



**Figura 9. Método de preparación de gradientes de sacarosa.** Técnica de superposición de gradientes de sacarosa. Del paso A al D, se ejemplifica como superponer fracciones más densas, debajo una de otra hasta obtener un volumen final de operación desaseado

Al finalizar, es importante señalar con marcador mientras sea visible los límites de cada fracción de sacarosa para poder identificar que sección extraer. Finalmente, después se superponen todas las fracciones de sacarosa, la muestra anteriormente concentrada se pone con cuidado en la cima del tubo.

Se centrifugó a 15,000xg (34,800RPM para el rotor SW41Ti, Beckman-Coulter) por 22h a 4°C cada tubo en gradiente y cada fracción fue colectada utilizando una aguja de calibre suficiente para poder perforar los tubos.

Análisis e identificación de proteínas.

*Gel SDS-PAGE desnaturalizante.*

Se realizó el corrido de geles de poli-acrilamida y teñido con azul de Coomasie en geles de 12% (Separador) y concentrador de 5% a velocidad constante de 90V durante 2h. Los geles fueron fijados, teñidos y desteñidos con las soluciones reveladoras correspondientes.

*Cuantificación de proteína total soluble, por el método de Bradford.*

Se realizó una curva de calibración utilizando BSA para encontrar los valores correspondientes a las absorbancias de las diferentes concentraciones de una muestra stock. Se obtuvo la siguiente regresión lineal:  $\frac{x-0.4538}{0.1622}$ ; donde X es la absorbancia y el resultado se obtiene en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

La medición de la concentración de muestras utilizando el método de Bradford se realizó utilizando 5 $\mu\text{L}$  de muestra diluidos en 250 $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford. Las muestras a analizar se dejaron reaccionar durante 10min en cámara de 96 pozos evitando su interacción con la luz. Finalmente se midió la absorbancia en espectrofotómetro de luz a 595 nm.

*Western blot-quimioluminiscente y fosfatasa alcalina.*

Para la técnica de western blot, se utilizaron los anticuerpos primarios monoclonales a las proteínas estructurales del Virus de la Hepatitis C Anti-core (Thermo scientific, Hepatitis C Virus core Antigen Antibody C8-50, catalog number: MA1-080) y Anti-

E1(US Biological) y E2(US Biological). Los anti-cuerpos secundarios utilizados son anti-Mouse y fueron utilizados con el kit de revelado quimioluminiscente de Sigma Aldrich (WB7104 Anti-Mouse) y Anti-Goat con la fosfatasa alcalina de Sigma Aldrich como método de revelado.

### **SDS-PAGE y transferencia a membrana PVDF:**

Se corrieron 2 geles SDS-PAGE de 15% iguales con las fracciones proteicas que se quieran analizar, cargando 20 $\mu$ g de cada fracción (37min 90V y después 50min a 120V). Uno de los geles fue fijado, teñido y desteñido como cualquier gel SDS-PAGE y fue guardado como el gemelo del gel a transferir para realizar el western blot.

Se cortó una membrana de PVDF de 9.5cmx7.2cm y 6 filtros para blotting del mismo tamaño por gel a transferir.

Se activó la membrana de PVDF durante 2 min utilizando metanol absoluto pre-enfriado en recipientes de plástico y después se pasó a buffer de transferencia (25mM tris, 190mM glicina, 20% metanol) pre-enfriado en hielo por 5 min.

Se realizó la impregnación del gel a transferir durante 20min en buffer de transferencia

Se realizó la impregnación de los 6 filtros para blotting en buffer de transferencia durante 5 minutos.

Se realizó el acomodo (de arriba hacia abajo) de los elementos para realizar la transferencia, en cámara de transferencia semi-seca (Bio-Rad): 3 filtros para blotting, membrana PVDF, gel para transferencia, 3 filtros para blotting), evitando

dejar aire entre cada uno de los elementos, aplanando con un tubo el sandwich completo. Se realizó la transferencia de proteínas del gel a la membrana, corriendo 40min a 25V.

### **Quimioluminiscencia.**

Para los anti-cuerpos E1 y core, se utilizó el kit WB de quimioluminiscencia Sigma Aldrich (WB7104 Anti-Mouse). Una vez terminada la transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF, se bloqueó la membrana utilizando 10mL de solución de bloqueo, con reactivos del kit (5mL H<sub>2</sub>O ultra-filtrada, 2mL Blocker/Diluent A, 3mL Blocker/Diluent B.), utilizando cajas de plástico para revelado del western blot. Se incubó durante 30min a 60rpm en agitador a temperatura ambiente. Se enjuagó la membrana de la solución de bloqueo 2 veces, utilizando 20mL de agua estéril durante 5min a 60rpm temperatura ambiente.

Se Incubó la membrana con la solución de anticuerpo primario (2mL, relación 1:1000) durante 1.5h (1.4mL de H<sub>2</sub>O ultra filtrada + 0.4mL solución A + 0.2 solución B + 2μL de anti-cuerpo primario), utilizando cajas de plástico para western blot.

Se lavó la membrana por 5min con 20mL de la solución de lavado de anti-cuerpo (150mL de agua ultrapura + 10mL antibody wash solution) y repitiendo o el proceso 3 veces.

Se Incubó con 10mL de la solución con anticuerpo secundario por 1h y posteriormente fue lavada con antibody wash solution, 20mL por 5 min.

Se lavó con 20mL de agua estéril por 2 min 2 veces. Se traspasó la membrana a caja de plástico y se enjuagó utilizando 2.5mL de solución de sustrato



quimioluminiscente, sin tocar la superficie. Se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 5min se mantuvo fuera de contacto con la luz. Se removió el exceso de sustrato, utilizando papel filtro con el kit sin dejar que la membrana se secase. Se realizó el revelado en cámara de foto-iluminación (Bio-Rad).

#### Microscopía de transmisión electrónica.

Las fracciones del gradiente identificadas como positivas por western blot, fueron observadas en microscopio electrónico de transmisión (TEM), utilizando tinción negativa en rejillas de níquel (200 mesh) cubiertas con formvar y sombreadas con carbono, tratadas previamente con plasma de baja frecuencia para su limpieza. El proceso de tinción se realizó en cajas Petri, utilizando 15 $\mu$ L de concentrado después de los gradientes de sacarosa sobre la parte opaca de la rejilla, incubando por 2 minutos a temperatura ambiente. La rejilla fue secada sin tocar la cara de la rejilla utilizando papel filtro en forma triangular, posteriormente cada rejilla fue teñida con acetato de uranilo al 2% utilizando 10 $\mu$ L durante 3min y se observó en el microscopio JEOL 2000 a 80 KV.

#### Formulación de liposomas.

Se generaron a partir de los fosfolípidos, 400mM fosfatidil colina (PC) extraído de soya (Avanti Polar lipids, 840054C), 400mM fosfatidil etanolamina (PE) extraído de soya (Avanti Polar lipids, 840024C) y 200mM colesterol. Los fosfolípidos fueron mezclados en relación 2:1:1, en un volumen de 1mL (2 $\mu$ L PC, 1 $\mu$ L PE, 1 $\mu$ L colesterol) de cloroformo. Se trasvasó la solución a matraz kitasato de fondo redondo con exhausto para vacío. Se mantuvo el vacío por lo menos 40min para formar un pastel de lípidos. Se re-hidrató el pastel de lípidos agregando 1mL de

buffer Tris 50mM, 100mM NaCl, pH=7 y se re suspendió (agitación manual suave) durante 30min. Se realizó la sonicación durante 6 min de la mezcla para generar lípidos uni-laminares pequeños.

Marcaje fluorescente de liposomas y VLPs.

*Marcaje fluorescente de liposomas.*

Se utilizó el marcador fluorescente lipofílico, DiO, Vybrant Multicolor Cell-Labeling Kit (Invitrogen, V22889), a través de la mezcla de 60 $\mu$ L de los liposomas anteriormente generados y 1 $\mu$ L de la prueba fluorescente DiO a 10mM.

*Marcaje fluorescente de VLPs.*

Se utilizó el marcador fluorescente lipofílico, DiD, Vybrant Multicolor Cell-Labeling Kit (Invitrogen, V22889), a través de la mezcla de 60 $\mu$ L a través de las fracciones de VLPs anteriormente purificada y 1 $\mu$ L de la prueba fluorescente DiD a 10mM.

Fusión de liposomas y VLPs fluorescentes.

Se mezclaron 50 $\mu$ L de liposomas fluorescentes + 2 $\mu$ L de VLPs fluorescentes, se agregó 1 $\mu$ L de HCL concentrado y posteriormente se sonificó la solución durante 30s.

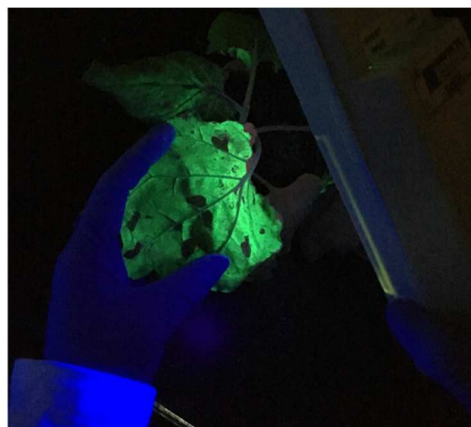
Microscopía confocal de una sola partícula

Para la visualización de partículas fusionadas se utilizó la microscopía confocal de una sola partícula, a través de un sistema de microscopía, Revolution XD diseñado por Andor Technology (South Windsor, Ct) el cual consiste de un microscopio invertido Nikon Ti y una unidad de escaneo confocal Yokogawa el cual utiliza un disco Nipkow para el procesamiento de las muestras. Las muestras fueron

excitadas a través de un objetivo inmerso en aceite con una apertura numérica de 100x (CFI APO TIRF, NA 1.49, Nikon) con un láser de 488nm de emisión (25mW) y un láser de 640nm (40mW) respectivamente. La fluorescencia resultante fue colectada a través del objetivo y filtrada a través de un filtro de emisión (525/30 o 685/40) para eliminar la luz residual del láser y grabado con una cámara CCD iXon Du-897-B (Andor technology). Las imágenes fueron procesadas y analizadas utilizando los softwares Andor iQ e Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

## Resultados.

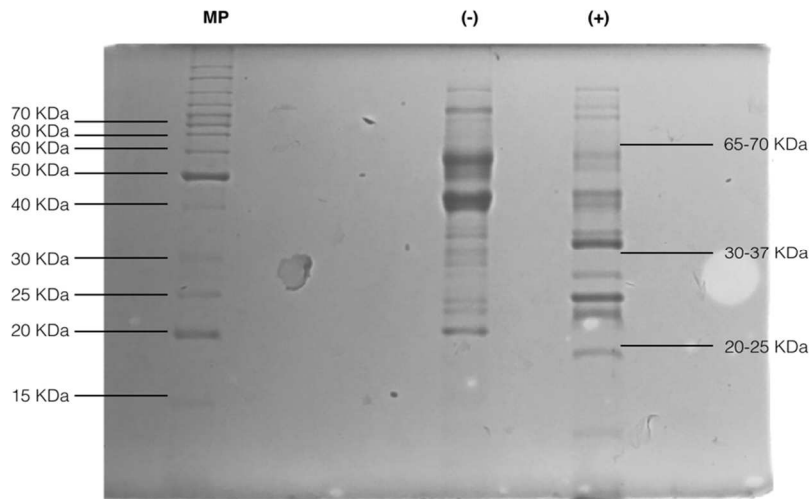
Comprobación de expresión de sistema recombinante transitorio en *N. benthamiana*  
Con el fin de comprobar la expresión y correcto funcionamiento de la expresión transitoria del sistema recombinante en *N. benthamiana* (pICH15879, pICH14011 11599/68660), se utilizó la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en el vector pICH7410. Pasados los 5 días, se comprobó la expresión de la proteína verde fluorescente utilizando luz ultravioleta (**Figura 10**).



**Figura 10. Expresión de GFP en *N. benthamiana* utilizando el sistema de virus desensamblado.** Visualización de la proteína GFP en plantas agroinfiltradas con el vector pICH7410, como control positivo de la expresión transitoria de proteínas en *N. benthamiana* utilizando el vector del virus desensamblado.

### Análisis proteico.

Inicialmente se contaba con un método de extracción de proteínas totales utilizando como buffer de extracción metabisulfito 1% en relación 1:1.5 (p/v) de hoja seca y el buffer de extracción de fosfato de sodio (50 mM de amortiguador fosfato de sodio pH 7.4, 100 mM NaCl, 10mM EDTA, 1% Tritón X-100, 25 mM ácido ascórbico, 0.1% coctel inhibidor de proteasas) en una proporción 1:1 (p/v), sin embargo los rendimientos e inclusive la identificación de los tamaños de proteínas al momento de realizar la electroforesis en gel de SDS-PAGE no coincidieron con los tamaños reportados para las proteínas estructurales core, E1 o E2. Debido a esto se realizó la optimización de la extracción utilizando además de la pulverización del tejido en nitrógeno líquido, la reacción enzimática de Viscozym (Invitrogen), la cual es una enzima hidrolítica que permite solubilizar la proteína no soluble del tejido foliar de *N. benthamiana*. Aunado a esto, se utilizó la separación de las proteínas virales a través de la separación por columna de afinidad (heparina). Se realizó la identificación de las proteínas a través electroforesis en gel SDS-PAGE (15%) (**Figura 11**) de las fracciones obtenidas después de la purificación de las columnas de heparina, especialmente en la elusión correspondiente a la concentración de 100mM de NaCl.



**Figura 11. SDS-PAGE de fracciones proteicas después de la purificación por cromatografía de afinidad. MP=Marcador de peso molecular, (-) Control negativo, fracción soluble de hoja de *N. benthamiana* sin expresar el vector 11599/68660, (+) fracción purificada a través de la columna de heparina de hojas expresando el vector 11599/68660, elusión correspondiente a 100mM de NaCl.**

Se pudo observar de manera clara en la fracción extraída después de la columna de heparina, bandas correspondientes a los pesos de proteínas reportados para las proteínas estructurales del VHC, (Core=20-25KDa, E1=30-32KDa, E2=60-70KDa) por lo que se procedió a realizar pruebas de inmunoidentificación de las proteínas core, E1 y E2. Además de los pesos relativos a las proteínas de VHC, se pudieron observar diferentes bandas correspondientes a diversas proteínas vegetales, probablemente debido a la realización manual (jeringa de inyección manual, 5mL) de dicho proceso, por lo que fue necesario realizar una purificación posterior para obtener solo VLPs de VHC. Se realizó la separación en columna de heparina, utilizando un Akta FPLC GE para identificar las fracciones intermedias a de elusión a través de un gradiente de pasos reducidos de NaCl y la ultra centrifugación en



gradientes de sacarosa, aprovechando la densidad de flotación peculiar de las VLPS del VHC.

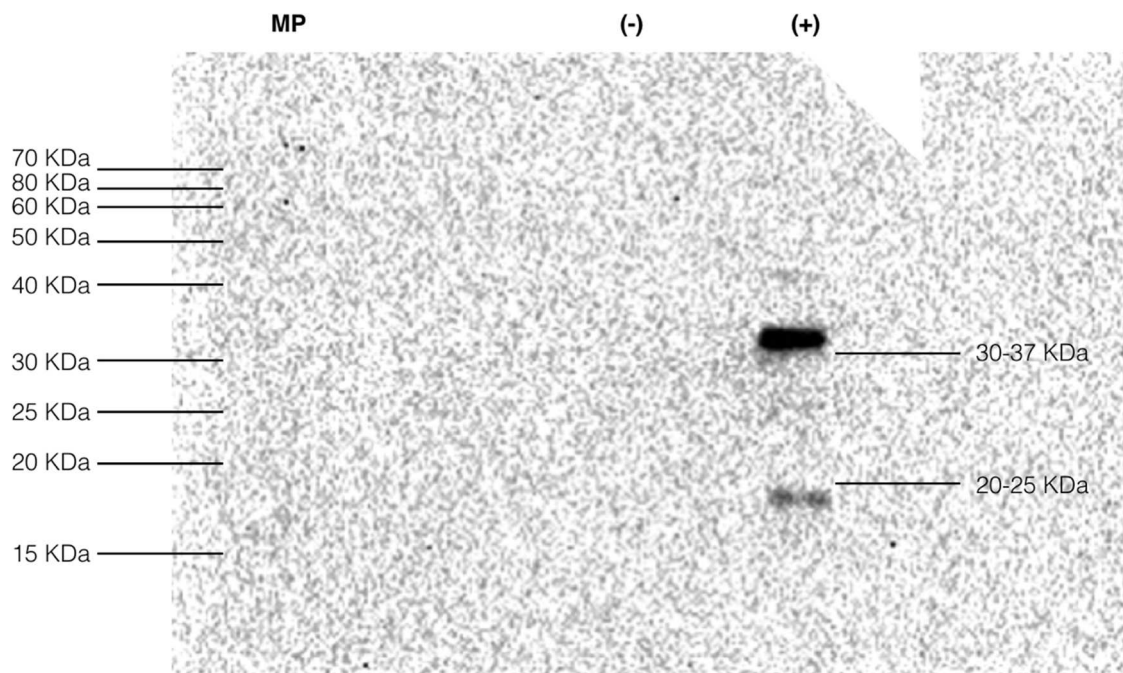
#### Cuantificación proteica.

Se realizó la cuantificación de proteína total soluble, utilizando el método de Bradford, en la purificación manual con columna de heparina. Se obtuvo una absorbancia de 0.548 para el paso de columna y en la fracción de 100mM de NaCl de 0.522. Utilizando la regresión lineal:  $\frac{x-0.4538}{0.1622}$ , donde x corresponde a la absorbancia y se obtiene la concentración de proteína en mg/mL. Para la fracción soluble se obtuvo una concentración de .58mg/mL y para la fracción de 100mM NaCl, correspondiente a las proteínas estructurales de VHC, una concentración de 0.42mg/mL, obteniendo un porcentaje de recuperación de 72.4% después de la purificación en columna de afinidad.

### Análisis por western blot.

Se utilizó el gel gemelo de la corrida en gel de electroforesis utilizado para la identificación de proteínas por SDS-PAGE antes de la purificación automatizada por columna de afinidad y se realizó la interacción entre los anticuerpos E1 y E2 utilizando un kit de quimioluminiscencia (Invitrogen Sigma Aldrich (WB7104 Anti-Mouse), generando una señal positiva en las fracciones extraídas en 100mM de elusión en la columna de heparina para E1 (30-37KDa) y core (20-25KDa), **Figura**

**12.**

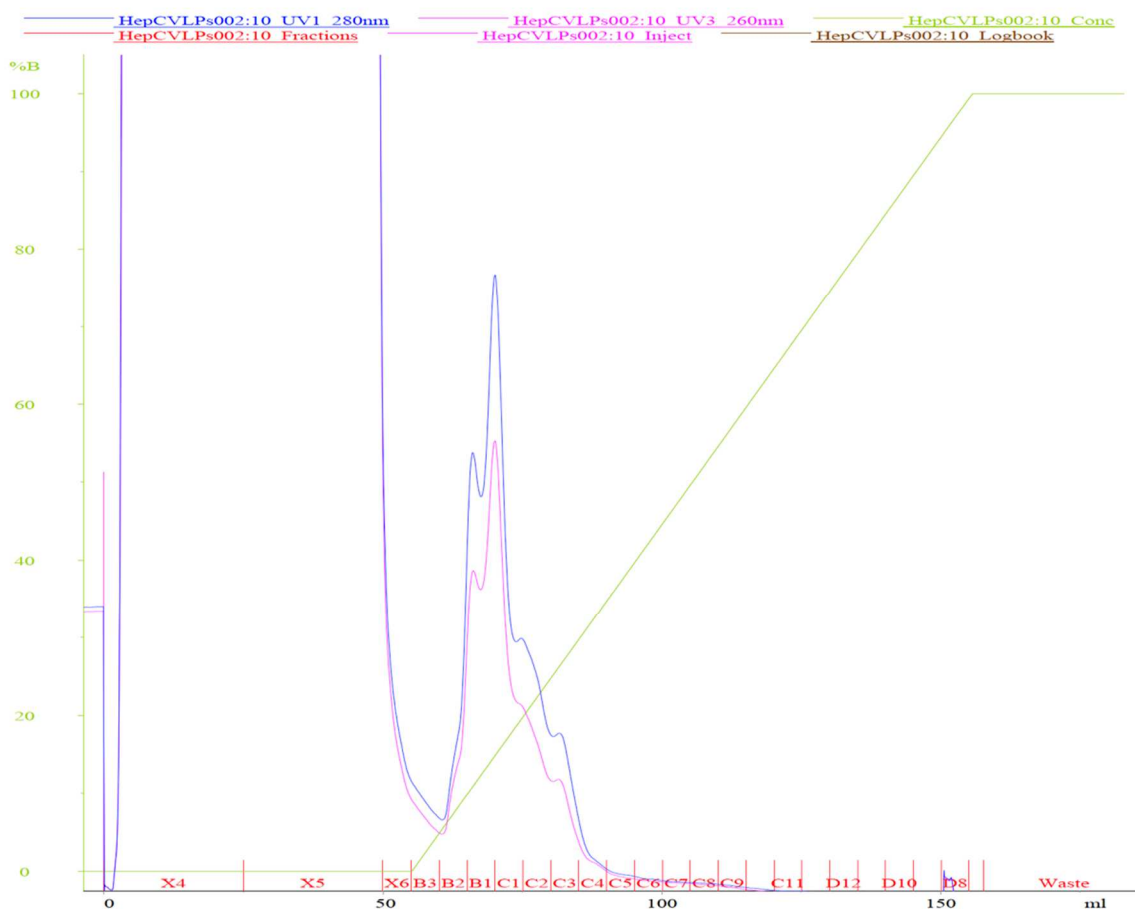


**Figura 12. Quimioluminiscencia Anti-Core y Anti-E1 de fracciones purificada por columna de heparina.** En el carril (+) se observan bandas correspondientes a las proteínas Core y E1 del VHC, en fracciones purificadas por columna de afinidad (heparina). MP=Marcador de peso molecular, (-) Control negativo, fracción soluble de hoja de *N. benthamiana* sin expresar el vector 11599/68660, (+) fracción purificada a través de la columna de heparina de hojas expresando el vector 11599/68660, elusión correspondiente a 100mM de NaCl.



Purificación por columna de afinidad en AKTA FPLC de proteína soluble.

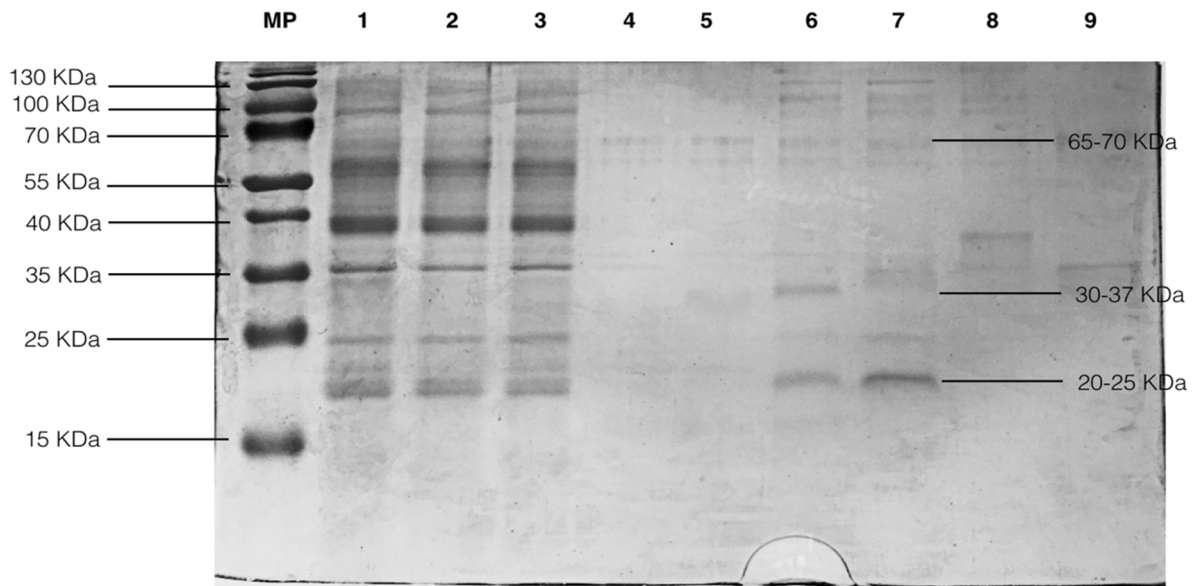
Se generó un gradiente lineal de 0 a 1M de NaCl en un total de 20CV en buffer con 50mM Tris, pH=7.0 y se monitoreó la intensidad relativa de las longitudes de onda a 280nm y 260nm, así como la rampa del incremento de la concentración de manera lineal, guardando cada elusión en tubos independientes (5mL/ elusión), y se obtuvo el siguiente cromatograma:



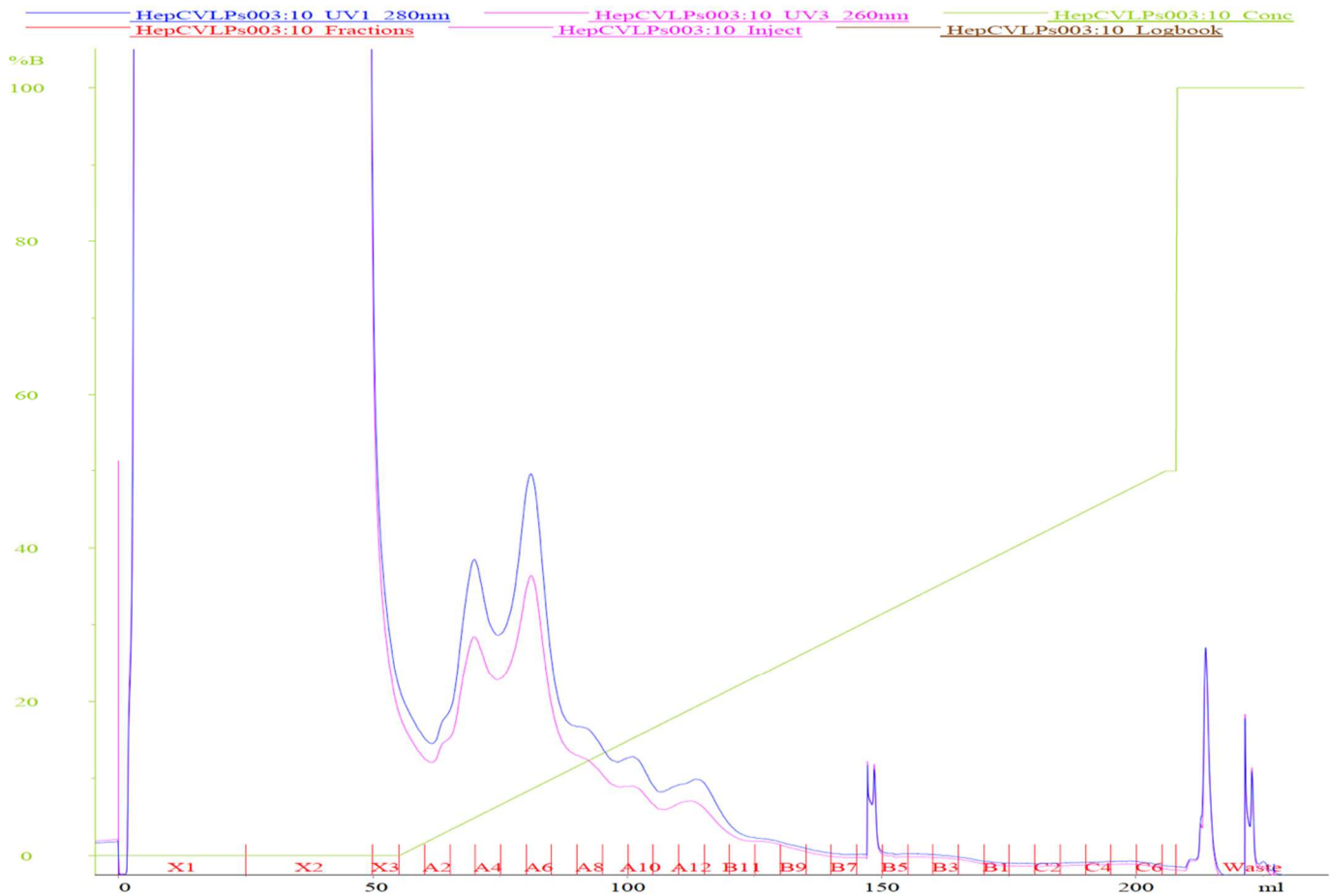
**Figura 13. Cromatograma purificación por columna de afinidad heparina (Gradiente lineal 0-1mM NaCl, 20CV).** Cromatograma de elusión correspondiente a la purificación por columna de afinidad. Los 2 picos más representativos corresponden a las concentraciones de NaCl de 100-150mM y 150-200mM. **Línea Azul**=Absorbancia a 280nm, **Línea Rosa**=Absorbancia a 260nm, **Línea verde**=concentración de NaCl. **X4 y X5**= paso de columna de proteínas total soluble después de ser dializada en buffer A=50mM Tris, pH=7.0. **X6**=Segundo lavado en columna utilizando Buffer A. **B3-D8**, gradiente lineal de 0 a 1M de NaCl.



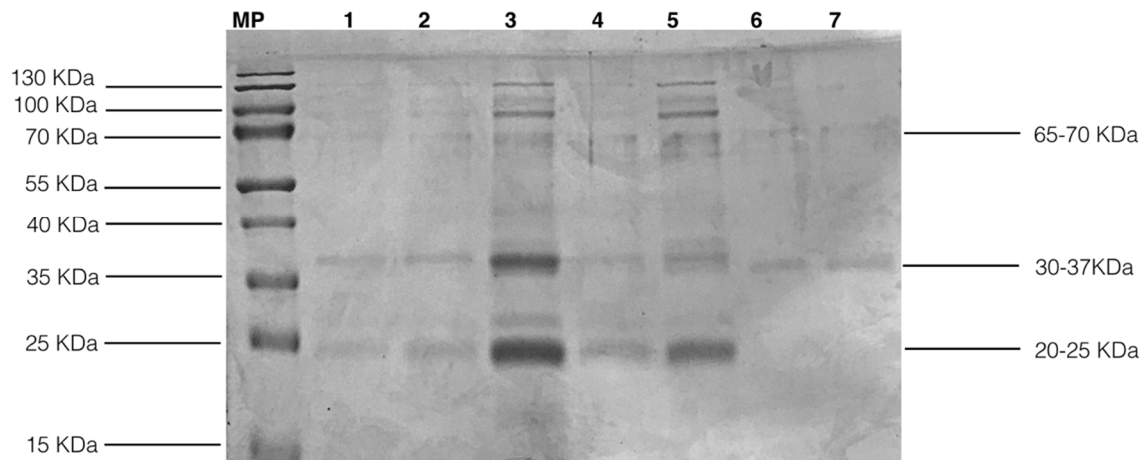
Las eluciones correspondientes a las concentraciones de NaCl de 100-150mM (Elusión **B1**, Carril 6) y 150-200mM (Elusión **C1**, Carril 7) (**Figura 14**) presentan menos contaminación por proteínas vegetales respecto a la purificación de manera manual (**Figura 11**) coinciden con los pesos moleculares correspondientes a las proteínas estructurales (Core=20-25KDa, E1=30-32KDa, E2=60-70KDa). Sin embargo, el cromatograma (**Figura 13**) muestra muy juntos a 2 picos importantes en tanto para la absorbancia en 260nm y 280nm, por lo que se decidió realizar un nuevo gradiente lineal para la separación en columna de afinidad de heparina, utilizando ahora un gradiente de 30CV, de 0-500mM de NaCl. El cromatograma de este nuevo gradiente (**Figura 15**) muestra de manera más limpia la separación de los 2 picos referentes a las eluciones correspondientes a las concentraciones de NaCl de 33-48mM (Elusión **A3**, Carril 6 y 7) y 82-99mM (Elusión **A6**, Carril 1-5) (**Figura 16**).



**Figura 14. Electroforesis en gel de fracciones de la purificación por afinidad (0-1M NaCl, 20CV).** Electroforesis en gel de las fracciones colectadas tras la elución en columna de afinidad (heparina) en el protocolo de purificación utilizando un gradiente de NaCl de 0-1M en 20CV. Se cargaron 20ng de proteína por carril. En las fracciones presentes en el carril 6 y 7, se pueden observar bandas pertenecientes a las 3 proteínas estructurales del VHC. **MP**=Marcador de peso molecular, **1**=Sobrenadante (Proteína soluble) dializado en Buffer A (Tris 50mM, pH=7), **2**=Paso de columna (45mL Sobrenadante), **3**= Segundo lavado en columna utilizando Buffer A, **4**=Elución B3 (0-50mM NaCl), **5**=Elución B2 (50mM-100mM), **6**= Elución B1 (100mM-150mM NaCl), **7**= Elución C1 (150mM-200mM NaCl), **8**= Elución C2 (200mM-250mM NaCl), **9**= Elución C3 (250mM-250mM NaCl).



**Figura 15. Cromatograma de la purificación por columna de afinidad heparina (Gradiente lineal 0-500mM NaCl, 30CV).** Cromatograma de la elución correspondiente a la purificación por columna de afinidad. Los 2 picos más representativos corresponden a las concentraciones de NaCl de 33-48mM y 82-99mM. **Línea Azul**=Absorbancia a 280nm, **Línea Rosa**=Absorbancia a 260nm, **Línea verde**= concentración de NaCl. **X1 y X2**= paso de columna de proteínas total soluble después de ser dializada en buffer **A**=50mM Tris, pH=7.0. **X3**=Segundo lavado en columna utilizando Buffer A. **B2-C6**, gradiente lineal de 0 a 500mM de NaCl.

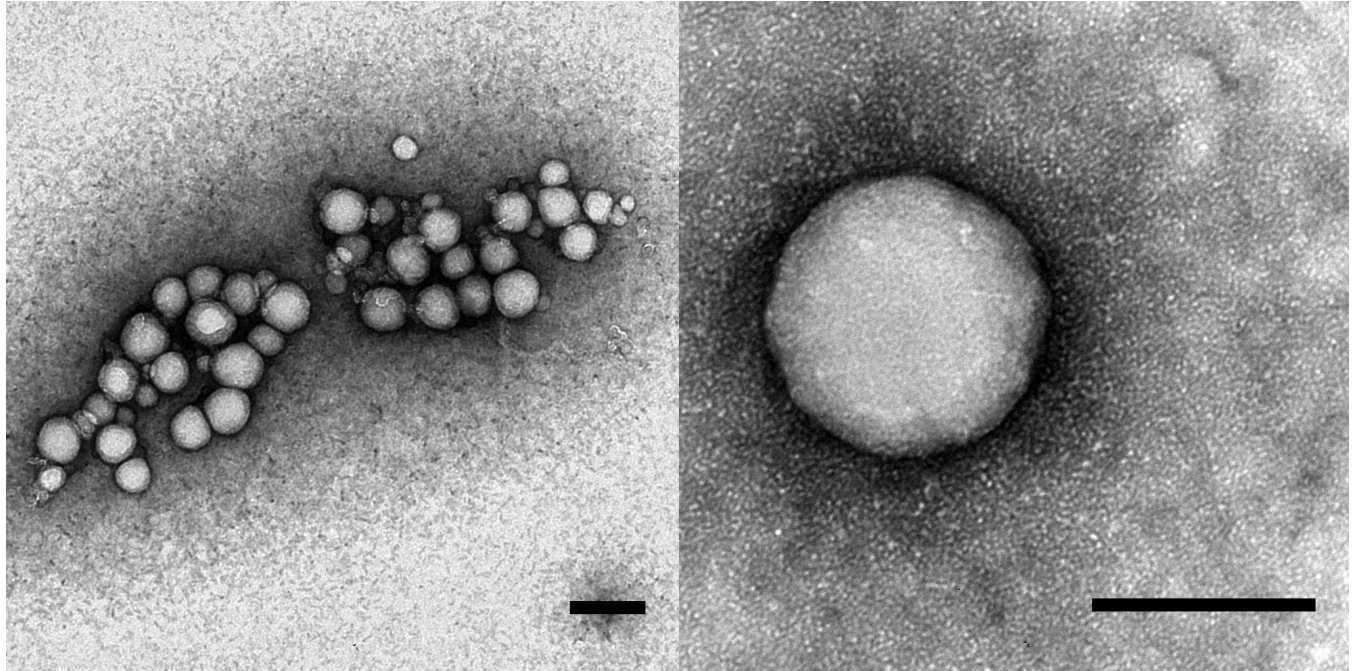


**Figura 16. Electroforesis en gel de fracciones de la purificación por afinidad (0-500mM NaCl, 30 CV).** Electroforesis en gel de las fracciones colectadas tras la elusión en columna de afinidad (heparina) en el protocolo de purificación utilizando un gradiente de NaCl de 0-500 mM en 30 CV. Se cargaron 20ng de proteína por carril. Las fracciones presentes en los carriles **1-7** se pueden observar bandas pertenecientes a las 3 proteínas estructurales del VHC. **MP**=Marcador de peso molecular, Carriles **1-5**= Elusión A6 (82-99mM NaCl), y **6-7**= Elusión A3 (33-48mM NaCl)).

Microscopía de transmisión electrónica de fracciones recuperadas a partir de la purificación por columna de afinidad (0-500mM NaCl ,30CV).

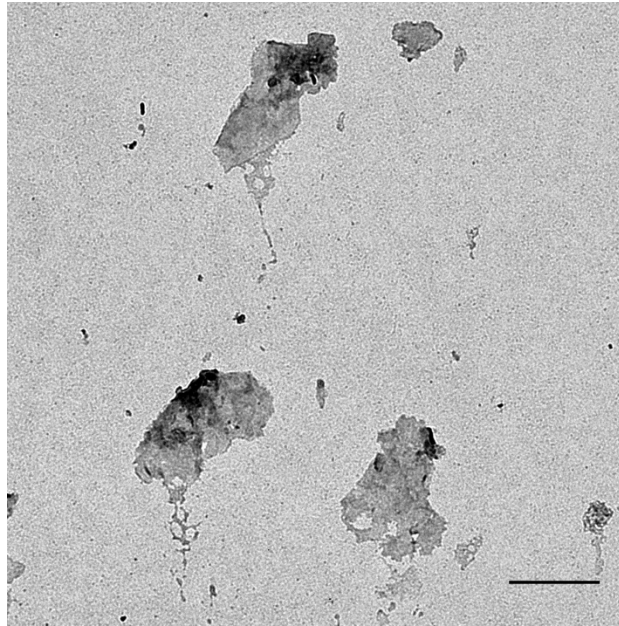
Una vez que las fracciones correspondientes a **A6** (82-99mM NaCl) y **A3** (33-48mM NaCl), fueron concentradas elegidas como las fracciones con más probabilidad de contener partículas del VHC, se realizó la microscopía de transmisión electrónica una vez que se concentraron más de 6 veces (centricones de 5mL, corte de 30KDa). Las muestras fueron fijadas y teñidas en rejillas de níquel y se observó que solo las fracciones **A6** (82-99mM NaCl), la cual contiene las 3 proteínas estructurales, presenta partículas similares a virus (**Figura 17**), mientras que la fracción **A3** (33-

48mM NaCl), carente de la proteína core, no presenta formas regulares al microscopio (**Figura 18**)



**Figura 17. Micrografía de transmisión electrónica fracción A6 (82mM-99mM NaCl).** Micrografía de transmisión electrónica de fracciones **A6** (82mM-99mM NaCl) en el protocolo de purificación utilizando un gradiente de NaCl de 0-500 mM en 30 CV. **Barra=200nm.**

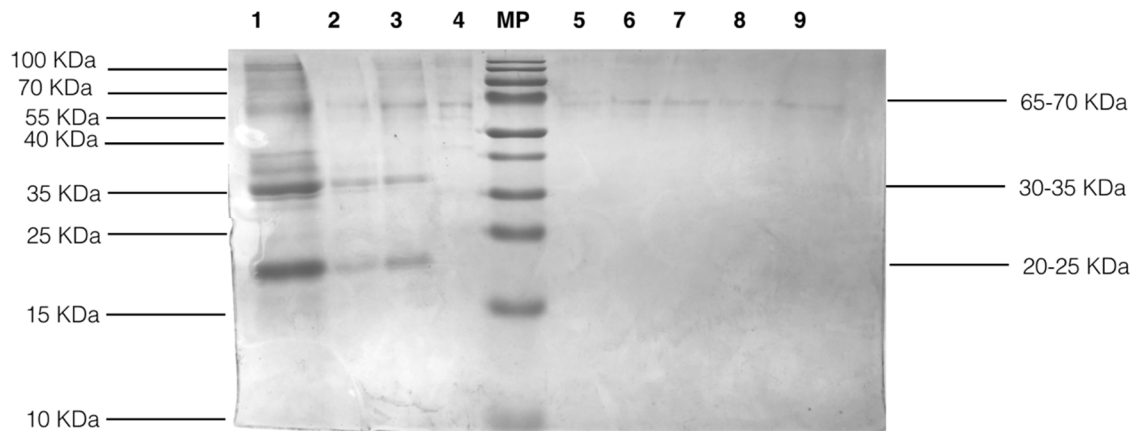




**Figura 18. Micrografía de transmisión electrónica de fracciones A3 (33mM-48mM NaCl).** Micrografía de transmisión electrónica de fracciones A3 (33mM-48mM NaCl) en el protocolo de purificación utilizando un gradiente de NaCl de 0-500 mM en 30 CV. **Barra=1 $\mu$ m.**

Purificación de fracciones A6 (82-99mM NaCl) utilizando gradientes de sacarosa. Una vez que la fracción **A6** (82-99mM NaCl) ha sido semi-purificada utilizando una columna de afinidad, se realizó un gradiente de sacarosa de 20% a 60% con aumento de 5% y otro más de 20% a 40%, con un aumento entre cada concentración de 2.5%, a partir de una solución stock de sacarosa 80% en buffer Tris, 50mM, pH=7.0.

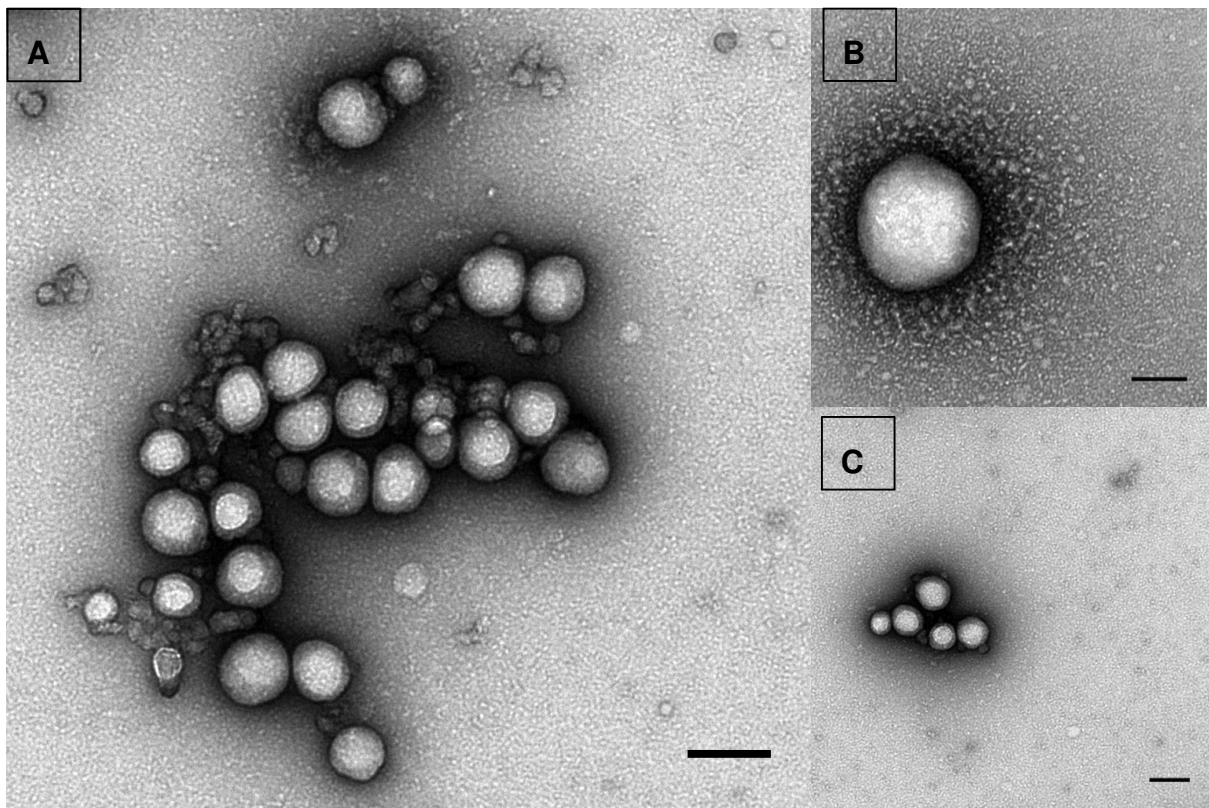
Se colectaron las fracciones una vez ultracentrifugadas y se corrió un gel SDS-PAGE para observar en qué fracción o fracciones se observan las bandas correspondientes a las proteínas estructurales del VHC. Las bandas correspondientes a core, E1 y E2 purificadas (**Figura 19**) se encuentran en las fracciones de 25% (1.1036 g/mL) y 30%(1.1270 g/mL) de sacarosa. Las fracciones restantes (35-60%) no mostraron presencia de las bandas correspondientes.



**Figura 19. Electroforesis en gel SDS-PAGE de fracciones recuperadas de ultracentrifugación en gradientes de sacarosa (20%-60%, Incremento 5%).** Gel de electroforesis de las A6, en gradiente de sacarosa recuperados. **MP**=Marcador de peso molecular, **1**= Elución A6 (82-99mM NaCl), **2**=25% sacarosa, **3**=30% sacarosa, **4**=35% sacarosa, **5**=40% sacarosa, **6**=45% sacarosa, **7**=50% sacarosa, **8**=55% sacarosa, **9**=60% sacarosa.

Microscopía de transmisión electrónica de fracciones purificadas en 25% de gradiente de sacarosa.

Una vez identificadas las fracciones que presentaban las bandas de interés, se procedió a realizar microscopía de transmisión en la fracción de 25% (**Figura 20**), la cual corresponde con la densidad de flotación reportada para el virus de la hepatitis C de 1.1036 g/mL.



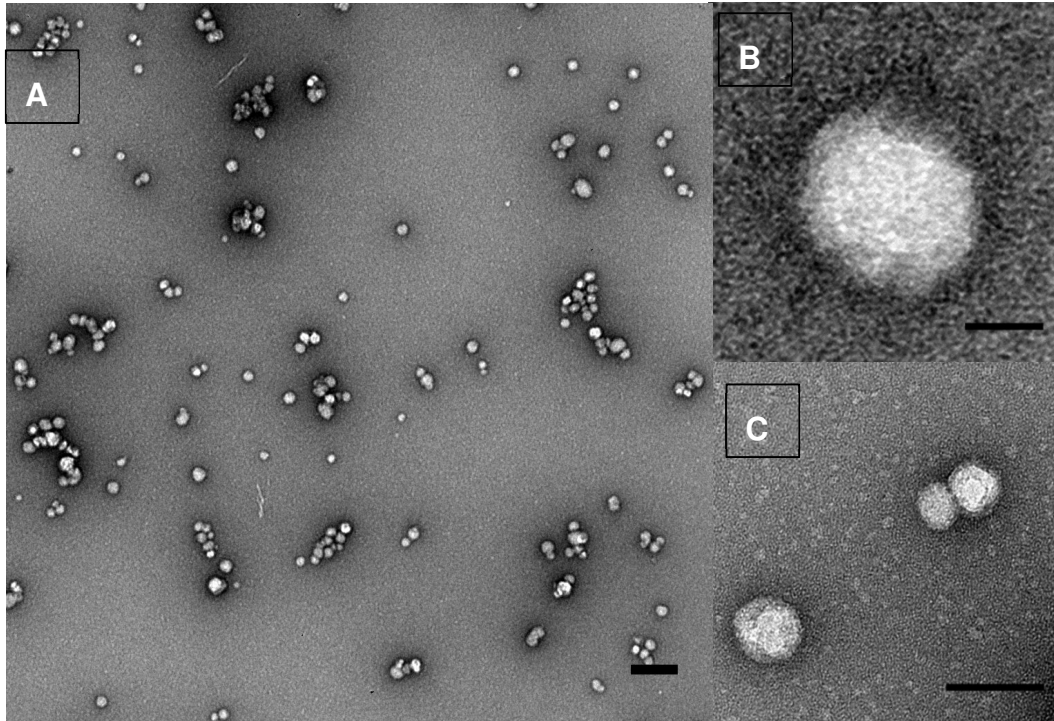
**Figura 20. Microscopía de transmisión electrónica de fracción 25% de sacarosa (1.1036g/mL), en gradiente 20-60%, aumento 5%. Micrografía de fracciones colectadas en la fracción 25% de sacarosa correspondiente a la fracción 1.1036g/mL. (A) Barra=150nm, (B) Barra=50nm, (C) Barra=150nm.**

El tamaño promedio de estas partículas fue de 96.22nm, con una desviación estándar de 17.57nm, con partículas de tamaño mínimo de 52.73nm y máxima de 123.45nm. Debido a que el tamaño reportado de las fracciones infecciosas del VHC





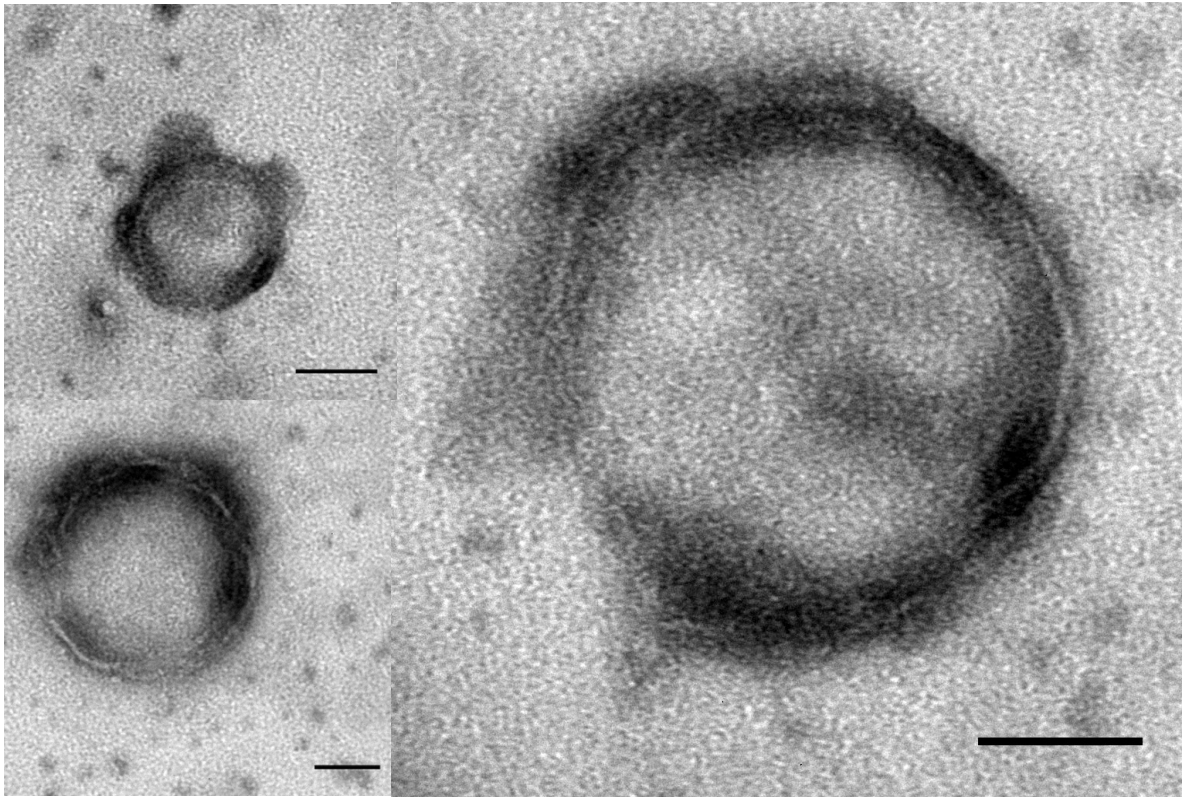
reportadas en otros sistemas se encuentra entre 50-70nm se realizó un nuevo gradiente de sacarosa para saber si se podían recuperar fracciones intermedias (22%) que contuvieran partículas virales más pequeñas. Se realizó un gradiente de sacarosa de 20% a 40%, con un aumento entre cada concentración de 2.5%, a partir de una solución stock de sacarosa 80% en Buffer Tris, 50mM, pH=7.0, cada fracción tuvo un volumen total de 700 $\mu$ L. Una vez recuperada la fracción de 25%, correspondiente a 1.1036g/mL, se observó al microscopio de transmisión electrónica y se encontraron partículas con un tamaño promedio de 50.89 con una desviación estándar de 11.25nm, con partículas de tamaño mínimo de 29nm y máximo de 88nm, (**Figura 21**), demostrando que la reducción en el tamaño de los pasos entre cada fracción de sacarosa, permite la separación de partículas más pequeñas de VHC.



**Figura 21. Micrografía de transmisión electrónica de fracción 25% de sacarosa (1.1036g/mL), en gradiente 20-40%, aumento 2.5%. Micrografía de fracciones colectadas en la fracción 25% de sacarosa correspondiente a la fracción 1.1036g/mL, en gradiente 20-40 y aumento de 2.5% de sacarosa. (A) Barra=200nm, (B) Barra=20nm, (C) Barra=100nm.**

#### Formulación de liposomas.

Se formularon liposomas (ver sección métodos) y tras realizar la re-hidratación y sonicación fueron fijados sobre rejillas de níquel en para su visualización en el microscopio de transmisión electrónica. Se obtuvieron liposomas de membrana sencilla y de un diámetro promedio de 100nm, desviación estándar de 20nm (**Figura 22**).

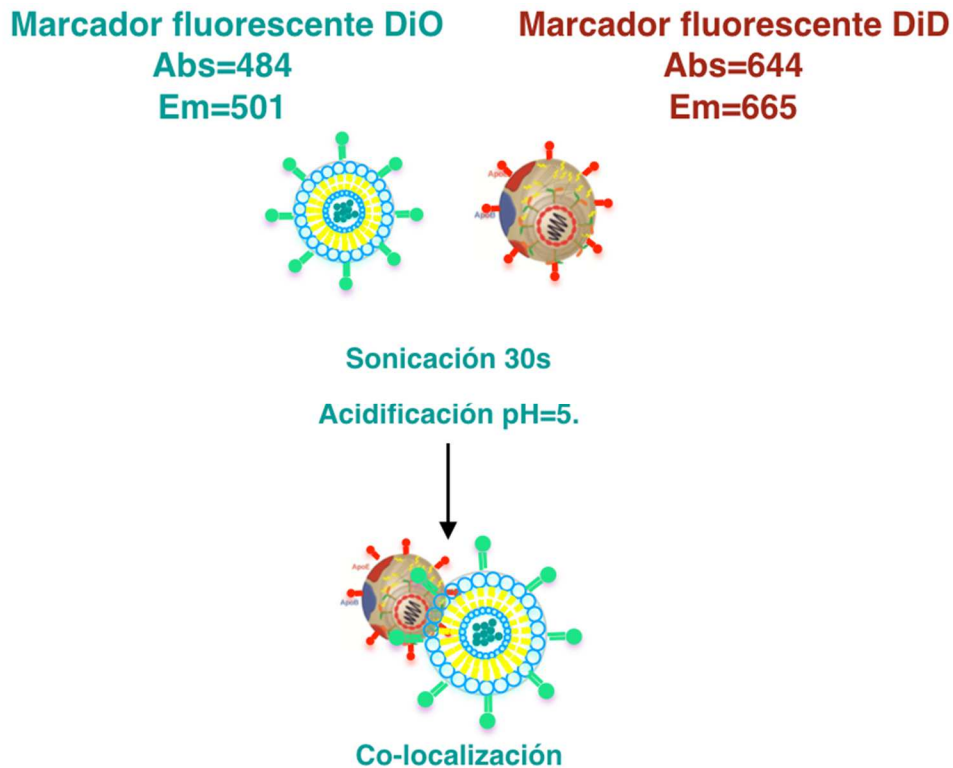


**Figura 22. Formulación de liposomas de membrana sencilla.** Liposomas de membrana sencilla formulados a partir de fosfolípidos extraído de soya. **Barra=50nm**

Funcionalización (fluoróforo) y fusión de VLPs con liposomas.

Una vez se concentraron las fracciones de VLPs encontradas en las fracciones de 25% de sacarosa y los liposomas fueron formulados, se procedió a marcar de manera fluorescente las VLPs virales de VHC (Marcador fluorescente DiO, mencionado en métodos) y los liposomas (Marcador fluorescente DiD, mencionado en métodos), para posteriormente hacer la fusión de ambas partículas explotando la capacidad de fusión de las partículas virales susceptibles a la disminución de pH

7 a pH 5 y de la susceptibilidad de los liposomas a fusionarse con lipoproteínas a partir de la sonicación de ambos elementos (**Figura 23**).



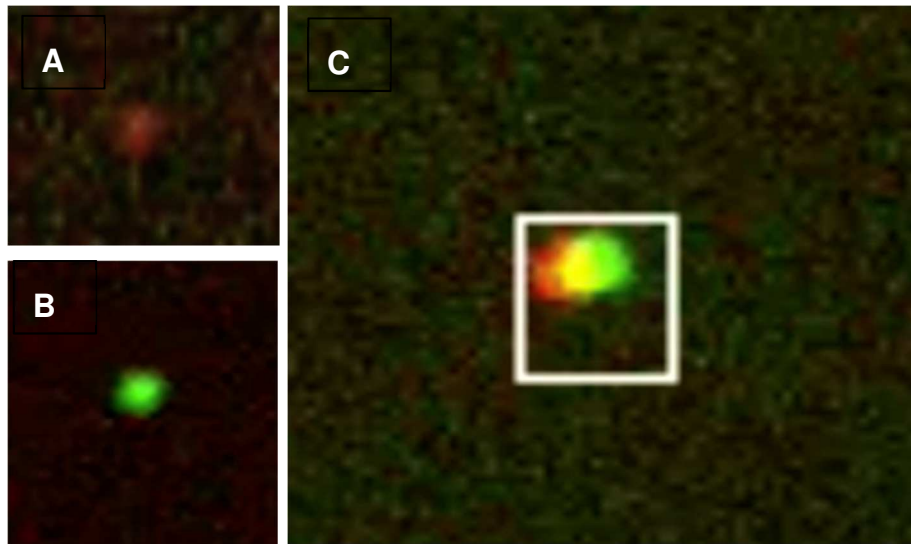
**Figura 23. Representación del marcaje fluorescente y fusión de VLPs de VHC y liposomas.** Representación de la fusión a partir de condiciones acidificantes y sonicación de VLPs de VHC y liposomas previamente marcados fluorescentemente.

Microscopía confocal de una sola partícula.

Aprovechando la fluorescencia emitida por los liposomas (501nm, espectro visible verde) y VLPs VHC (665, espectro visible rojo), se identificó a través del filtrado de 2 canales diferentes correspondientes a las frecuencias de onda emitida por cada elemento, la co-localización de VLPs y liposomas posteriores a la sonicación durante 30s a nivel 4 y la disminución del pH del medio de 7 a 5. Dicha observación



se logró a través de la microscopía confocal de una sola partícula, la cual permite observar elementos de tamaño nano, en solución hasta en intervalos de máximo 30 min. Con el fin de representar el fenómeno de fusión, se representan los fotogramas más representativos de la fusión producida *in vitro*. (**Figura 24**).



**Figura 24. Microscopía confocal de una sola partícula en la fusión de liposomas y VLPs de VHC fluorescentes.** Microscopía confocal de una sola partícula de la fusión entre VLPs y liposomas marcados fluorescentemente. **A**=VLPs de VHC marcado fluorescentemente con DiD, **B**=Liposoma marcado fluorescentemente con DiO, **C**=Fusión de VLP de VHC + liposomas.

## Discusión.

La heparina como sistema para la purificación de VLPs del VHC producidas en plantas.

Una de las características más importantes para la optimización en la extracción de partículas virales fue utilizar un método que explotara la afinidad de las partículas hacia un elemento en particular y favoreciera su recuperación.

Diversos grupos han reportado la utilización de columnas de heparina para la captura y purificación de partículas del virus de la hepatitis C producidas en sistemas

de cultivo celular o extraídos de pacientes infectados en fases agudas de hepatitis [92 - 94].

La heparina, es un glicosaminoglicano (GAG) encontrado en las glándulas secretorias de células de mastocitos [95]. Los GAG son moléculas cargadas negativamente que interactúan con los aminoácidos cargados positivamente a través de fuerzas electrostáticas.

Diversos patógenos como el HIV-1, virus del herpes y el virus de adenovirus tipo 2, utilizan GAGs expresadas en las células blanco como receptores o factores de anclaje para iniciar su proceso de introducción a la célula [96 - 98].

La heparina es parte de los heparan sulfato proteoglicanos (HSPGS) los cuales son un tipo de GAGs abundantes en la matriz del espacio de Disse (hígado) y en la superficie de hepatocitos [93]. Los HSPGS están compuestos a partir de una proteína central y ramificaciones de heparan sulfato. El heparan sulfato es un polisacárido lineal el cual consiste en una unidad de disacárido repetida de ácido urónico y un derivado de la glucosamina con varios patrones de sulfatación [100].

Se ha demostrado que la proteína de envoltura E2 del VHC se une a la heparina a través de su región hipervariable cuando esta no este conjugada con algún elemento inmunogénico (*Ej.* IgG) [99].

En el presente proyecto, se utilizó una columna de heparina de 5mL y un gradiente lineal de NaCl en el buffer de elusión, encontrando 2 picos de elusión correspondientes a 82-99mM y 33-48mM de 82-99mM de NaCl (**Figura 15**).

La electroforesis en gel SDS-PAGE mostró un patrón de bandeo similar para ambas eluciones (**Figura 16**). En la elución correspondiente a 82-99mM de NaCl se observaron bandas en los tamaños reportados para proteínas estructurales del virus de la Hepatitis C; core (20-25KDa), E1 (30-35), E2 (65-70KDa)) [56 - 59], con un porcentaje de recuperación de 72.4% de la proteína total soluble.

Sin embargo, en la elución 33-49mM de NaCl solo se observaron bandas correspondientes a las proteínas E1 y E2, pero no para la proteína core. (**Figura 16**)

Para comprobar la identidad de las proteínas core y E1 presentes en la elución 82-99mM de NaCl, se realizó un western blot, utilizando anti cuerpos monoclonales para las proteínas core y E1. A través del revelado de anti-cuerpos secundarios con un kit de quimioluminiscencia se identificaron las proteínas pertenecientes a core y E1 en los pesos anteriormente reportados C=core (20-25KDa), E1 (30-35).

Aunque desafortunadamente las pruebas inmunológicas para la identificación de la proteína E2 no fueron concluyentes (datos no mostrados), el tamaño de las bandas reportados para E2 (65KDa-70KDa) [56 - 59], encontradas posteriormente a la purificación por columna de heparina y gradientes (**Figura 19**) correspondiente a las fracciones de 25% de sacarosa (1.1036 g/mL.), es un gran indicio de que el mecanismo de interacción en el proceso de purificación es principalmente a partir de la interacción entre la heparina y la región hipervariable de la proteína E2 en las VLPS. [99], [101] y [102].

#### Caracterización estructural de VLPs del VHC producidas en planta.

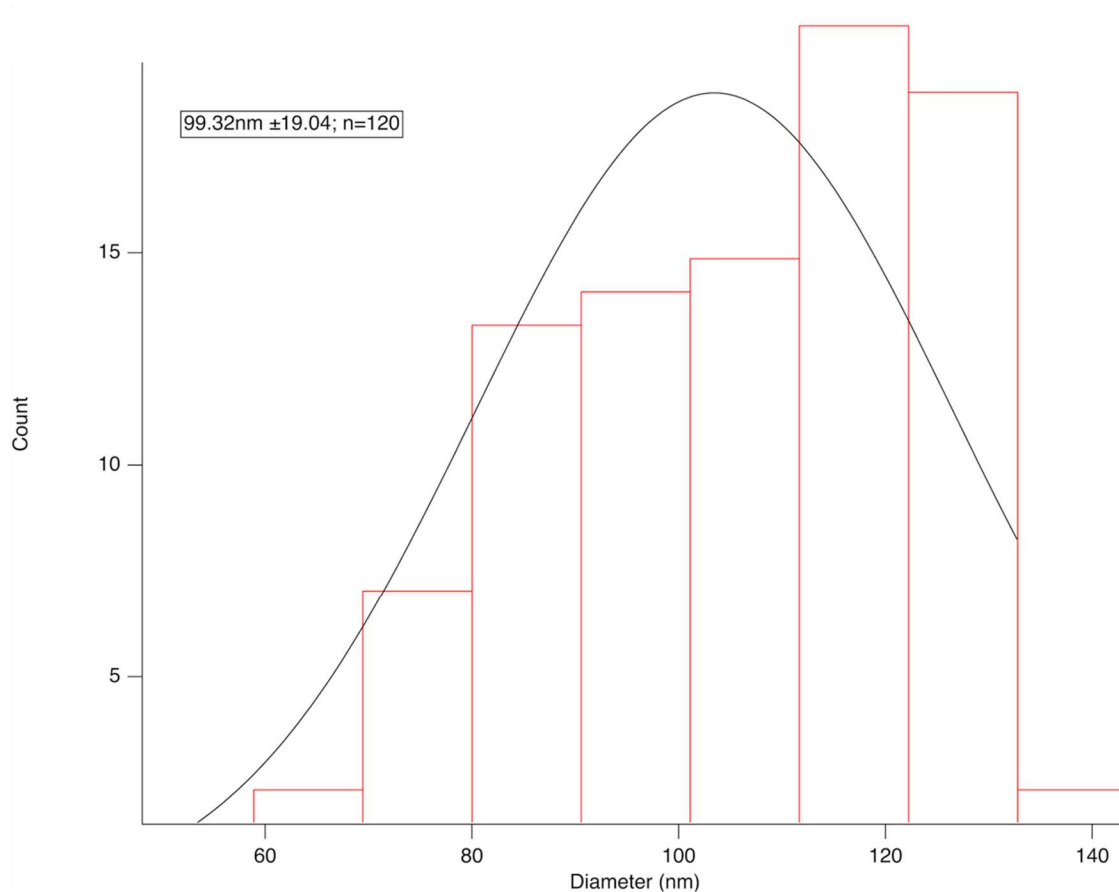
Una vez determinada la presencia de las proteínas estructurales del VHC a través de pruebas inmunológicas, se realizó la microscopía de transmisión electrónica



tanto en las fracciones correspondientes a 82-99mM (**Figura 17**) y 33-48mM (**Figura 18**) de NaCl. La elusión 82-99mM NaCl fue la única que presentó partículas similares en morfología y tamaño a las reportadas por otros grupos de investigación para el VHC [**56 - 59**].

Para determinar el tamaño promedio de las partículas se realizó un análisis de distribución de tamaños utilizando el software de manipulación de imagen, ImageJ (National Institute of Health, USA), midiendo el diámetro de manera manual de por lo menos por muestra 120 partículas por muestra . El análisis de distribución reveló un tamaño promedio de partículas de  $99.32 \text{ nm} \pm 19.04 \text{ nm}$  con un mínimo de 43 nm y máximo de 138nm (**Figura 11**).





**Figura 25. Análisis de distribución de tamaño de partículas de VLPs de VHC, elusión 82-99mM NaCl.** Distribución de tamaños de 120 partículas encontradas en la elusión 82-99mM NaCl en la purificación de partículas del VHC producidas en *N. benthamiana*.

El tamaño de partículas infecciosas de VHC varía dependiendo del sistema, genotipo y método de separación. Se ha estimado a través de filtración *in vivo* que varía desde 40nm a 100nm [58, 103], y a través de centrifugación se ha podido calcular que en promedio se encuentra un tamaño de 54nm [104]. Específicamente en partículas de VHC (JFH-1) producidas en cultivo celular (Huh7.2) el tamaño promedio se encuentra entre 65nm y 70nm.

Estudios ultra-estructurales realizados con muestras de pacientes infectados reportan diámetros heterogéneos que varían entre 35 nm y 100 nm [105 - 108],

mientras que las partículas producidas en sistemas de cultivo celular suelen estar en un rango de diámetro entre los 50 nm y 60 nm [109], [110].

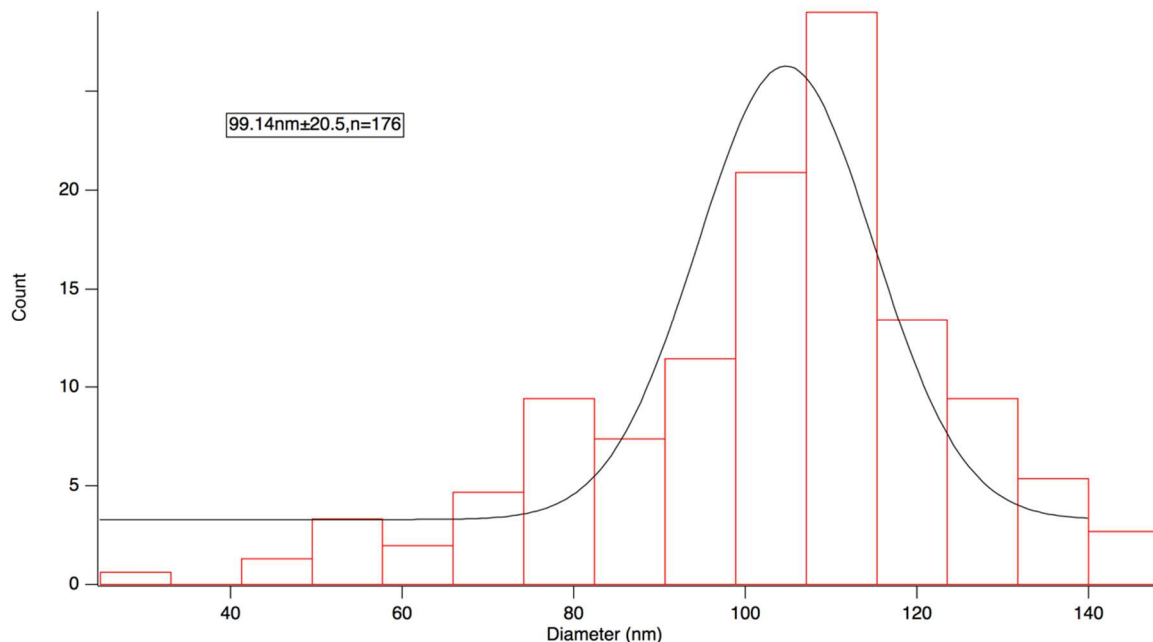
Dentro de las ventajas que representa el sistema VHC como administrador de fármacos hacia los hepatocitos, se encuentra su tamaño, ya que sería ideal que este sistema no sobrepasara los 150nm diámetro y así evitar ser atrapado por las células de Kupffer, pudiera atravesar los sinusoides y llegara al espacio pre-sinusoidal para y finalmente alcanzara la zona de hepatocitos.

La fracción 82-99mM de NaCl de la purificación en un paso en columna de heparina utilizando un gradiente lineal de (Buffer B: 0-500mM de NaCl y Buffer A: 50mM Tris pH=7.0, en un volumen total de 30CV), permitió la purificación parcial de VLPs del VHC con un tamaño en promedio de 99.32nm. Sin embargo, el patrón de bandeo (**Figura 16**) indicó que existían aún bandas pertenecientes a proteína de planta, por lo que se realizó la centrifugación isopícnica en gradientes de sacarosa, la cual permitió una mejor recuperación a través de la igualación del medio de centrifugación y la densidad de flotación conocida para VLPs y viriones de VHC.

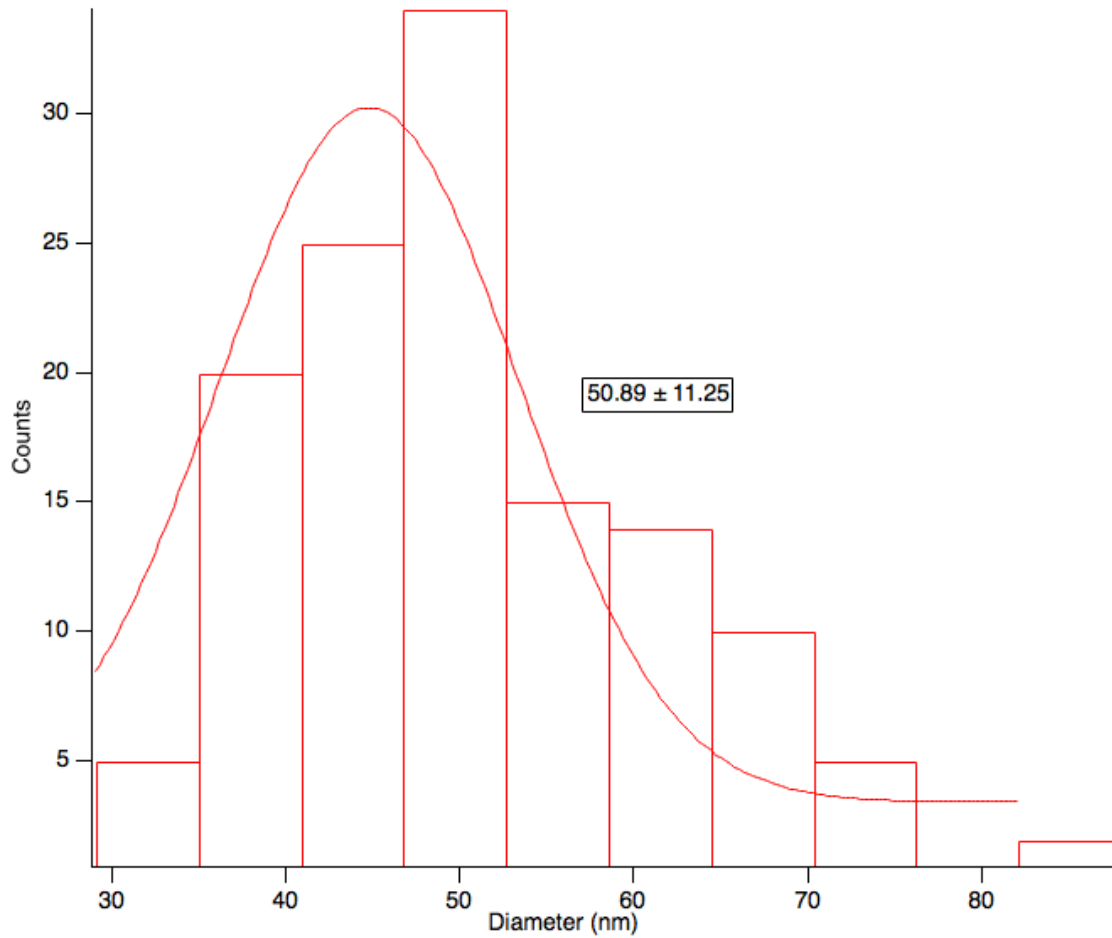
Se realizó la microscopía electrónica de transmisión de la fracción una vez recuperada la fracción de 25% de sacarosa la cual presenta una densidad de flotación de .1036 g/mL, la cual ha sido reportada como la densidad de flotación del VHC [56 - 59], [64]. El análisis de distribución de tamaños utilizando incrementos de 5% en el gradiente de sacarosa (**Figura 26**) permite obtener partículas puras (**Figura 19 y 11**) con un tamaño promedio de partículas de  $99.14\text{nm} \pm 20.5\text{nm}$ , mínimo de 37.5nm y máximo de 140nm, muy similar a la distribución obtenida

después de la purificación con heparina, (**Figura 25**), confirmando que las partículas anteriormente observadas corresponden a partículas VLPs del VHC.

En un intento por obtener partículas más pequeñas (en el rango de 50-60nm) se realizó de nuevo un gradiente de sacarosa, recuperando también la fracción correspondiente de 25% (1.1036 g/mL), pero utilizando un aumento entre cada concentración discontinua de 2.5%. El análisis de distribución de tamaños (137 partículas) indica que con la disminución de aumento en la concentración (**Figura 27**), se pueden obtener partículas puras, con una un tamaño promedio de partículas de  $50.89\text{nm} \pm 11.25\text{nm}$ , mínimo de 29nm y máximo de 88 nm.

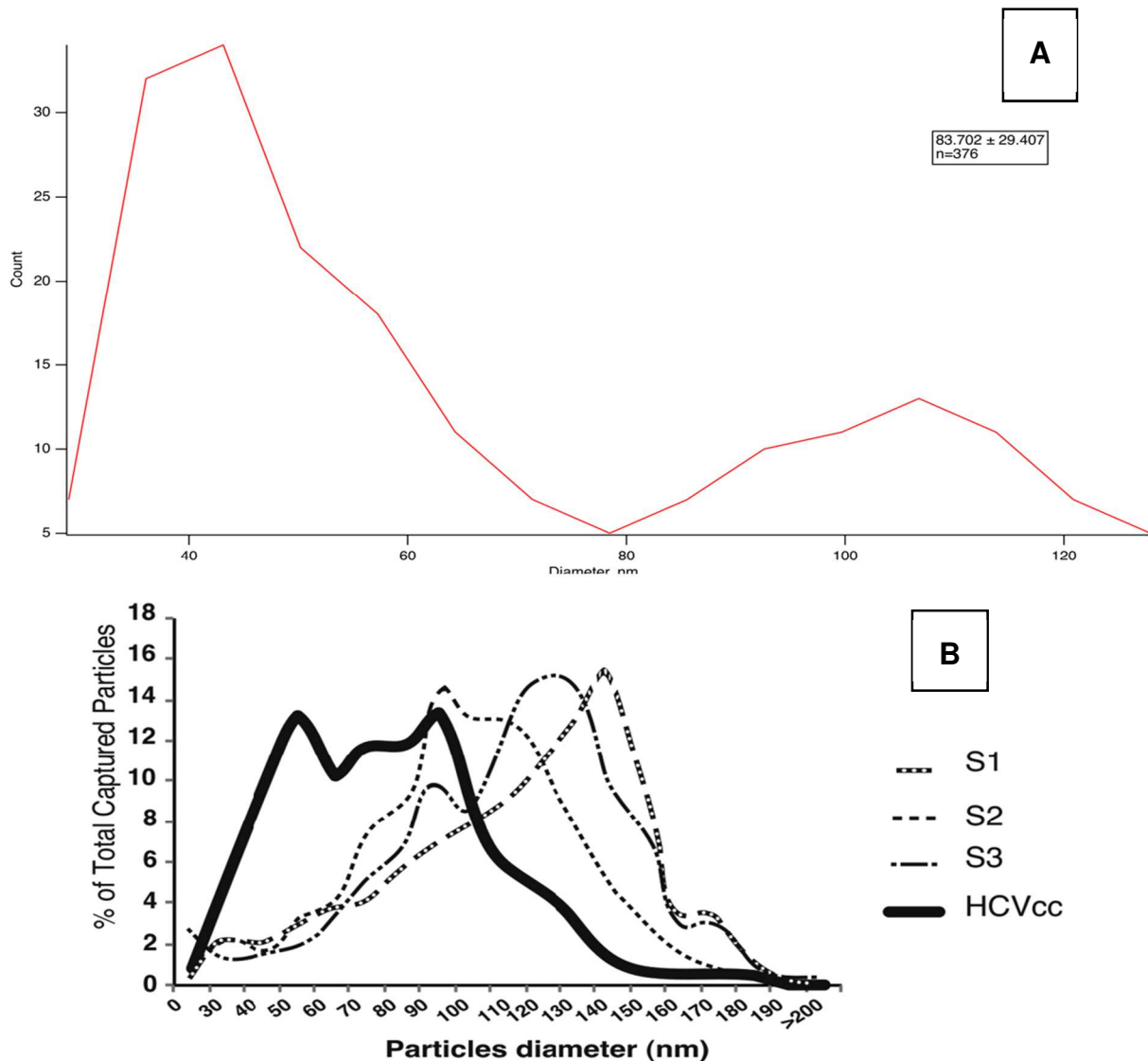


**Figura 26. Distribución de tamaños de VLPs de VHC en gradiente de sacarosa 20%-60%, aumento de 5%.** Distribución de tamaños de 176 partículas encontradas tras la realización de un gradiente de sacarosa (20%-60%, aumento 5%) en la purificación de partículas del VHC producidas en *N. benthamiana*.



**Figura 27. Distribución de tamaños de VLPs de VHC en gradiente de sacarosa 20%-60%, aumento de 2.5%.** Distribución de tamaños de partículas encontradas tras la realización de un gradiente de sacarosa (20%-60%, aumento 2.5%) en la purificación de partículas del VHC producidas en *N. benthamiana*.

Debido a las dos poblaciones de tamaños de VLPs del VHC presentes en la misma densidad, se realizó una comparación en el análisis de distribución, sumando los diámetros del total de partículas analizadas encontradas en los dos tipos de aumento de concentración realizados en los gradientes de sacarosa (**Figura 28**).

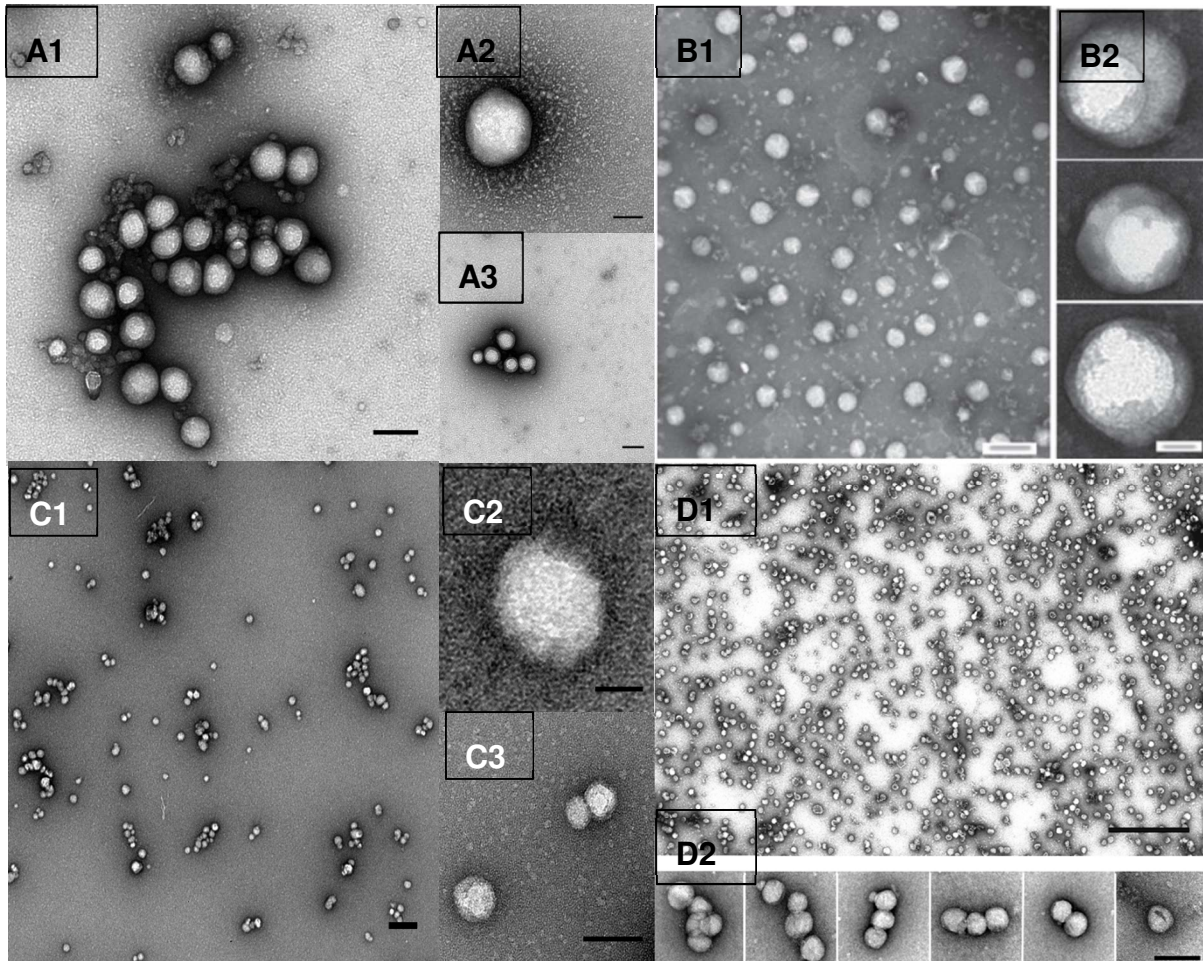


**Figura 28. Comparación en los tamaños de partículas de VLPs de VHC producidos en cultivo celular.** Distribución de tamaños de los picos más representativos encontrados en la producción de VHC en *N. benthamiana*. **A**=Poblaciones de tamaños de diámetro encontradas en la producción de VLPs de VHC genotipo 1a en expresión transitoria en *N. benthamiana*. **B**=Poblaciones de tamaños de diámetro encontradas en la producción de VLPs de VHC genotipo 1a en expresión transitoria en cultivo celular en hepatocitos. (Adaptado de [58]).



Se determinó que existen 2 poblaciones específicas de partículas ( $99\text{nm}\pm 20\text{nm}$  y  $50.89\pm 11.25\text{nm}$ ), los cuales coinciden con las poblaciones encontradas en cultivo celular con el VHC genotipo 1a, presentado por Piver *et al.* [58]

Con el análisis de distribución de tamaños se puede concluir que la purificación por gradiente de sacarosa es el ideal para obtener VLPs del VHC puras, y que el sistema en planta puede ser utilizado para producir nanopartículas virales, las cuales son muy similares a las reportadas por otros grupos de investigación tanto en apariencia como en tamaño y biofísica estructural (Densidad de flotación) (**Figuras 28 y 19**).



**Figura 29. Comparativa entre VLPs de VHC producidas en *N. benthamiana* y VLPs infecciosas producidas en hepatocitos. A=VLPs de VHC producidas en *N. benthamiana*, purificada en gradiente de sacarosa (20%-60%, aumento de 5%) **A1 Barra=150nm, A2 Barra=50nm, A3 Barra=150nm**; B=VLPs de VHC producidas en hepatocitos, purificada en columna de heparina y gradiente de lodixanol (20%-60%, aumento de 5%) B1=100nm, B2=20nm (Adaptado de [57]); C=VLPs de VHC producidas en *N. benthamiana*, purificada en gradiente de sacarosa (20%-60%, aumento de 2.5%) **C1 Barra=200nm, C2 Barra=20nm, C3 Barra=100nm**; D=VLPs de VHC producidas en hepatocitos, purificada en gradiente de sacarosa (20%-60%, aumento de 5%) **D1=500nm, D2=50nm** (Adaptado de [59]).**



Como se puede observar (**Figura 29**), las partículas de VHC producidas en cultivo celular tanto en hepatocitos como en este nuevo sistema en planta, presentan un centro denso de electrones, sin ninguna proyección aparente en su superficie y de forma pleiomórfica (no regular y sin apariencia icosaédrica). Las partículas presentan una envoltura, la cual probablemente es producto de la incorporación de VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad) con las VLPs de VHC, presentes tanto en la vía de maduración de las VLPs (retículo endoplásmico y aparato de Golgi) como en su tránsito en sangre (quimioflicones). Este tipo de partículas son denominadas partículas lipovirales (LVPs) [65], [111].

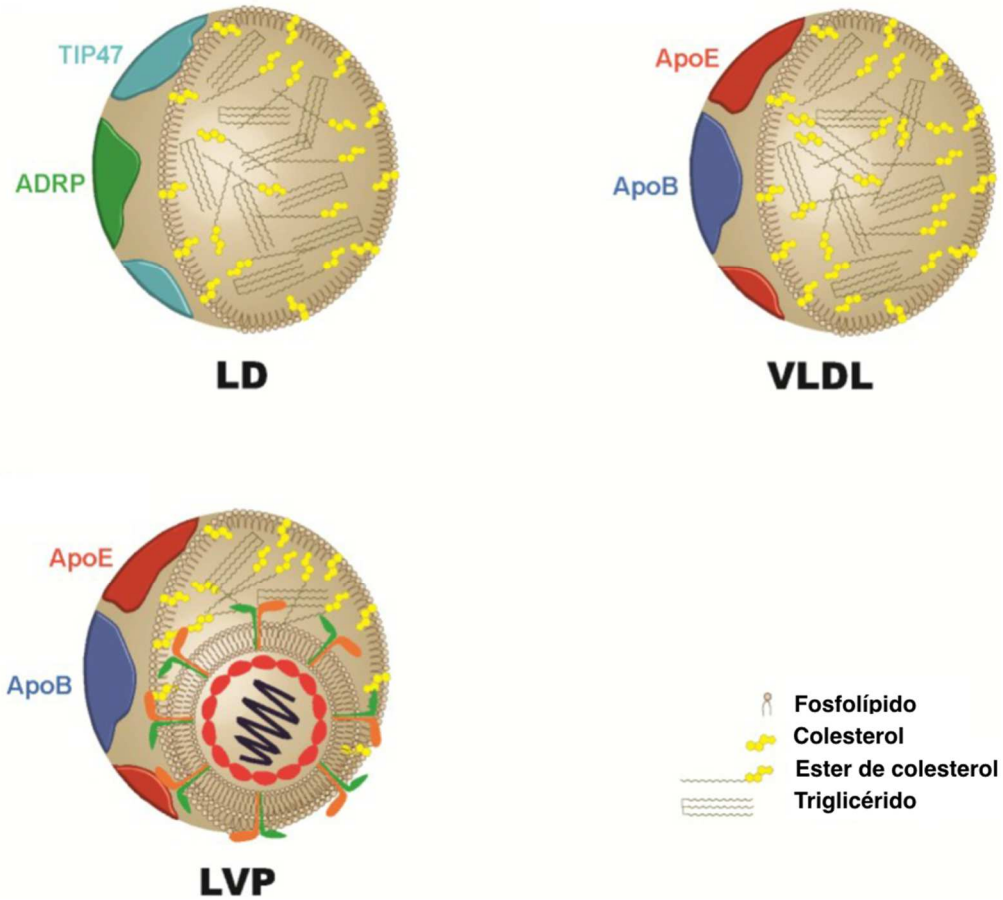
En la **Figura 30 [Adaptado de 111]** se puede encontrar una comparación funcional y estructural entre **cLD** (Lipid Droplets de citosol), **VLDL** (Lipoproteínas de muy baja densidad) y **LVP** (Partículas Lipovirales). Los **cLD** están compuestos por una monocapa de fosfolípidos, la cual limita el contenido de la partícula y contiene en su interior colesterol. Los cLD están rodeadas por TIP47 y ADRP, los cuales son de la misma familia que las apolipoproteínas las cuales presuntamente se encuentran en **VLDL** y **LVP**.

Las **VLDL**, están presentes en el lumen de retículo endoplásmico y en el flujo sanguíneo y están constituidas también de una monocapa de fosfolípidos muy similar a las de los cLD y contiene en su interior colesterol y colesterol éster. Las VLDLs están estabilizadas por apolipoproteínas intercambiables (ApoE y ApoB).

Las **LVPs**, encontradas en sistemas de cultivo celular y en pacientes con infección aguda de VHC, contienen las partículas de VHC, la cual consiste de una nucleocápside formada de la proteína core y una membrana doble de fosfolípidos



la cual se adquiere a partir de la membrana del retículo endoplásmico y finalmente glicoproteínas de superficie. La partícula de VHC está embebida en LVP anteriormente mencionada.



**Figura 30. Comparación funcional y estructural entre cLD, VLDL y LVPs de VHC.** Comparación funcional y estructural entre cLD (Lipid Droplets de citosol), VLDL (Lipoproteínas de muy baja densidad) y LVP (Partículas Lipovirales). (Adaptado de [111])

### Diseño de sistema LVPs + liposomas.

El sistema LVP de VHC producida, cumple (en teoría a partir del diseño) con 4 de las 10 las características que debe de cumplir un sistema de administración dirigida de fármacos hacia el hígado [43]. **1.** Debido a su tamaño nominal (99nm-55nm) puede de ser capaz de atravesar todas las barreras anatómicas (i.e. estómago, intestino y espacio de Disse). **2.** La presencia de glicoproteínas de envoltura, le permite reconocer un receptor o cúmulo de señales receptoras a raíz de la cascada de señalización un receptor inicial (E2-CD81, OCDN, CDN, SSRB1) y **5.** tener una distribución uniforme en el capilar sinusoide.

Sin embargo, debido a la naturaleza de las partículas, las demás características hasta ese estado de desarrollo no habían sido cubiertas. Las características restantes que deberían de cumplirse son: **3.** Que el ligando externo compita con los ligandos endógenos producidos naturalmente en la zona anatómica de acción; **4.** Que el sistema de entrega no sea tóxico, pero si biocompatible, biodegradable y físico-químicamente estable en las células del hígado ya sea en pruebas *in vivo* o *in vitro*; **6.** Que presente tazas controlables y predecibles de la liberación del fármaco tal que solo una cantidad específica sea liberada a las células del hígado; **7.** Que la liberación de la droga no afecte a la distribución de la misma; **8.** Que presente una fuga mínima durante su paso a través del estómago, intestino y/o otras partes del cuerpo; **9.** Que el acarreador utilizado para administrar el fármaco sea eliminado del cuerpo sin mostrar algún tipo de toxicidad y o algún daño patológico y finalmente **10.** Que la preparación del sistema de administración al hígado sea fácil o razonablemente sencilla, reproducible y costo-efectiva.

Los liposomas son sistemas que han mostrado tener un futuro prometedor en sistemas de administración de fármacos y moléculas solubles (hidrofílicas e hidrofóbicas). La mayoría de las drogas son moléculas pequeñas de menos de 500Da, sin embargo, debido a su rápida asimilación y biodistribución no óptima, pueden genera efectos secundarios tóxicos [112]. La encapsulación de fármacos en sistemas de administración coloidales, en especial los liposomas, representa una alternativa eficaz para mejorar la farmacocinética de moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas. Los liposomas son vesículas compuestas de una bi-capa de fosfolípidos los cuales se forman alrededor de un ambiente polar (hidrofílico), lo que permite la encapsulación de fármacos lipofílicos e hidrofílicas, inclusive en la misma formulación [113]. De todos los métodos que existen para la formulación de liposomas, el que más comúnmente se emplea es la hidratación de capas de fosfolípidos (pastel de fosfolípidos) o TLH, propuesto en un inicio por Banghmam *et al.* [114]. Este método permite encapsular moléculas de interés terapéutico en la parte hidrofílica (core) del liposoma y/o atrapar moléculas de carácter lipofílico en las intersecciones de los fosfolípidos. Diversos productos medicamentosos han sido formulados utilizando la técnica TLH con liposomas.

A través de la decoración de moléculas señal se ha logrado dirigir a los liposomas a zonas anatómicas específicas para su administración, sin embargo; la falta de tropismo nativo y los bajos rendimientos de decoración de moléculas señal, los hacen un buen candidato para la administración dirigida de fármacos, pero no perfecto.

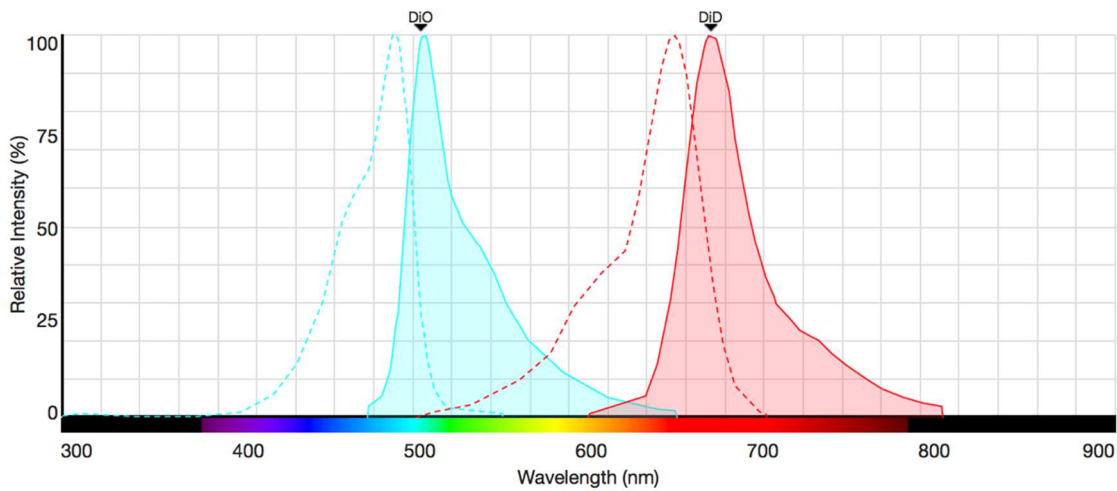
En el presente proyecto se propuso la utilización de un sistema LVP de VHC, fusionado a liposomas diseñados en proporción al contenido presente en RE en plantas. Esto se planteó para poder utilizar el tropismo presente en la parte LVP y las ventajas para la formulación y bio-compatibilidad de un sistema liposomal. Esta estrategia cubriría (en teoría) los demás requerimientos señalados para un sistema de administración dirigida a hígado (Requisitos **3, 4, 6, 7, 8, 9 y 10**). Además, aumentaría la capacidad del sistema para no ser inmunogénico ("Stealth liposome"), ya que estaría embebido en un liposoma y presentaría un aumento en las tasas de control y predicción gracias a la distribución del fármaco en el liposoma. Así mismo el sistema presenta la posibilidad de ser formulado con alguna molécula reportera (fluorescente) para medir la farmacocinética y biodistribución del fármaco. Además, la metodología mencionada en este proyecto es hasta cierto grado sencilla (método TLH+ fusión por factores físico-químicos)

El diseño de los liposomas, se realizó a partir de la utilización de fosfolípidos producidos en soya, en proporción 40% fosfatidil etanolamina, 40% fosfatidil colina, 20% y colesterol extraído de huevo. Esta composición es la más general reportada para sistemas vegetales para los fosfolípidos de la membrana del retículo endoplásmico **[115]**, la cual se cree es la composición similar que presentan las LVPs de VHC en su membrana exterior (**Figura 20**). En un principio se planteó en la formulación de los liposomas la incorporación el fármaco antifibrótico IFC-305, el cual ha mostrado tener resultados prometedores en el tratamiento de la cirrosis hepática en modelos con ratones **[116]**, sin embargo su incorporación en el sistema LVP-liposoma no pudo ser comprobado debido a que no se contaba con alguna

molécula reportera, la cual pudiera estar unida covalentemente a este agente terapéutico y así para poder medir su biodistribución y/o farmacocinética *in vitro* y/o *in vivo*.

Con el fin de realizar la prueba de concepto de fusión entre liposomas y LVPs de VHC, se decidió formular los liposomas en las concentraciones anteriormente mencionadas utilizando el método TLH. Se utilizó como medio utilizando como hidratador el buffer en el cual se encuentran las LVPs del VHC (Tris 50mM, NaCl 100mM).

Posteriormente se procedió a marcar fluorescentemente a las LVPs anteriormente purificadas (55nm) y a los liposomas producidos (**Figura 22**), utilizando un marcador que tiene afinidad por membranas lipídicas y ha sido utilizado para el marcaje de membranas celulares (Vybrant Multicolor Cell-Labeling Kit). Los liposomas fueron marcados con el marcador lipofílico fluorescente DiO (Excitación=484nm, emisión=501nm), mientras que los LVPs fueron marcados con DiD (Excitación=644nm, emisión=665nm), debido a sus rangos alejados de excitación y emisión fluorescente (**Figura 31**)



**Figura 31. Espectros de excitación y emisión de los marcadores fluorescentes DiD y DiO.** Campos de excitación (líneas punteadas) y emisión (líneas sólidas) para los marcadores fluorescentes DiO y DiD.

Para la fusión entre los liposomas y las LVPs se aprovechó la estructura, composición y funcionamiento nativo de las partículas, utilizando la sonicación de las mismas durante 30s [117] y la acidificación del medio a pH=5.0 [118]. Estas condiciones han sido reportadas como las necesarias para generar la fusión entre VLDLs en sangre y las condiciones acidificantes para que LVPs se incorporen a liposomas *in vitro*. La fusión de ambas partículas se comprobó a través de la microscopía confocal fluorescente adaptada a sistemas nanométricos, obteniendo en más de una ocasión (de 6 a 8 cuadros en video, (**Figura 24**), la co-localización de LVPs y liposomas, comprobando que tanto la composición de los liposomas como la biofísica predicha para las LVPs producidas en *N. benthamiana* permiten formar el sistema LVP + liposoma para una potencial administración dirigida de fármacos hacia hepatocitos.



## Perspectivas en el uso del sistema VLP-liposoma (Cargado de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos)

El presente sistema LVP + liposoma (al menos *in vitro*), provee de todos los elementos necesarios para un sistema de administración controlada de fármacos hacia el hígado (hepatocitos). Es necesario realizar pruebas de marcaje inmunológico *in vitro* para poder identificar la localización específica de las glicoproteínas del VHC (E1 y E2), así como incorporar en futuras formulaciones, moléculas reporteras para observar la distribución de los fármacos y poder medir parámetros farmacocinéticos, rendimientos de encapsulación, así como la localización anatómica y compartimentalización de las moléculas terapéuticas.

Así mismo, es necesario realizar pruebas en cultivo celular de hepatocitos y posteriormente en sistemas modelo como ratas para observar la biodistribución y conocer si el tropismo natural de las LVPs es el factor de mayor éxito en la formulación del nuevo sistema.

## Conclusiones.

El presente proyecto reporta por primera vez la expresión de partículas similares a virus (VLPs) del Virus de la Hepatitis C (VHC), genotipo 1a, producidas transitoriamente en *N. benthamiana*. La optimización en el proceso de purificación y la caracterización final de las partículas virales, permitió identificar partículas en forma y tamaño a las reportadas en otros sistemas de cultivo celular. Específicamente, en este sistema vegetal (*N. benthamiana*) se pueden obtener 2 poblaciones de partículas con tamaños de 99nm y 50.89nm, las cuales carecen de

proyecciones aparentes en la superficie, pero presentan un centro denso en electrones una membrana la cual indica la incorporación de las VLPs en lipoproteínas de baja densidad (VLDL), contribuyendo a la teoría de una sola partícula planteada para la biofísica de VHC en cultivo celulares.

Este sistema puede ser incorporado a liposomas los cuales pueden ser formulados con agentes terapéuticos. Utilizando la capacidad de tropismo de las partículas virales y la capacidad de carga y fusión de los liposomas, este sistema se postula como un excelente candidato para la administración dirigida de fármacos hacia los hepatocitos.

## Bibliografía

- [1] Yun, Y., Lee, B. K., & Park, K. (2014). Controlled drug delivery systems: the next 30 years. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 8, 276–279.
- [2] Brambilla, D., Luciani, P., & Leroux, J. C. (2014). Breakthrough discoveries in drug delivery technologies: The next 30 years. *Journal of Controlled Release*, 190, 9–14.
- [3] Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhai, S., & Wood, M. J. A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*, 29, 341–345.
- [4] Shah, K. (2012). Mesenchymal stem cells engineered for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 739–748.
- [5] Kucerova, L., Altanerova, V., Matuskova, M., Tyciakova, S., & Altaner, C. (2007). Adipose Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Mediated Prodrug Cancer Gene Therapy. *Cancer Research*, 67, 6304–6313.
- [6] Bell, J., & Roy, D. (2013). Cell carriers for oncolytic viruses: current challenges and future directions. *Oncolytic Virotherapy*, 2, 47–53.
- [7] Selim, A., Lila, A., & Ishida, T. (2017). Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications, 40, 1–10.
- [8] Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2013). Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 36–48.
- [9] Eloy, J. O., Claro de Souza, M., Petrilli, R., Barcellos, J. P. A., Lee, R. J., & Marchetti, J. M. (2014). Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs:



Strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 345–363.

[10] Van Rijn, P., & Schirhagl, R. (2016). Viruses, Artificial Viruses and Virus-Based Structures for Biomedical Applications. *Advanced Healthcare Materials*, 5, 1386–1400.

[11] Unzueta, U., Saccardo, P., Domingo-Espín, J., Cedano, J., & Conchillo-Solé, (2014). Sheltering DNA in self-organizing, protein-only nano-shells as artificial viruses for gene delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10, 535–541.

[12] Glasgow, J., & Tullman-Ercek, D. (2014). Production and applications of engineered viral capsids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 5847–5858.

[13] Molino, N. M., & Wang, S.-W. (2014). Caged protein nanoparticles for drug delivery. *Current Opinion in Biotechnology*, 28, 75–82.

[14] Yildiz, I., Tsvetkova, I., Wen, A. M., Shukla, S., Masarapu, M. H., Dragnea, B., & Steinmetz, N. F. (2012). Engineering of Brome mosaic virus for biomedical applications. *RSC Advances*, 2, 3670–3677.

[15] Jutz, G., van Rijn, P., Santos Miranda, B., & Böker, A. (2015). Ferritin: A Versatile Building Block for Bionanotechnology. *Chemical Reviews*, 115, 1653–1701.

[16] Zochowska, M., Paca, A., Schoehn, G., Andrieu, J.-P., Chroboczek, J., Dublet, B., & Szolajska, E. (2009). Adenovirus Dodecahedron, as a Drug Delivery Vector. *PLoS ONE*, 4, 5569-5575.

[17] Guo, Y., Wang, X., Shu, X., Shen, Z., & Sun, R.-C. (2013). Self-Assembly and Paclitaxel Loading Capacity of Cellulose-grafted poly(lactide) Nanomicelles. *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 6234–6239.

[18] Kaczmarczyk, S. J., Sitaraman, K., Young, H. A., Hughes, S. H., & Chatterjee, D. K. (2011). Protein delivery using engineered virus-like particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 16998–17003.

[19] Suci, P. A., Varpness, Z., Gillitzer, E., Douglas, T., & Young, M. (2007). Targeting and Photodynamic Killing of a Microbial Pathogen Using Protein Cage Architectures Functionalized with a Photosensitizer. *Langmuir*, 23, 12280–12286.

[20] Aljabali, A. A. A., Shukla, S., Lomonosoff, G. P., Steinmetz, N. F., & Evans, D. J. (2013). CPMV-DOX Delivers. *Molecular Pharmaceutics*, 10, 3–10.

[21] Yildiz, I., Lee, K. L., Chen, K., Shukla, S., & Steinmetz, N. F. (2013). Infusion of imaging and therapeutic molecules into the plant virus-based carrier cowpea mosaic virus: Cargo-loading and delivery. *Journal of Controlled Release*, 172, 568–578.

[22] Zeng, Q., Wen, H., Wen, Q., Chen, X., Wang, Y., Xuan, W., & Wan, S. (2013). Cucumber mosaic virus as drug delivery vehicle for doxorubicin. *Biomaterials*, 34, 4632–4642.

- [23] Juarez, V., Pasolli, H. A., Hellwig, A., Garbi, N., & Arregui, A. C. (2012). Virus-Like Particles Harboring CCL19, IL-2 and HPV16 E7 Elicit Protective T Cell Responses in HLA-A2 Transgenic Mice. *The Open Virology Journal*, 6, 270–276.
- [24] Storni, T., Ruedl, C., Schwarz, K., Schwendener, R. A., Renner, W. A., & Bachmann, M. F. (2004). Nonmethylated CG motifs packaged into virus-like particles induce protective cytotoxic T cell responses in the absence of systemic side effects. *Journal of Immunology*, 172, 1777–1785.
- [25] Choi, K.-M., Kim, K., Kwon, I. C., Kim, I.-S., & Ahn, H. J. (2007). Systemic Delivery of siRNA by Chimeric Capsid Protein: Tumor Targeting and RNAi Activity *in vivo*. *Molecular Pharmaceutics*, 10, 18–25.
- [26] Ren, Y., Wong, S. M., & Lim, L.-Y. (2007). Folic Acid-Conjugated Protein Cages of a Plant Virus: A Novel Delivery Platform for Doxorubicin. *Bioconjugate Chemistry*, 18, 836–843.
- [27] Franco, D., Liu, W., Gardiner, D. F., Hahn, B. H., & Ho, D. D. (2011). CD40L-Containing Virus-Like Particle as a Candidate HIV-1 Vaccine Targeting Dendritic Cells. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 56, 393–400.
- [28] Niikura, K., Sugimura, N., Musashi, Y., Mikuni, S., Matsuo, Y., Kobayashi, S., & Ijiro, K. (2013). Virus-like particles with removable cyclodextrins enable glutathione-triggered drug release in cells. *Molecular BioSystems*, 9, 501-505.
- [29] Chou, M.-I., Hsieh, Y.-F., Wang, M., Chang, J., Chang, D., Zouali, M., & Tsay, G. J. (2010). *in vitro* and *in vivo* targeted delivery of IL-10 interfering RNA by JC virus-like particles. *Journal of Biomedical Science*, 17, 51-58.
- [30] Ashley, C. E., Carnes, E. C., Phillips, G. K., Durfee, P. N., Buley, M. D., Lino, C. A., & Peabody, D. S. (2011). Cell-Specific Delivery of Diverse Cargos by Bacteriophage MS2 Virus-like Particles. *ACS Nano*, 5, 5729–5745.
- [31] Galaway, F. A., & Stockley, P. G. (2013). MS2 Viruslike Particles: A Robust, Semisynthetic Targeted Drug Delivery Platform. *Molecular Pharmaceutics*, 10, 59–68.
- [32] Pan, Y., Zhang, Y., Jia, T., Zhang, K., Li, J., & Wang, L. (2012). Development of a microRNA delivery system based on bacteriophage MS2 virus-like particles. *FEBS Journal*, 279, 1198–1208.
- [33] Wu, M., Sherwin, T., Brown, W. L., & Stockley, P. G. (2005). Delivery of antisense oligonucleotides to leukemia cells by RNA bacteriophage capsids. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1, 67–76.
- [34] Abbing, A., Blaschke, U. K., Grein, S., Kretschmar, M., Stark, C. M. B., Thies, M. J. W., ... Reiser, C. O. A. (2004). Efficient Intracellular Delivery of a Protein and a Low Molecular Weight Substance via Recombinant Polyomavirus-like Particles. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 27410–27421.
- [35] Pokorski, J. K., Hovlid, M. L., & Finn, M. G. (2011). Cell targeting with hybrid Q $\beta$  virus-like particles displaying epidermal growth factor. *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology*, 12, 2441–2447.

- [36] Rhee, J.-K., Baksh, M., Nycholat, C., Paulson, J. C., Kitagishi, H., & Finn, M. G. (2012). Glycan-Targeted Virus-like Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *Biomacromolecules*, 13, 2333–2338.
- [37] Conriot, J., Silva, J. M., Fernandes, J. G., Silva, L. C., Gaspar, R., Brocchini, S., & Barata, T. S. (2014). Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Frontiers in Chemistry*, 2, 105-110.
- [38] Lockney, D. M., Guenther, R. N., Loo, L., Overton, W., Antonelli, R., Clark, J., & Franzen, S. (2011). The Red clover necrotic mosaic virus Capsid as a Multifunctional Cell Targeting Plant Viral Nanoparticle. *Bioconjugate Chemistry*, 22, 67–73.
- [39] Zhao, Q., Chen, W., Chen, Y., Zhang, L., Zhang, J., & Zhang, Z. (2011). Self-Assembled Virus-Like Particles from Rotavirus Structural Protein VP6 for Targeted Drug Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 22, 346–352.
- [40] Zhang, R., Zhang, S., Li, M., Chen, C., & Yao, Q. (2010). Incorporation of CD40 ligand into SHIV virus-like particles (VLP) enhances SHIV-VLP-induced dendritic cell activation and boosts immune responses against HIV. *Vaccine*, 28, 5114–5127.
- [41] D'Mello, R., Cruz, N., Chen, L., Kapoor, M., Lee, L., & Tyner, M. (2017). The evolving landscape of drug products containing nanomaterials in the United States. *Nature Nanotechnology*, 12, 523–529.
- [42] Schuppan, D., & Afdhal, N. H. (2008). Seminar Liver cirrhosis. *Lancet*, 371, 838–851.
- [43] Mishra, N., Yadav, N. P., Rai, V. K., Sinha, P., Yadav, K. S., Jain, S., & Arora, S. (2013). Efficient Hepatic Delivery of Drugs: Novel Strategies and Their Significance. *BioMed Research International*, 2013, 1–20.
- [44] Harashima, H., Sakata, K., Funato, K., & Kiwada, H. (1994). Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharmaceutical Research*, 11, 402–406.
- [45] Rensen, P., Sliedregt, L., Ferns, M., Kieviet, E., van Rossenberg, S., van Leeuwen, H., & Biessen, L. (2001). Determination of the Upper Size Limit for Uptake and Processing of Ligands by the Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes In Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 37577–37584.
- [46] Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R. K., & Stoffel, M. (2007). Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nature Biotechnology*, 25, 1149–1157.
- [47] Bijsterbosch, M. K., van de Bilt, H., & van Berkel, T. J. (1996). Specific targeting of a lipophilic prodrug of iododeoxyuridine to parenchymal liver cells using lactosylated reconstituted high density lipoprotein particles. *Biochemical Pharmacology*, 52(1), 113–121.
- [48] Dierling, A. M., & Cui, Z. (2005). Targeting primaquine into liver using chylomicron emulsions for potential vivax malaria therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 303, 143–152.

- [49] Lai, L., & Guo, H. (2011). Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 404, 317–323.
- [50] Jiang, H., Kwon, J., Kim, E., Kim, Y., Arote, R., Jere, D., & Cho, C.-S. (2008). Galactosylated poly(ethylene glycol)-chitosan-graft-polyethylenimine as a gene carrier for hepatocyte-targeting. *Journal of Controlled Release*, 131, 150–157.
- [51] Hashida, M., Nishikawa, M., & Takakura, Y. (1995). Hepatic targeting of drugs and proteins by chemical modification. *Journal of Controlled Release*, 36, 99–107.
- [52] Hattori, Y., Kawakami, S., Yamashita, F., & Hashida, M. (2000). Controlled biodistribution of galactosylated liposomes and incorporated probucol in hepatocyte-selective drug targeting. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 69, 369–377.
- [53] Yamada, T., Iwasaki, Y., Tada, H., Iwabuki, H., Chuah, M. K., Vandendriessche, T., & Kuroda, S. (2003). Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nature Biotechnol*, 21, 885–890.
- [54] Cunha, M., Esposito, D., Rocco, I., Maeda, A., Vasami, F., Nogueira, J., & da Fonseca, B. A. L. (2016). First Complete Genome Sequence of Zika Virus (Flaviviridae, Flavivirus) from an Autochthonous Transmission in Brazil. *Genome Announcements*, 4, 630-634.
- [55] Horsley-Silva, J., & Vargas, H. (2017). New Therapies for Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology & Hepatology*, 13, 22–31.
- [56] Lindenbach, B., & Rice, C. (2013). The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nature*, 11, 688–700.
- [57] Catanese, M, Uryu, K., Kopp, M., Edwards, T., Andrus, L., Rice, W. & Rice, C. (2013). Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 9505–9510.
- [58] Piver, E., Boyer, A., Gaillard, J., Bull, A., Beaumont, E., Roingeard, P., & Meunier, J. (2016). Ultrastructural organisation of HCV from the bloodstream of infected patients revealed by electron microscopy after specific immunocapture. *Gut Journal*, 14, 1640-1650.
- [59] Gastaminza, P., Dryden, K. a, Boyd, B., Wood, M., Law, M., Yeager, M., & Chisari, F. (2010). Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *Journal of Virology*, 84, 10999–11009.
- [60] Feinstone, S., Kapikian, A., Purcell, R., Alter, H. & Holland, P. (1975). Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *New England Journal of Medicine*, 292, 767–770.
- [61] Choo, Q. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244, 359–362
- [62] Smith, D., Bukh, J., Kuiken, C., Muerhoff, A., Rice, C., Stapleton, J., & Simmonds, P. (2014). Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes

and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*, 59, 318–327.

[63] Lindenbach, B. (2006). Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious *in vivo* and can be recultured *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 3805–3809.

[64] Lindenbach, B. (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309, 623–626.

[65] Fukuhara, T., Ono, C., Puig-Basagoiti, F., & Matsuura, Y. (2015). Roles of Lipoproteins and Apolipoproteins in Particle Formation of Hepatitis C Virus. *Trends in Microbiology*, 23, 618–629.

[66] Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. & Zhang, Q. (1999). Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 12766–12771.

[67] Monazahian, M. (1999). Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *Journal of Medical Virology*, 57, 223–229.

[68] Perrault, M., & Echeur, E. (2009). The hepatitis C virus and its hepatic environment: a toxic but finely tuned partnership. *Journal of Biochemistry*, 423, 303–314.

[69] Bankwitz, D. (2010). Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *Journal of Virology*, 84, 5751–5763

[70] Zona, L. (2013). HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell Host Microbe* 13, 302–313.

[71] Farquhar, J. (2012). Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *Journal of Virology*, 86, 4305–4316.

[72] Gastaminza, P., Kapadia, S. & Chisari, F. Differential biophysical properties of infectious intracellular and secreted hepatitis C virus particles. *Journal of Virology*, 80, 11074–11081.

[73] Miyanari, Y. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature*, 9, 1089–1097.

[74] Counihan, N., Rawlinson, S. & Lindenbach, B. (2011) Trafficking of hepatitis C virus core protein during virus particle assembly. *PLoS pathogens*. 7,2000-2006.

[75] Vieyres, G. (2010). Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *Journal of Virology* 84, 10159–10168.

[76] Bartenschlager, R. & Lohmann, V. (2000). Replication of hepatitis C virus. *Journal of Virology*, 81, 1631–1648.

[77] Choo, Q., Kuo, G., Weiner, A., Overby, L., Bradley, D. & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a bloodborne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244, 359– 362.



- [78] Lohmann, V., Körner, F., Koch, J. O., Herian, U., Theilmann, L. & Bartenschlager, R. (1999). Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 285, 110–113.
- [79] Lohmann, V. & Bartenschlager, R. (2013). On the History of Hepatitis C Virus Cell Culture Systems. *Journal of Medicinal Chemistry*, 123, 56-63.
- [80] Tanaka, T., Kato, N., Cho, M. & Shimotohno, K. (1995). A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 215, 744–749.
- [81] Kolykhalov, A., Feinstone, S. & Rice, C. M. (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *Journal of Virology*, 70, 3363–3371.
- [82] Bellier, B. & Klatzmann, D. (2013). Virus-like particle-based vaccines against hepatitis C virus infection. *Expert Review of Vaccines*, 12, 143–147.
- [83] Tsitoura, P., Georgopoulou, U., Pêtres, S., Varaklioti, A., Karafoulidou, A., Vagena, D. & Mavromara, P. (2007). Evidence for cellular uptake of recombinant hepatitis C virus non-enveloped capsid-like particles. *FEBS Letters*, 581, 4049–4057.
- [84] Klein, K., Dellos, S., & Lingappa, J. (2005). Identification of Residues in the Hepatitis C Virus Core Protein That Are Critical for Capsid Assembly in a Cell-Free System Identification of Residues in the Hepatitis C Virus Core Protein That Are Critical for Capsid Assembly in a Cell-Free System. *Royal Society of Chemistry*, 79, 6814–6826.
- [85] Mohammadzadeh, S., Khabiri, A., Roohvand, F., Memarnejadian, A., Salmanian, A., Ajdary, S. & Ehsani, P. (2014). Enhanced-transient expression of hepatitis C virus core protein in *Nicotiana tabacum*, a protein with potential clinical applications. *Hepatitis Monthly*, 14, 33-39.
- [86] Jeong, S., Qiao, M., Nascimbeni, M., Hu, Z., Rehmann, B., Murthy, K., & Liang, T. J. (2004). Immunization with Hepatitis C Virus-Like Particles Induces Humoral and Cellular Immune Responses in Nonhuman Primates. *Journal of Virology*, 78, 6995–7003.
- [87] Baumert, T., Ito, S., Wong, D., & Liang, T. (1998). Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *Journal of Virology*, 72, 3827–3836.
- [88] Belzhelarskaya, S., Koroleva, N., Popenko, V., Drutza, V., Orlova, O., Rubtzov, P., & Kochetkov. (2010). Hepatitis C virus structural proteins and virus-like particles produced in recombinant baculovirus-infected insect cells. *Molecular Biology*, 44, 97–108.
- [89] Triyatni, M., Saunier, B., Maruvada, P., Davis, A., Ulianich, L., Heller, T., & Liang, T. (2002). Interaction of Hepatitis C Virus-Like Particles and Cells: a Model System for Studying Viral Binding and Entry Interaction of Hepatitis C Virus-Like Particles and Cells. *Journal of Virology*, 76, 9335–9344.

- [90] Marsian, J., & Lomonosoff, G. P. (2016). Molecular pharming-VLPs made in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 201–206.
- [91] Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V., & Gleba, Y. (2004). In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 6852–6857.
- [92] Lussignol, M., Kopp, M., Molloy, K., Vizcay-Barrena, G., Fleck, R. a., Dörner, M., & Catanese, T. (2016). Proteomics of HCV virions reveals an essential role for the nucleoporin Nup98 in virus morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 1893-1896.
- [93] Xu, Y., Martinez, P., Séron, K., Luo, G., Allain, F., Dubuisson, J., & Belouzard, S. (2015). Characterization of Hepatitis C Virus Interaction with Heparan Sulfate Proteoglycans. *Journal of Virology*, 89, 3846–3858.
- [94] Zahn, A., & Allain, J. (2005). Hepatitis C virus and hepatitis B virus bind to heparin: Purification of largely IgG-free virions from infected plasma by heparin chromatography. *Journal of General Virology*, 86, 677–685.
- [95] Rabenstein, D. (2002). Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nature* 19, 312–331.
- [96] Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R., Fromm, J., Esko, J., Linhardt, R. & Marks, R. (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Medicine* 3, 866–871.
- [97] Patel, M., Yanagishita, M., Roderiquez, G., Bou-Habib, D., Oravec, T., Hascall, V. & Norcross, M. (1993). Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Research and Human Retroviruses* 9, 167–174.
- [98] Shieh, M., WuDunn, D., Montgomery, I., Esko, J. & Spear, P. (1992). Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *Journal of Cell Biology* 116, 1273–1281.
- [99] Barth, H., Schäfer, C., & Adah, I. (2003). Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 41003–41012.
- [100] Esko, J., & Selleck, S. (2002). Order Out of Chaos: Assembly of Ligand Binding Sites in Heparan Sulfate. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 435–471.
- [101] Basu, A., Kanda, T., Beyene, A., Saito, K., Meyer, K., & Ray, R. (2007). Sulfated Homologues of Heparin Inhibit Hepatitis C Virus Entry into Mammalian Cells. *Journal of Virology*, 81, 3933–3941.
- [102] Koutsoudakis, G., Dragun, J., Pérez-del-Pulgar, S., Coto-Llerena, M., Mensa, L., Crespo, G., & Forns, X. (2012). Interplay between Basic Residues of Hepatitis C Virus Glycoprotein E2 with Viral Receptors, Neutralizing Antibodies and Lipoproteins. *PLoS ONE*, 7, 261-265.



- [103]** Gastaminza, P., Kapadia, S., & Chisari, F. (2006). Differential Biophysical Properties of Infectious Intracellular and Secreted Hepatitis C Virus Particles. *Journal of Virology*, 80, 11074–11081.
- [104]** Nielsen, S., Bassendine, M., Burt, A., Martin, C., Pumeechockchai, W., & Toms, G. (2006). Association between Hepatitis C Virus and Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL)/LDL Analyzed in Iodixanol Density Gradients. *Journal of Virology*, 80, 2418–2428.
- [105]** Kaito, M., Watanabe, S., Tsukiyama-Kohara, K., Yamaguchi, K., Kobayashi, Y., Konishi, M., & Kohara, M. (1994). Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *Journal of General Virology*, 75, 1755–1760.
- [106]** Li, X., Jeffers, L., Shao, L., Reddy, K., de Medina, M., Scheffel, J., & Schiff, E. R. (1995). Identification of hepatitis C virus by immunoelectron microscopy. *Journal of Viral Hepatitis*, 2, 227–234.
- [107]** Maillard, P., Krawczynski, J., Nitkiewicz, C., Bronnert, M., Sidorkiewicz, P., Gounon, J., Dubuisson, G., Faure, R., Crainic, and A. Budkowska. (2001). Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *Journal of Virology*, 75, 8240–8250.
- [108]** Trestard, A., Bacq, Y., Buzelay, L., Dubois, F., Barin, F., Goudeau, A., & Roingeard, P. (1998). Ultrastructural and physicochemical characterization of the hepatitis C virus recovered from the serum of an agammaglobulinemic patient. *Archives of Virology*, 143, 2241–2245.
- [109]** Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., & Liang, T. J. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine*, 11, 791–796
- [110]** Yu, X., Qiao, M., Atanasov, I., Hu, Z., Kato, T., Liang, T., & Zhou, Z. (2007). Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. *Virology*, 367, 126–134.
- [111]** Felmler, D., Hafirassou, M., Lefevre, M., Baumert, T., & Schuster, C. (2013). Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins - Impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. *Viruses*, 5, 1292–1324.
- [112]** Vrignaud, S., Benoit, J., & Saulnier, P. (2011). Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials*, 32, 8593–8604.
- [113]** Torchilin, V. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature reviews Drug discovery*, 4, 145–160.
- [114]** Bangham, A., Standish, M., & Watkins, J. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13, 238–252.
- [115]** Pyc, M., Cai, Y., Greer, M., Yurchenko, O., Chapman, K., Dyer, J., & Mullen, R. (2017). Turning Over a New Leaf in Lipid Droplet Biology. *Trends in Plant Science*, 22, 596–609



**[116]** Chagoya de Sánchez, V., Hernández-Muñoz, R., Yáñez, L., Vidrio, S., & Díaz-Muñoz, M. (1995). Possible mechanism of adenosine protection in carbon tetrachloride acute hepatotoxicity. Role of adenosine by-products and glutathione peroxidase. *Journal of Biochemical Toxicology*, 10, 41–50.

**[117]** Lu, M., & Gursky, O. (2013). Aggregation and fusion of low-density lipoproteins *in vivo* and *in vitro*, *BioMolecular Concepts* 4, 501–518.

**[118]** Lavillette, D., Bartosch, B., Nourrisson, D., Verney, G., Cosset, F., Penin, F., & P cheur, E. (2006). Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 3909–3917.