

UNIVERSIDAD ORT URUGUAY

FACULTAD DE INGENIERÍA

Diseño de nanopartículas conteniendo β -glucuronidasa con potencial uso en terapia enzimática directa

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Carolina Iglesias (190959)

Melanie Williams (194528)

Tutor: Lorena Betancor

2019

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Nosotras, Carolina Iglesias y Melanie Williams, declaramos que el trabajo que se presenta en esta obra es de nuestra propia mano. Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el proyecto final de la carrera Ingeniería en Biotecnología;
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotras;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Carolina Iglesias



Melanie Williams

1 de marzo del 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a todas las personas que nos acompañaron a lo largo del proyecto:

- A nuestra tutora la Dra. Lorena Betancor por guiarnos en el proceso, ayudarnos a cumplir los objetivos planteados y siempre tenernos paciencia.
- A Sonalí Correa y Erienne Jackson por ayudarnos en el diseño de experimentos.
- A todo el personal del Laboratorio de Biotecnología ORT por ayudarnos en distintos aspectos en la elaboración del proyecto.
- A nuestros compañeros de carrera por todo lo compartido y por el apoyo durante toda la carrera.
- A nuestras familias y amigos por el amor y el sostén incondicional.

ABSTRACT

El diseño de novedosos agentes antitumorales que permiten la destrucción de células malignas sin afectar a los tejidos sanos se ha convertido en uno de los mayores desafíos en la biomedicina. La terapia enzimática prodroga dirigida (DEPT) utiliza enzimas introducidas artificialmente en el cuerpo para convertir prodrogas en su forma activa en el sitio de interés. De esta manera, los nanoterapéuticos están progresando rápidamente y se están implementando para resolver varias limitaciones de los sistemas convencionales de administración de medicamentos, como la biodistribución y la focalización no específica, falta de solubilidad en agua, baja biodisponibilidad oral y bajos índices terapéuticos. Para estos casos, se ha aprovechado las propiedades de las nanopartículas magnéticas (MNPs), las cuales pueden absorber energía en presencia de un campo magnético alterno (AMF) y liberarla al entorno en forma de calor. Esta propiedad ha dado lugar al desarrollo de una terapia para el tratamiento de cáncer, conocida como hipertermia magnética (MH). Las MNPs actúan como transmisores del calor a zonas concretas, consiguiendo un aumento de la temperatura de forma local. Las β -glucuronidasas son miembros de la familia de enzimas glicosidasas que catalizan la descomposición de carbohidratos complejos. Específicamente, la β -glucuronidasa de *Patella vulgata* ha demostrado ser una enzima superior para la hidrólisis de fármacos-glucuronidos y a su vez, posee una temperatura óptima alta, lo cual es una ventaja para ser utilizada en MH. La β -glucuronidasa puede ser utilizada, por ejemplo, en la transformación de la prodroga "irinotecán" en la droga anticáncer "SN 38". Su unión a MNPs permitiría mediante MH activar la enzima remotamente y aumentar la tasa de producción de la droga en el sitio de interés. Por lo tanto, en este trabajo se propuso realizar el diseño de nanopartículas conteniendo β -glucuronidasa para su uso potencial con este fin. Se logró caracterizar la enzima, aportando mucha información que no se encontraba disponible previamente, e inmovilizar la misma a nanopartículas magnéticas aminadas, generando un catalizador heterogéneo muy estable respecto a la enzima soluble. De esta forma, se logró generar un inmovilizado con potencial uso en DEPT.

PALABRAS CLAVE

Terapia enzimática prodroga dirigida, hipertermia magnética, β -glucuronidasa, nanopartículas, inmovilización.

ABREVIACIONES

°C - grados Celsius

μL - microlitros

% I - Porcentaje de Inmovilización

%R - Porcentaje de Rendimiento

AcMos - Anticuerpos monoclonales

ACMF - Campo magnético de corriente alterna [del inglés: alternating current magnetic field]

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

AMF - Campo magnético alterno [del inglés: alternating magnetic field]

ARN - Ácido ribonucleico

ARNip - ARN cortos de interferencia

BCA - Ácido bicinconínico

BSA - Albúmina de suero bovino

Da - Dalton

DEPT - Terapia enzimática prodroga dirigida [del inglés: Directed Enzyme-Prodrug Therapy]

dil - dilución

EDC- N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

ELISA - Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas [del inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay]

FDA - Administración de Alimentos y Medicamentos [del inglés: Food and Drug Administration]

Fe3O4 - Óxido de hierro superparamagnético

FPLC - Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad [del inglés: Fast protein liquid chromatography]

g - gramos

GC - Cromatografía de gases [del inglés: Gas chromatography]

GUS - β -glucuronidasa

LC-MS - Cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas [del inglés: Liquid chromatography–mass spectrometry]

LTSL - Liposoma lisolípido térmicamente sensible [del inglés: lysolipid thermally sensitive liposome]

M - molar

mg - miligramos

min - minutos

mM - milimolar

mL - mililitros

MES - Ácido 2-etanosulfónico

MH - Hipertermia magnética [del inglés: magnetic hyperthermia]

MNPs - Nanopartículas magnéticas

MRI - Resonancia magnética

nm - nanómetros

NPs - Nanopartículas

PEG - Polietilenglicol [del inglés: polyethylene glycol]

PEI - Polietilenimina

PLA - Ácido poliláctico

PLGA - Poliláctido-co-glicólido

pNPG - 4-Nitrophenyl b-D-glucuronide

p / v - peso/volumen

RES - Sistema reticuloendotelial

RFU - Unidad de fluorescencia relativa [del inglés: relative fluorescence units]

rpm - Revolución por minuto

TNF - Factor de necrosis tumoral [del inglés: tumor necrosis factor]

TMOS - Tetrametil ortosilicato

UGT - UDP-glucuronosiltransferasa

UI/ mL - unidad de actividad enzimática por mililitro

NaCl - Cloruro de Sodio

NaOH - Hidróxido de sodio

NaP - Fosfato de sodio

NHS- N-hidroxisuccinimida

OPAME - o-ftalaldehído-β-mercaptoetanol

PI - Punto isoeléctrico

PM - Peso molecular

4 MUG - 4-metil-umbeliferil-β-D-glucurónido

4 MU - 4-metil umbeliferona

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 13 |
| 1.1 TERAPIA ENZIMÁTICA DIRIGIDA EN TRATAMIENTO DE CÁNCER..... | 13 |
| 1.1.1 Terapias convencionales | 13 |
| 1.1.2 Terapia enzimática dirigida..... | 15 |
| 1.1.3 Terapia dirigida con anticuerpos | 16 |
| 1.1.4 Terapia dirigida con nanopartículas..... | 17 |
| 1.1.4.1 Clases de nanopartículas y nanodrogas | 18 |
| 1.1.5 Utilización de nanopartículas magnéticas (MNPs) en terapia enzimática dirigida | 21 |
| 1.1.6 Liberación de fármacos guiados por nanopartículas magnéticas..... | 23 |
| 1.2 ENZIMAS..... | 25 |
| 1.2.1 β -glucuronidasa | 26 |
| 1.2.2 Actividad enzimática | 27 |
| 1.3 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS | 28 |
| 1.3.1 Métodos de inmovilización de enzimas por retención física | 29 |
| 1.3.1.1 Atrapamiento..... | 29 |
| 1.3.2 Métodos de inmovilización de enzimas por unión química..... | 29 |
| 1.3.2.1 Adsorción..... | 30 |
| 1.3.2.2 Unión covalente..... | 30 |
| 1.3.3 Efectos de la inmovilización | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 1.3.4 Efectos en la estabilidad | 32 |
| 1.3.5 Efectos en la actividad enzimática | 32 |
| 2. OBJETIVOS | 34 |
| 2.1 OBJETIVO GENERAL | 34 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 34 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 35 |
| 3.1 MATERIALES | 35 |
| 3.2 ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA | 35 |
| 3.3 CUANTIFICACIÓN PROTEICA POR ENSAYO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO..... | 38 |
| 3.4 GEL FILTRACIÓN DE LA ENZIMA | 39 |
| 3.5 PERFIL CROMATOGRÁFICO - FPLC..... | 40 |
| 3.6 ESTUDIO DE pH Y TEMPERATURA ÓPTIMA..... | 40 |
| 3.7 ETUDIO DE ESTABILIDAD EN pH y EN TEMPERATURA..... | 40 |
| 3.8 INMOVILIZACIÓN DE β -GLUCURONIDASA EN NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA BIOMIMÉTICA | 41 |
| 3.8.1 Síntesis de nanopartículas de sílica biomimética | 41 |
| 3.8.2 Diferentes estrategias para inmovilizar GUS en nanopartículas de sílica biomimética | 42 |
| 3.8.2.1 Por atrapamiento..... | 42 |
| 3.8.2.2 Por adsorción a superficie..... | 43 |
| 3.9 INMOVILIZACIÓN DE β -GLUCURONIDASA EN NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS..... | 44 |
| 3.10 ATRAPAMIENTO DEL CONJUGADO β -GLUCURONIDASA-MNPs EN SÍLICA BIOMIMÉTICA..... | 45 |
| 3.11 ESTABILIDAD TÉRMICA DE LA ENZIMA INMOVILIZADA..... | 46 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 47 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.1 | CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE GUS | 47 |
| 4.1.1 | Ensayo de actividad enzimática evaluando diferentes sustratos | 47 |
| 4.1.1.1 | Sustrato cromogénico - PNPG | 47 |
| 4.1.1.2 | Sustrato fluorescente - 4-MUG..... | 51 |
| 4.1.2 | Cuantificación proteica por método BCA..... | 54 |
| 4.1.3 | Perfil cromatográfico - FPLC..... | 56 |
| 4.1.4 | Estudio de parámetros óptimos | 59 |
| 4.1.4.1 | pH óptimo | 60 |
| 4.1.4.2 | Temperatura óptima..... | 61 |
| 4.1.4.3 | Estabilidad térmica | 62 |
| 4.1.4.4 | Estabilidad de la enzima frente a diferentes condiciones de pH..... | 64 |
| 4.2 | INMOVILIZACIÓN DE GUS EN NANOPARTÍCULAS | 65 |
| 4.2.1 | Síntesis de nanopartículas en ausencia de enzima | 66 |
| 4.2.2 | Atrapamiento en sílica biomimética utilizando diferentes catalizadores aminados | 66 |
| 4.2.3 | Adsorción iónica en nanopartículas de sílica biomimética | 69 |
| 4.2.4 | Inmovilización en nanopartículas magnéticas | 72 |
| 4.2.4.1 | Unión covalente | 72 |
| 4.2.4.2 | Adsorción iónica..... | 74 |
| 4.2.4.3 | Atrapamiento en sílica | 78 |
| 4.2.5 | Caracterización de los nanoinmovilizados | 79 |
| 4.2.5.1 | Estabilidad térmica..... | 79 |
| 4.3 | PROYECCIONES FUTURAS | 82 |
| 5. | ANÁLISIS ECONÓMICO | 83 |

| | |
|------------------------------|----|
| 6. CONCLUSIONES | 84 |
| 7. REFERENCIAS | 85 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 TERAPIA ENZIMÁTICA DIRIGIDA EN TRATAMIENTO DE CÁNCER

Se entiende como cáncer al conjunto de enfermedades con diferente etiología, pronóstico y tratamiento, caracterizadas por el excesivo y descontrolado crecimiento celular, que invade y daña tejidos, provocando la muerte del organismo. La falta de control de la proliferación celular es el resultado de múltiples alteraciones en el ADN (Ácido Desoxirribonucleico) de las células, las cuales resultan en mutaciones en los genes que codifican para proteínas reguladoras de este proceso ¹.

Se han realizado innumerables investigaciones que han conducido al desarrollo de tratamientos para combatir el cáncer debido a que las terapias convencionales presentan diversas desventajas.

1.1.1 Terapias convencionales

Las terapias convencionales consisten en cirugías, radioterapias y quimioterapias. Una gran problemática de estas formas de tratamiento es que los mismos no están dirigidas específicamente a las células cancerosas, desafortunadamente, estos también causan daño significativo en las células normales.

La cirugía sigue siendo una de las metodologías más usadas para el tratamiento del cáncer. Se puede utilizar la cirugía para extirpar el tumor junto con cualquier tejido alrededor que pudiera contener células cancerosas ². Este método es más efectivo cuando no se ha generado

metástasis, sin embargo, algunas veces es difícil determinar el alcance de la cirugía que se necesita hasta que el cirujano tiene la oportunidad de ver la extensión del tumor durante la operación ².

Otro método utilizado es la radioterapia, utiliza rayos de alta energía, como rayos X, para tratar el cáncer. Este tipo de terapia destruye las células cancerosas en el área tratada al dañar el ADN de estas células. Sin embargo, presenta diversas desventajas ya que la radiación también afecta a las células normales. Esto puede causar efectos secundarios en el área en la que está recibiendo tratamiento. Por lo general, los efectos secundarios mejoran unas pocas semanas después del tratamiento, pero algunos pueden continuar a largo plazo. A su vez, no mata todas las células cancerosas en los tumores, entre otras desventajas ².

Por último, la quimioterapia consiste en la administración de sustancias químicas para el tratamiento de la enfermedad. Es uno de los métodos terapéuticos más empleados, usando para ello una amplia variedad de fármacos antineoplásicos, los cuales son sustancias que impiden el desarrollo, crecimiento, o proliferación de células tumorales malignas. A diferencia de la radioterapia o la cirugía, los medicamentos quimioterapéuticos pueden tratar el cáncer que se ha propagado, ya que viajan por todo el torrente sanguíneo. El desarrollo de efectos secundarios relacionados con el tratamiento es la desventaja más importante de la quimioterapia. Los pacientes a menudo experimentan síntomas como náuseas, vómitos, y pérdida de apetito. Otro de los efectos más aparente y emocionalmente difícil es la pérdida del cabello. Además, el tratamiento requiere mucho tiempo ².

Como consecuencia de los diversos efectos secundarios que se generan en las terapias convencionales, se plantean nuevas alternativas para tratar esta enfermedad que sean menos invasivas y más específicas.

1.1.2 Terapia enzimática dirigida

El diseño de novedosos agentes antitumorales que permiten la destrucción de células malignas sin afectar a los tejidos sanos se ha convertido en uno de los mayores desafíos en la química médica. Dentro de este marco, numerosos esfuerzos de investigación se centraron en el desarrollo de sistemas químicos auto-sensibles programados para administrar selectivamente potentes citotóxicos en el sitio del tumor. Tales sistemas son generalmente conjuntos moleculares complejos que construyen en su estructura: una unidad de selección que permite el reconocimiento de una especificidad asociada al tumor y un activador enzimático o químico que puede activarse exclusivamente en tejidos cancerosos para inducir la liberación de la droga de una manera estrictamente controlada. La gran mayoría de los sistemas de administración de fármacos que se han desarrollado hasta ahora se diseñaron para dirigirse a las regiones específicas de la superficie de células cancerosas ³.

Los sistemas de administración de fármacos diseñados para dirigirse a las regiones específicas de la superficie celular se basan en la heterogeneidad de los tejidos cancerosos. De hecho, todas las células de una masa tumoral no son idénticas y muestran diferentes concentraciones de un marcador de superficie celular dado. Por lo tanto, sólo las células cancerosas que expresan el marcador asociado al tumor seleccionado a un nivel suficiente se ven directamente afectadas por esta clase de sistemas de direccionamiento. En este contexto, el uso de profármacos sensibles a las enzimas que pueden ser selectivamente activados por la enzima correspondiente que se sobreexpresa de forma natural en el microambiente del tumor ofrece una alternativa valiosa a este enfoque de focalización ³.

Esta modalidad de tratamiento se denomina Terapia enzimática prodroga dirigida (DEPT). Esta terapia utiliza enzimas introducidas artificialmente en el cuerpo para convertir prodrogas, que tienen una actividad biológica pobre o nula, en su forma activa en la ubicación deseada dentro del cuerpo. Las estrategias DEPT son un método experimental para reducir la

toxicidad sistémica de un fármaco, al lograr altos niveles del fármaco activo solo en el sitio deseado ⁴.

La mayoría de las terapias dirigidas actuales utilizan nanopartículas o anticuerpos monoclonales ⁵.

1.1.3 Terapia dirigida con anticuerpos

Según lo planteado en el estudio de Trevor T. Hansel *et al* (2010) ⁶, con la aparición de la tecnología del hibridoma, los anticuerpos monoclonales se han convertido en una exitosa herramienta en la clínica para el tratamiento de numerosas enfermedades, entre ellas el cáncer. En efecto, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos, ha aprobado más de veinte anticuerpos monoclonales (AcMos), al mismo tiempo que más de 150 se encuentran actualmente en la etapa de ensayos clínicos. Sin embargo, se han encontrado efectos adversos con el uso de AcMos en terapias dirigidas, en ciertos casos de carácter fatal. También se han evidenciado efectos negativos durante estudios clínicos con AcMos. Entre los efectos secundarios más relevantes se encuentran las reacciones inmunes, infecciones, desórdenes trombóticos, enfermedades autoinmunes e incluso la progresión y/o aparición de tumores cancerígenos. Un ejemplo que ha sido investigado y sigue generando controversia es el de la terapia con Infliximab, el cual es un AcMo específico inhibidor del Factor de necrosis tumoral (anti - TNF), al cual se asocia con el agravamiento de tumores y aumento de la tumorigenicidad ⁶. En 3493 pacientes que habían recibido terapia con Infliximab, se reportaron aumentos en el riesgo de aparición de malignidades dependientes de la dosis, durante el tratamiento ^{6,7}.

1.1.4 Terapia dirigida con nanopartículas

La nanotecnología se reconoce actualmente como uno de los mayores avances del siglo XXI. Múltiples campos de la ciencia y la industria buscan su desarrollo con el fin de poder aplicarla en el día a día. Los dispositivos de tamaño nanométrico son aquellos comprendidos en la escala entre 1 y 100 nm. Las nanopartículas (NPs) se sitúan en esta escala de tamaño y tienen la característica de poseer propiedades diferentes a las de los sólidos macroscópicos, aún teniendo la misma composición química. En biomedicina se presentan como una estrategia esperanzadora especialmente en el campo del diagnóstico, como agentes de contraste y tratamiento de enfermedades como soporte de medicamentos y de nuevas terapias ⁸.

Según lo propuesto en la investigación de Tranoy-Opalinski *et al* (2014) ³, los nanoterapéuticos contra el cáncer están progresando rápidamente y se están implementando para resolver varias limitaciones de los sistemas convencionales de administración de medicamentos, como la biodistribución y la focalización no específica, falta de solubilidad en agua, baja biodisponibilidad oral y bajos índices terapéuticos. Para mejorar la biodistribución de medicamentos contra el cáncer, se han diseñado nanopartículas con un tamaño óptimo y características de superficie para aumentar su tiempo de circulación en el torrente sanguíneo. También pueden cargar medicamentos activos a las células cancerosas mediante el uso selectivo de la fisiopatología única de los tumores, como su mayor permeabilidad y efecto de retención y el microambiente tumoral. Por estos motivos, la terapia dirigida ha surgido como un enfoque para superar la falta de especificidad de los agentes convencionales quimioterapéuticos ³.

Las terapias dirigidas se eligen o diseñan para que actúen en sus blancos, mientras que muchas quimioterapias regulares se identificaron porque destruyen células. Asimismo, estas terapias son con frecuencia citostáticas, es decir, bloquean la proliferación de las células

tumorales, mientras que las sustancias ordinarias de quimioterapia son citotóxicas, destruyen células tumorales ⁹.

1.1.4.1 Clases de nanopartículas y nanodrogas

Existen diferentes clases de nanopartículas que se han utilizado para el delivery de drogas, las cuales se describen a continuación:

Liposomas

Son vesículas basadas en lípidos que tienen la capacidad de transportar cargas en una matriz acuosa, o incrustadas en la bicapa lipídica. Varios liposomas con la adición de ligandos de direccionamiento, como el anticuerpo “mAb 2C5” con doxorubicina, se encuentran en la fase preclínica, mientras que otros ya se están sometiendo a ensayos clínicos ¹⁰. También se han logrado avances en el diseño de liposomas con el agregado de polietilenglicol (PEG), el cual es un poliéter que genera un aumento del tiempo de circulación, así como las estrategias para una liberación desencadenada del fármaco una vez internalizado. Por ejemplo, ThermoDox utiliza la tecnología Liposoma lisólípido térmicamente sensible (LTSL) para encapsular la doxorubicina, un fármaco ampliamente utilizado en las quimioterapias. El liposoma es sensible al calor y cambia rápidamente de estructura cuando se expone a temperaturas entre 40 °C -45 °C, creando aberturas en el liposoma que liberan doxorubicina directamente dentro y alrededor del tumor objetivo. ThermoDox se encuentra actualmente en ensayos de fase III ^{11,12,13}.

Dendrímeros

Los dendrímeros son estructuras globulares bien definidas de polímeros multiramificados que se caracterizan por presentar un núcleo central, ramas de unidades repetitivas y una capa externa de grupos funcionales multivalentes. Estos grupos funcionales son capaces de interactuar electrostáticamente con moléculas polares cargadas, mientras que las cavidades internas hidrofóbicas pueden encapsular moléculas no cargadas, no polares a través de una serie de interacciones. Los grupos funcionales externos también permiten la administración controlada del fármaco mediante modificaciones que solo se liberan en un determinado pH o cuando se encuentran con enzimas específicas; moléculas diana, tales como el péptido RGD. Además, la unión covalente de fármacos hidrofóbicos como la doxorrubicina y paclitaxel se utiliza con frecuencia ^{14, 15, 16}. Los dendrímeros, como los copolímeros de poli (ácido glutámico) -b-poli (fenilalanina), también se pueden autoensamblar en micelas para administrar medicamentos en su núcleo. Múltiples ensayos clínicos se están llevando a cabo con el copolímero de dibloque anfifílico que forma micelas para administrar Paclitaxel para tratar cáncer de pulmón y cáncer de mama avanzado ¹⁷.

Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono tienen la capacidad de ingresar a las células mediante un mecanismo de penetración "tipo aguja" y transportar moléculas al citoplasma. Estas nanopartículas están equipadas con un área de superficie grande que proporciona una serie de sitios de unión para potenciales ligandos de direccionamiento, así como una cavidad interna que puede contener agentes terapéuticos o de diagnóstico. Estos nanotubos de carbono también presentan conductividad eléctrica y térmica, lo que puede resultar útil en futuras aplicaciones de terapia contra el cáncer, como las ablaciones térmicas ¹⁸. La longitud y el diámetro de estos nanotubos pueden ser cruciales para evitar un efecto inflamatorio, haciendo que los nanotubos más cortos y gruesos sean más deseables. Las aplicaciones

actuales de los nanotubos incluyen la incorporación de fármacos tales como Doxorrubicina y Paclitaxel, ácidos nucleicos que incluyen oligonucleótidos antisentido y ARN pequeños de interferencia (ARNip), también como agentes de contraste para la formación de imágenes ¹⁸. Hasta el momento, no hay ensayos clínicos que hayan comenzado a usar nanotubos de carbono para el tratamiento o diagnóstico del cáncer, principalmente debido a problemas de toxicidad y su similitud con las fibras de amianto ¹⁵.

Nanopartículas metálicas y magnéticas

Las nanopartículas de oro, se pueden usar para liberar moléculas pequeñas como proteínas, ADN o ARN. El núcleo de oro se considera no tóxico y la carga útil terapéutica puede ser forzada a ser liberada del conjugado debido a sus propiedades fotofísicas. Las drogas se pueden unir fácilmente a través de enlaces iónicos o covalentes, o mediante otro tipo de interacciones. Al igual que para muchas nanodrogas, el PEG se puede unir a la superficie de nanopartículas metálicas para aumentar la estabilidad y el tiempo de circulación, además de otros agentes de orientación ¹⁷. Actualmente, se está llevando a cabo un ensayo clínico de fase I que utiliza el factor de necrosis tumoral α (TNF α) unido al oro coloidal para tratar tumores sólidos avanzados como los sarcomas y los melanomas. Las nanopartículas de óxido de hierro (Fe₃O₄) también están en desarrollo y requieren el uso de estrategias locales de hipertermia para administrar fármacos conjugados. Los campos magnéticos también pueden usarse para guiar el medicamento al área del objetivo deseado dentro del cuerpo ¹⁹. Estas clases de partículas se están investigando exhaustivamente para su uso en imágenes, diagnóstico y terapia ²⁰.

1.1.5 Utilización de nanopartículas magnéticas (MNPs) en terapia enzimática dirigida

Las MNPs presentan la ventaja de que su momento magnético hace posible su uso para diferentes funciones, por ejemplo, pueden absorber energía en presencia de un campo magnético alterno (AMF) y liberarla al entorno en forma de calor. Esta propiedad ha dado lugar al desarrollo de una terapia para el tratamiento de cáncer, conocida como hipertermia magnética (MH) basada en la sensibilidad aumentada que las células tumorales tienen al calor en comparación con las células sanas ²¹.

El tratamiento por hipertermia se conoce desde hace años, y se induce de forma tradicional con ultrasonidos, microondas, radiación infrarroja o cámaras de agua caliente. Estos métodos presentan el inconveniente de no ser capaces de alcanzar temperaturas suficientemente elevadas en los tumores, además de aplicarse de forma general sobre el organismo. Las MNPs actúan como transmisores del calor a zonas concretas, consiguiendo un aumento de la temperatura de forma local. Así, se puede aumentar la temperatura de una zona corporal de forma limitada evitando efectos adversos en tejidos sanos ²². Además, permiten mantener dosis de quimio y radioterapia tolerables para el paciente, pero aumentando su efectividad de forma notable, observándose diferentes comportamientos en función del fármaco citotóxico ²³.

El fundamento físico-químico de la hipertermia se basa en que al aplicar un campo magnético de corriente alterna (ACMF), las nanopartículas tienen la capacidad de generar calor. Tras aplicar el ACMF los spines de los átomos sufrirán el proceso de magnetización reversa, en la que se liberará energía en forma de fotones a las zonas próximas a donde se encuentran las MNPs, resultando en un aumento de la temperatura ²².

El proceso de relajación será diferente en función del tamaño de la partícula. Los momentos magnéticos de partículas monodominio en el rango nanométrico pueden reorientarse de dos formas: (i) mediante relajación de Néel o bien (ii) mediante relajación de Brown. El proceso de hipertermia tiene la ventaja de ser selectivo sobre las células tumorales, de forma que los cambios metabólicos y sobre los ácidos nucleicos son mucho menos relevantes en las células sanas, incluso reversibles a las horas del tratamiento. Esto se debe fundamentalmente al entorno celular: las células sanas se rodean de vasos formados perfectamente que aumentan el flujo sanguíneo tras el tratamiento como respuesta al proceso inflamatorio, de forma que el calor se disipa y no se ven afectadas. Las células tumorales tienen una estructura vascular tortuosa o muy escasa (especialmente en zonas internas del tumor) que evitan la disipación del calor ²⁴.

Las MNPs de magnetita son las que más ampliamente se han investigado para el tratamiento por hipertermia, ya que presentan una gran elevación de la temperatura proporcionalmente a la cantidad de MNPs administradas, lo que permite un control bastante exacto de la temperatura que se provoca modulando el ACMF aplicado ^{25, 26}.

Se ha comprobado que para el tratamiento por hipertermia los recubrimientos inorgánicos, sobretodo de sílica y sus derivados, son más eficientes y producen un mayor descenso en la supervivencia tumoral. Esto se debe a dos motivos, en primer lugar, el radio hidrodinámico más pequeño y la carga superficial más negativa respecto al recubrimiento con polímeros favorece la internalización de las nanopartículas. En segundo lugar, los polímeros se degradan por la acción lisosomal en el interior celular, provocando agregación intracelular que conlleva a un aumento menos marcado de la temperatura ²⁷.

La nanotecnología, espera generar una terapia más efectiva y menos tóxica, si supera la fase de ensayos clínicos. Hasta ahora los resultados son esperanzadores en la fase I de los ensayos, que indican una regresión de los tumores utilizando unas dosis de medicamentos

anticancerígenos menores que en la quimioterapia convencional. Sin embargo, al ser un área de investigación bastante reciente se requieren más evaluaciones para poder determinar la forma de administración, distribución, metabolismo y eliminación de estas nanopartículas. Se deben estandarizar los ensayos de citotoxicidad para poder evaluar las reacciones que puede generar, evaluar la funcionalización para evitar la agregación. A su vez, al ser tan pequeñas y tener gran área superficial pueden generar toxicidad. Estos problemas no deben verse como desventajas sino un campo de investigación muy prometedor. Además, existe gran interés en el área biomédica en poder estandarizar las metodologías tanto *in vitro* como *in vivo*, debido a todas las ventajas que esta tecnología puede aportar. Además, no solo se debe profundizar en el estudio del mecanismo de acción de las nanopartículas de forma independiente, sino que al mismo tiempo debe complementar con una caracterización más precisa de los blancos moleculares.

1.1.6 Liberación de fármacos guiados por nanopartículas magnéticas

Las MNPs se estudian como potencial vehículo de fármacos a tejidos concretos, y especialmente a tumores considerando los graves efectos adversos que producen los antineoplásicos al alcanzar tejidos sanos. Además, pueden combinarse con otras aplicaciones biomédicas como el diagnóstico por resonancia magnética (MRI) o la hipertermia ²⁸.

La liberación de fármacos guiada por MNPs consiste en asociar moléculas con actividad quimioterapéutica a las nanopartículas, de forma que al aplicar un campo magnético externo local se vean atraídas a esa zona concreta. Las MNPs llegarían al tumor específicamente logrando concentraciones elevadas en la neoplasia, lo que permite reducir la dosis total administrada, consiguiendo menos efectos adversos sobre tejidos sanos (Figura 1).

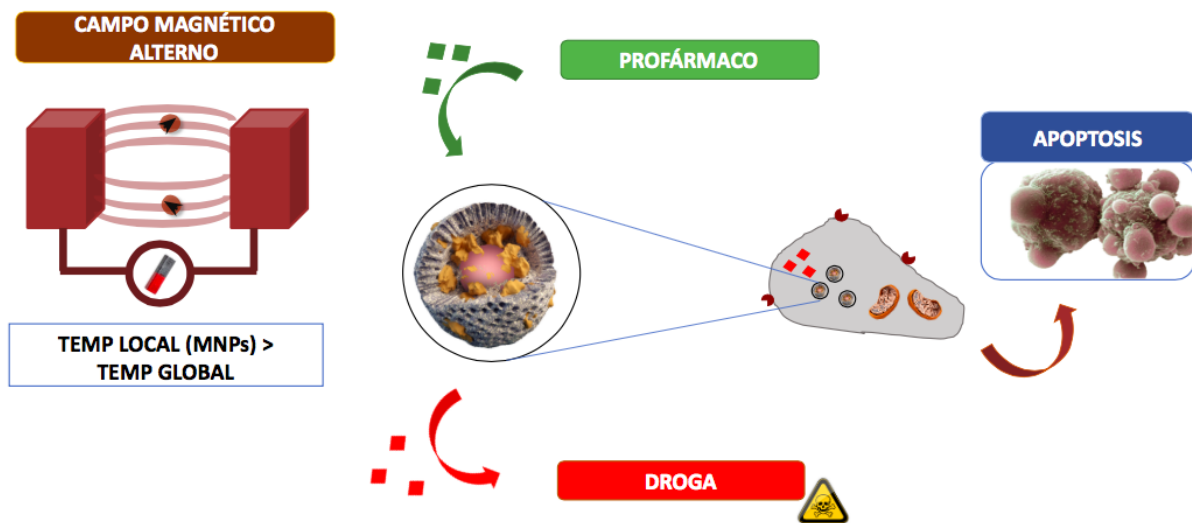


Figura 1. Representación esquemática del mecanismo por el cual se induce la apoptosis de las células cancerígenas con MH en DEPT.

Para llevar a cabo esta aplicación es necesario tener en cuenta varios factores clave. En primer lugar, la naturaleza química del fármaco, ya que condiciona la forma de unirlo a la MNP. Existen varias estrategias. Por ejemplo, se pueden embeber en el polímero que recubre la nanopartícula, en cuyo caso se liberará en el interior celular por difusión a una velocidad dependiente de la liposolubilidad del fármaco (a mayor hidrofobicidad, menor velocidad por ser más soluble en el polímero) ²⁹. Otra opción es unir de forma covalente el fármaco al polímero. En este caso, el polímero se modifica para que disponga de grupos químicos (aminos, hidroxilos, etc) que reaccionen con grupos funcionales del fármaco. En el medio intracelular la unión fármaco-polímero revierte, y se produce la actividad terapéutica. El fármaco también puede unirse por uniones débiles condicionadas por el pH celular, como enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas. Cuando las MNPs funcionalizadas se internalizan se produce una variación en las condiciones (fundamentalmente de pH) que conlleva a un cambio conformacional del fármaco y/o del polímero, provocando su disociación ²⁸.

Otro aspecto crítico es el tamaño de las nanopartículas. Debido a que la atracción que experimenta una nanopartícula magnética es proporcional al volumen de la misma, será necesario un tamaño mínimo de partícula para poder dirigir las MNPs. Sin embargo, este tamaño no podrá ser muy elevado, ya que se podría producir una embolia debido a la acumulación masiva de NPs en pequeños vasos, además de que serían rápidamente captadas por el sistema reticuloendotelial (RES).

Por último, se debe considerar la fuerza del campo magnético aplicado y la zona corporal a la que se quiere dirigir. Es necesario un campo magnético muy potente para dirigir las MNPs a una zona concreta ya que hay que vencer la fuerza del flujo sanguíneo. Además, únicamente se podrán alcanzar zonas superficiales del cuerpo, ya que los tejidos atenúan el campo aplicado ⁸.

1.2 ENZIMAS

Las enzimas son proteínas que aceleran la velocidad de las reacciones químicas que ocurren en una célula. Por esto se las conoce como “catalizadores biológicos”. Las mismas ayudan en procesos esenciales tales como la digestión de los alimentos, el metabolismo, la coagulación de la sangre y la contracción muscular. El modo de acción es específico ya que cada tipo de enzima actúa sobre un tipo particular de reacción y sobre un sustrato específico. Las enzimas poseen diversas aplicaciones en diversas áreas, por ejemplo, farmacéutica, cosmética, alimenticia, biomédica, entre otras ³⁰.

Las mismas se emplean como reactivos estándar en los laboratorios para el diagnóstico de enfermedades, para el control y el seguimiento de enfermedades y de la respuesta del paciente hacia la terapia, y para la identificación y control de la concentración de drogas o sus metabolitos en la sangre u otros fluidos corporales. A diferencia de otros usos industriales para las enzimas, las aplicaciones médicas y farmacéuticas de las mismas requieren pequeñas

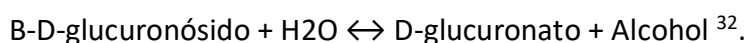
cantidades de enzimas muy puras. Esto se debe a que si el destino de una enzima o de un producto obtenido por métodos enzimáticos es para administrarlo a un paciente, el preparado debe contener las menores cantidades posibles de material extraño para evitar posibles efectos secundarios ³⁰.

Las enzimas presentan grandes ventajas sobre los catalizadores no biológicos, entre ellas gran actividad catalítica, a temperatura ambiente y presión atmosférica, y gran especificidad de sustrato. Sin embargo, son inestables y presentan la dificultad de poder separarse de sustratos y productos. Por lo tanto, se ideó el método de inmovilizarlas a un soporte inerte para ser utilizadas en diferentes estrategias, entre ellas, en terapia enzimática directa ³¹.

1.2.1 β-glucuronidasa

Las β-glucuronidasas (GUS) son miembros de la familia de glucosidasas de enzimas que catalizan la descomposición de carbohidratos complejos. La glucuronidación (conjugación con ácido glucurónico) por la familia de enzimas UDP-glucuronosiltransferasa (UGT) juega un papel importante en el destino metabólico de muchas drogas y otros xenobióticos. Esta reacción de biosíntesis también tiene un papel en la conjugación y excreción de sustratos endógenos, como esteroides, bilirrubina, y ácidos biliares. La actividad de UGT resulta en la conjugación de ácido glucurónico a sustratos que contienen sulfhidrilo, grupos hidroxilo, amino aromático o ácido carboxílico. Los glucurónidos formados son más polares (solubles en agua) que el sustrato orgánico principal, y en general excretado a través del riñón ³².

La β-glucuronidasa cataliza la siguiente reacción:



Además, las enzimas GUS se usan de forma rutinaria para hidrolizar conjugados glucurónidos de metabolitos de fármacos con el fin de optimizar la preparación de la muestra antes del

análisis de cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas (LC-MS), cromatografía de gases (GC) y ELISA.

Se ha reportado la presencia de una actividad elevada de β -glucuronidasa en los tumores en comparación con los tejidos normales ³³. Esta observación fue confirmada posteriormente por varios grupos de investigación que detectaron altas concentraciones de esta enzima en una amplia gama de tumores malignos, incluidos carcinomas de mama, pulmón, ovario y tracto gastrointestinal, así como melanomas. En los tumores, la β -glucuronidasa es secretada extracelularmente en áreas necróticas por las células inflamatorias (monocitos/granulocitos), mientras que en los tejidos sanos su actividad se limita a los lisosomas ³⁴.

Más adelante se propuso apuntar a esta especificidad enzimática del microambiente tumoral por medio de profármacos sensibles a la glucuronidasa en el curso de una monoterapia profármaco. Desde entonces, se han investigado numerosos profármacos con el objetivo de administrar fármacos anticancerosos potentes selectivamente en las proximidades de células malignas ³⁵.

Particularmente la β -glucuronidasa de las lapas (*Patella vulgata*) ha demostrado ser una enzima superior para la hidrólisis de fármacos-glucurónidos de orina ³². Por lo tanto, este estudio se enfoca en la β -glucuronidasa de *P. vulgata*, la cual tiene una temperatura óptima de 60–70 °C y un pH óptimo entre 4,5 y 5,0 ³⁶.

1.2.2 Actividad enzimática

Debido a las diversas aplicaciones que se puede tener con las enzimas, se demuestra la importancia de desarrollar un método simple, sensible, confiable y de alto rendimiento para medir la actividad de GUS. Los métodos basados en la detección óptica de la actividad enzimática, son particularmente atractivos, ya que no requieren una instrumentación costosa

y son fáciles de realizar rutinariamente. Para este propósito, sustratos sintéticos formados por glucurónidos unidos a un cromóforo o fluoróforo se han diseñado para GUS³⁷.

Se puede registrar la formación de color o la fluorescencia debida a la hidrólisis de los sustratos sintéticos. Los sustratos cromogénicos, generalmente son a base de fenol, soluble en agua, estable al calor, específicos y se presentan en una amplia gama de colores diferentes. Aunque se han utilizado algunos sustratos cromogénicos para GUS, el uso de sustratos fluorogénicos es más atractivo ya que las técnicas basadas en la fluorescencia suelen ser 1000 veces más sensibles que las basadas en la absorbancia³⁷.

El sustrato fluorogénico más común es el 4-metil-umbeliferil- β -D-glucurónido (4-MUG) que, tras la hidrólisis, libera el fluoróforo 4-metil umbeliferona agluconosa (4-MU)³⁷.

1.3 INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas repetidamente³⁸. Posteriormente, esta definición se ha ampliado a aquel proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de enzimas por su unión a un soporte³⁹.

El proceso de inmovilización de enzimas presenta diversas ventajas, entre las cuales se puede destacar: disminución de problemas de autólisis o de agregación, aumento de estabilidad de la enzima y posible reutilización del derivado⁴⁰.

Con respecto a los inconvenientes, se presentan los siguientes: generalmente se disminuye la actividad enzimática, en algunos casos se pueden generar contactos proteína-proteína

indeseados, alteración de la conformación de la proteína respecto a su estado nativo, la enzima inmovilizada tiene mayor costo que la enzima nativa, entre otros ⁴¹.

Los métodos de inmovilización se dividen en dos grandes grupos, métodos físicos y químicos.

1.3.1 Métodos de inmovilización de enzimas por retención física

1.3.1.1 Atrapamiento

El atrapamiento consiste en la localización de la enzima en el interior de una matriz sólida porosa de tal forma que previene la liberación de la proteína, mientras que permite la penetración de sustrato. La matriz sólida porosa puede estar formada por polímeros entrecruzables o de poliacrilamida, colágeno, arginato, resinas de poliuretano, entre otros ⁴².

Este método tiene como ventajas, mantener la estructura de la proteína, prevenir el acceso de proteasas. Sin embargo, el tamaño de los poros no puede ser controlado, es difícil de escalar y reutilizar ⁴³.

1.3.2 Métodos de inmovilización de enzimas por unión química

La inmovilización de las enzimas a un soporte por uniones químicas es de los métodos más utilizados, ya que se dispone de mucha información. La unión de la enzima al soporte puede darse por enlaces covalentes, lo que se define como unión covalente, o por otro tipo de enlaces, generándose una adsorción iónica de la enzima al soporte. A continuación se describen estas estrategias.

1.3.2.2 Adsorción

La adsorción es un método de inmovilización en el que la unión de la enzima al soporte se genera por enlaces químicos. Estos enlaces pueden formarse mediante interacciones iónicas o fuerzas débiles tales como fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas. El método consiste en poner unir la enzima al soporte por un tiempo dado, y luego lavar el soporte para eliminar la enzima que no fue adsorbida. Entre las ventajas que se presentan en este tipo de inmovilización, se destacan: su preparación sencilla, bajo costo y no hay cambios de especificidad enzimática. Sin embargo, los inconvenientes de la adsorción son principalmente: optimización de las variables que controlan la adsorción, inestabilidad, unión al soporte débil, por lo tanto, son sensibles a cambios de pH y temperatura ⁴².

1.3.2.3 Unión covalente

La unión covalente de una enzima a un soporte requiere la previa activación química del soporte, de manera que estos interaccionen con los grupos funcionales de la enzima.

Este método presenta las siguientes ventajas: la fuerza de unión es fuerte, la actividad enzimática es alta, y mayor resistencia a cambios de temperatura o de pH por estabilidad a la enzima. Entre las desventajas, se presentan: la preparación no es sencilla, la regeneración del soporte es difícil y el costo es alto ⁴².

Existen diferentes tipos de soportes, que resultan determinantes en el comportamiento posterior del biocatalizador. Los soportes pueden clasificarse en dos grupos según su naturaleza química, materiales inorgánicos u orgánicos:

- Soportes inorgánicos:

Este tipo de soportes, presentan la ventaja de poseer gran resistencia mecánica, térmica y rigidez. Además, evitan la contaminación microbiana ya que no sirven como sustrato para su crecimiento.

Entre los materiales inorgánicos utilizados para inmobilizaciones se encuentran: arcillas, sílica, óxidos de metales, vidrios, cerámicas, etc.

- Soportes orgánicos

Estos tipos de soportes consisten en polímeros naturales o sintéticos. Entre los naturales se encuentran: polisacáridos (celulosa, dextranos, agar-agar, agarosa, alginatos, quitina, chitosan) y proteínas fibrosas (colágeno, queratina). A su vez, los polímeros sintéticos se dividen en: poliolefinas (como el poliestireno), polímeros acrílicos (poliacrilatos, poliacrilamidas, polimetacrilatos.) y otros tipos (alcohol polivinílico, poliamidas, etc).

1.3.3 Efectos de la inmobilización

La inmobilización altera significativamente el comportamiento de las enzimas, provocando diversos efectos tanto en la estabilidad así como en la actividad enzimática. La enzima inmobilizada consiste en un sistema heterogéneo en el cual todos los componentes que intervienen en el proceso catalítico (pH, sustratos, productos, inhibidores, cofactores, entre otros) se encuentran en interfase: en el medio de reacción y en la fase constituida por el soporte con la enzima ⁴².

1.3.4 Efectos en la estabilidad

Por lo general, al inmovilizar una enzima un soporte, se observa un aumento en la estabilidad lo cual puede deberse a diversas razones. En primer lugar, para los métodos en los que intervienen enlaces covalentes, el incremento de estabilidad se relaciona con la presencia de uniones multipuntuales enzima-soporte generando una estabilización conformacional de la enzima. Esto quiere decir que la estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Además, otro efecto que otorga la inmovilización en la estabilidad, es la protección frente a las proteasas presentes en el medio ya que la unión de proteasas a un soporte elimina su capacidad proteolítica, y evita su autólisis. Asimismo, la generación de un catalizador heterogéneo evita la agregación intermolecular al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio ^{44,45}.

En otros casos, el soporte al cual se inmoviliza la enzima brinda un efecto amortiguador, de manera que mantiene el pH óptimo de la enzima en su microentorno. Por otra parte, en aquellas reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas en presencia de disolventes orgánicos, su capacidad para retener agua regula la actividad de la enzima ⁴⁶. Por lo tanto, cuanto mayor es la capacidad para retener agua del soporte, la enzima va a tener la cantidad de agua necesaria en su microentorno para mantener su conformación activa ⁴⁴.

1.3.5 Efectos en la actividad enzimática

Luego de inmovilizar la enzima, ésta puede disminuir su actividad o incluso perderla por completo. En el caso que se pierda totalmente la actividad enzimática, puede ser debido a que la unión al soporte se produce de tal forma que impide la llegada del sustrato al sitio activo de la enzima ⁴². Otra razón puede ser que los grupos reactivos del soporte reaccionen con algún aminoácido que forme parte del sitio activo o que sea esencial para la actividad

catalítica de la enzima. Además, la propia inmovilización puede generar un cambio conformacional en la estructura de la enzima lo cual da lugar a una forma inactiva de la misma. Por último, las condiciones experimentales del ensayo (como por ejemplo el pH, temperatura, etc) pueden provocar la desnaturalización o desactivación de la enzima ⁴².

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Generar una preparación de nanopartículas conteniendo β -glucuronidasa con potencial uso en terapia enzimática directa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Caracterización bioquímica de la enzima

2.2.2 Inmovilización de β -glucuronidasa en nanopartículas de sílica

2.2.3 Inmovilización en superficie de nanopartículas magnéticas

2.2.4 Caracterización biológica y fisicoquímica de los nanoinmovilizados

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

Enzima β -glucuronidasa de limpets *Patella vulgata* (EC 3.2.1.31), 5 mL, 4-Nitrophenyl β -D-glucuronide (pNPG) (EC 233-753-0) 5 mg, 4-metil-umbeliferil- β -d-glucurónido (4-MUG) (MDL MFCD09039280) 100 mg, polietilenimina (PEI) P.M. 1300, y poli-lisina P.M. 70000-150000, N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y N-Hydroxysuccinimide 98% (NHS) (Sigma-Aldrich), ácido biconcínico (BCA), columna PD-10 (Sephadex G 25) de GE, tetrametil ortosilicato (TMOS) y fosfato de sodio dibásico (NaP), ácido 2-etanosulfónico (MES) (Merck), fluidMAG-PAA de 200 nm y fluidMAG-Amine de 100 nm (Chemicell), . Todos los reactivos generales utilizados fueron de grado analítico.

3.2 ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La actividad enzimática se evalúa con dos sustratos diferentes. En primer lugar, se estudia el sustrato 4-Nitrophenyl β -D-glucuronide (PNPG), éste es un sustrato cromogénico utilizado para la detección del gen de la β -glucuronidasa. Su peso molecular es 315,23 g/mol. El pNPG se escinde por GUS dando como resultado la producción de p-nitrofenol que tiene una absorbancia de 405 nm generando un producto de reacción color amarillo (Figura 2).

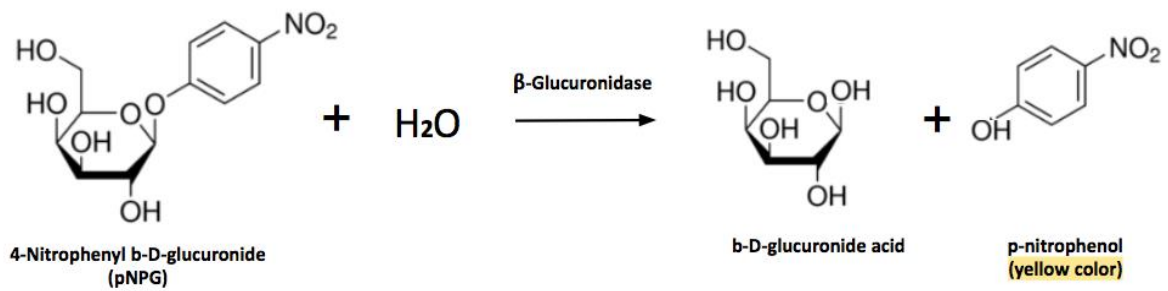


Figura 2. Ensayos de actividad de β-glucuronidasa (GUS). Reacción en la que GUS cataliza la escisión del grupo glucurónico de este sustrato liberando p-nitrofenol que absorbe a 405 nm.

Para llevar a cabo este ensayo de actividad, se realiza una mezcla reactiva compuesta por 150 μL de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,0, 40 μL de muestra y 10 μL PNPG. Este análisis se realiza en placa de 96 pocillos en el lector de placas Infinite® 200 PRO (Tecan, Suiza) a 37°C con agitación. Mediante el software Magellan 7.2 data analysis se obtiene la pendiente de la curva, correspondiente a la velocidad de reacción, lo cual se utiliza para calcular las unidades de actividad enzimática.

Se define la unidad de actividad enzimática (UI) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto en las condiciones definidas del ensayo. Por lo tanto, la actividad enzimática por mL de muestra se define como UI/mL. A continuación se presentan las ecuaciones utilizadas:

$$UI/mL = \frac{\text{pendiente}}{\epsilon \cdot l} \cdot \frac{V_{\text{ensayo}}}{V_{\text{enzima}}} \cdot \text{Factor de dilución}$$

ε es el coeficiente de extinción del pNPG a 405 nm, l es el paso óptico (0,22 cm), V_{ensayo} es el volumen total de reacción y V_{enzima} es el volumen de enzima utilizado para la reacción.

A su vez, se estudia la actividad enzimática con el sustrato 4-metil-umbeliferil-β-d-glucurónico (4-MUG). Su peso molecular es de 352,29 g/mol. El mismo es un sustrato que no emite fluorescencia hasta que es escindido por la enzima para generar el fluoróforo 4-

metilumbeliferona (4-MU). El producto de la reacción genera fluorescencia (Figura 3)³⁷. Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas para realizar las medidas de actividad son, 321 y 447, respectivamente.

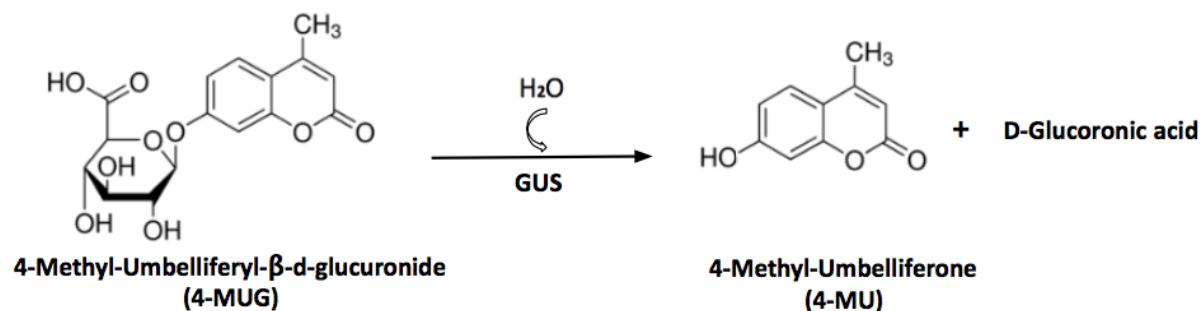


Figura 3. Reacción en la que GUS genera la liberación de 4-MU, el cual es un producto fluorescente.

En cuanto a la medida de actividad para el sustrato fluorescente, se mezclan 225 µL de buffer MES 10 mM pH 5,5, 20 µL de muestra y 5 µL de 4-MUG. El ensayo se realiza en placa de fluorescencia de 96 pocillos en el lector de placas (TECAN) a 37°C con agitación. Mediante el software Magellan 7.2 data analysis se obtiene la pendiente de la curva, correspondiente a las unidades relativas de fluorescencia por minuto (RFU/min), lo cual se utiliza para calcular las unidades de actividad enzimática. Primeramente, se realiza una curva de calibración del fluoróforo 4-MU, unidades de fluorescencia relativa (RFU) en función de la concentración (mM). La pendiente obtenida en la curva de calibración se utiliza para calcular la velocidad de reacción. La velocidad de reacción se obtiene en mM/min, por lo tanto, se hacen los cálculos correspondientes para obtener las unidades de actividad enzimática por mililitro (UI/mL).

Se define UI/mL como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 µmol de sustrato por minuto por mililitro de enzima en las condiciones definidas del ensayo.

3.3 CUANTIFICACIÓN PROTEICA POR ENSAYO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA)

La determinación de proteínas es una de las operaciones más comunes realizadas en la investigación bioquímica. El principio del ensayo del ácido bicinconínico (BCA) es similar al procedimiento de Lowry, ya que ambos dependen de la formación de un complejo de proteína Cu^{2+} en condiciones alcalinas, seguido de la reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} . La cantidad de reducción es proporcional a la proteína presente. Se ha demostrado que la cisteína, la cistina, el triptófano, la tirosina y el enlace peptídico pueden reducir Cu^{2+} a Cu^{1+} . BCA forma un complejo púrpura-azul con Cu^{1+} en entornos alcalinos, proporcionando así una base para controlar la reducción de Cu^{2+} alcalino por proteínas a una absorbancia máxima de 562 nm. El ensayo de BCA es más sensible y aplicable que los procedimientos de Biuret o Lowry. Además, tiene menos variabilidad que el ensayo de Bradford. Por lo tanto, tiene muchas ventajas sobre otras técnicas de determinación de proteínas: el complejo de color es estable, hay menos susceptibilidad a los detergentes, es aplicable en una amplia gama de concentraciones de proteínas, entre otras ⁴⁷.

Para llevar a cabo el ensayo de cuantificación proteica por BCA se utilizan dos reactivos (reactivos de trabajo):

- Reactivo A, el cual es una solución ácido bicinconínico con carbonato de sodio, tartrato de sodio, y bicarbonato de sodio en NaOH 0.1 M.
- Reactivo B, una solución que contiene pentahidrato de sulfato de cobre (II) al 4% (p/v). El estándar de proteína usado fue Albúmina de Suero Bovino (BSA). La solución consiste de 1,0 mg/ml de BSA en NaCl 0,15 M con 0,05% de azida sódica como conservante.

El reactivo de trabajo BCA se realiza mezclando 50 partes de Reactivo A con 1 parte de Reactivo B. Para el ensayo de placa de 96 pocillos, como lo es en este caso, ocho partes del reactivo de trabajo BCA se mezclan con 1 parte de una muestra de proteína. La muestra es un estándar de proteína BSA. El blanco consiste en buffer sin proteína. El estándar de proteína BSA consiste en una concentración conocida de albúmina de suero bovino, y la muestra

desconocida es la solución a analizar, en este caso, diferentes diluciones de β -glucuronidasa. Los ensayos de BCA se realizan a 37°C. El desarrollo del color comienza inmediatamente y puede acelerarse mediante la incubación a temperaturas más altas. Se pueden usar temperaturas más altas y/o tiempos de incubación más largos para aumentar la sensibilidad. La absorbancia a 562 nm se registra y la concentración de proteína se determina por comparación con una curva estándar ⁴⁸.

3.4 GEL FILTRACIÓN DE LA ENZIMA

Se realiza una cromatografía de exclusión molecular o gel filtración para eliminar cualquier preservante que contenga la enzima comercial. Para ello, se utiliza una columna PD-10 (Sephadex G 25). En primer lugar, se equilibra la columna con 10 mL de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,0. Luego se adiciona 1 mL de la muestra (GUS) y se deja correr. Se añade 1,5 mL de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,0. Se vuelve a añadir 2 mL de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,0 y se colecta este volumen, el cual va a contener la elución filtrada de la enzima. Por último, se lava la columna con 30 mL de agua destilada para almacenarla y volver a utilizarla posteriormente.

3.5 PERFIL CROMATOGRÁFICO - FPLC

Para determinar el peso molecular de la enzima se realiza una cromatografía de exclusión molecular en un sistema de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC).

El equipo utilizado es el AKTA avant. La muestra inyectada (enzima stock) fue de 59,7 mg/mL. Dicha muestra se filtra previamente por filtro 0,22 para remover los precipitados de la misma y no generar inconvenientes en la columna. Se utiliza la columna HiLoad® 16/600 Superdex® 200 pg 120 mL y el flujo de trabajo de 1 mL/min.

3.6 ESTUDIO DE pH Y TEMPERATURA ÓPTIMA

Para determinar el pH óptimo de la enzima, se determina un rango de pH para medir la actividad enzimática de entre 3,0 a 10,0 mediante el uso de buffer acetato de sodio 25 mM a pH 3,0, 3,5, 4,0 y 5,0, fosfato de sodio 25 mM a pH 6,0, 7,0 y 8,0 y bicarbonato de sodio 25 mM a pH 9,0 y 10,0.

A su vez, para evaluar la temperatura óptima de GUS, se mide la actividad enzimática a diferentes temperaturas, en el rango de 30 a 80°C.

3.7 ESTUDIO DE ESTABILIDAD EN pH Y EN TEMPERATURA

En cuanto al estudio de estabilidad de pH, se realizan diluciones de la enzima stock en diferentes buffers a distintos pH (acetato de sodio 25 mM a pH 3,0, 4,0 y 5,0, fosfato de sodio 25 mM a pH 7,0 y 8,0 y bicarbonato de sodio 25 mM a pH 10,0). En primer lugar se mide la actividad enzimática inicial y luego se incuban dichas muestras por 60 minutos y se compara la actividad de GUS una vez transcurrido dicho tiempo.

Para el ensayo de estabilidad térmica se incubó la enzima soluble (0,49 mg/mL) en buffer NaP 25 mM pH 7,0 a determinada temperatura y se toman medidas de actividad a diferentes tiempos de incubación. Dicho ensayo se realizó a 4, 25, 37, 45, 60 y 70 °C. La medida de actividad en el tiempo inicial se toma como el 100% de la actividad enzimática y a partir de este valor, se calcula el porcentaje de actividad remanente para cada tiempo.

3.8 INMOVILIZACIÓN DE β -GLUCURONIDASA EN NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA BIOMIMÉTICA

La síntesis de sílica biomimética utiliza tetrametil ortosilicato hidrolizado (TMOS) como fuente de ácido silícico, y polietilenimina (PEI) el cual es un catalizador aminado que actúa como sustituto de las proteínas de los microorganismos marinos para la biosilificación ⁴⁹.

3.8.1 Síntesis de nanopartículas de sílica biomimética

En primer lugar se realiza la síntesis de nanopartículas de sílica vacías para comprobar que la estrategia de precipitación funciona correctamente.

El ácido silícico se prepara hidrolizando 154 μ L de TMOS 1M en 1 mL de ácido clorhídrico 1 mM. En la reacción de precipitación mezclan 200 μ L de buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8,0, 50 μ L de polietilenimina (PEI) 10% pH 8,0 y 50 μ L de TMOS hidrolizado. Dicha preparación se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos en agitación. Luego se centrifugó a 13500 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 200 μ L de buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8,0. Esta preparación se almacena a 4°C.

3.8.2 Diferentes estrategias para inmovilizar GUS en nanopartículas de sílica biomimética

3.8.2.1 Por atrapamiento

Se procede a realizar la inmovilización de la enzima utilizando diferentes catalizadores aminados. En la reacción de precipitación se mezclan 100 μL de buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8,0, 100 μL de enzima, 50 μL de polietilenimina (PEI) 10% pH 8,0 y 50 μL de TMOS hidrolizado. La preparación resultante de β -glucuronidasa físicamente atrapada en la matriz de sílica se centrifuga a 13500 rpm por 5 minutos, se colecta el sobrenadante y luego se realiza un lavado con buffer fosfato de sodio 10 mM con 154 mM de NaCl pH 7,2 para eliminar las proteínas absorbidas iónicamente sobre la superficie de las nanopartículas en la matriz de sílica. Por último, se resuspende con 300 μL de buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8,0 y se almacena a 4°C durante el experimento.

A su vez, se testea el agregado de trehalosa 300 mM durante la síntesis de nanopartículas de sílica biomimética.

Posteriormente, se realizan cambios en el protocolo de inmovilización. Se realiza una dilución de la enzima stock (0,49 mg/mL) en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8,0. La mezcla de precipitación se realiza con 200 μL de enzima, 50 μL de PEI 10% pH 8,0 y 50 μL de TMOS hidrolizado. Esta mezcla se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. La preparación resultante de β -glucuronidasa atrapada se centrifuga a 13500 rpm por 5 minutos, se colecta el sobrenadante y luego se realiza un lavado con buffer fosfato de sodio 10 mM con 154 mM de NaCl pH 7,2. Por último se resuspende con 200 μL de de buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8,0 y se almacena a 4°C durante el experimento.

Posteriormente, se calcula el porcentaje de inmovilización (%I) y el porcentaje de rendimiento (%R). Se define el porcentaje de inmovilización como la cantidad porcentual de enzima que efectivamente fue inmovilizada; y el porcentaje de rendimiento como la actividad residual que se retiene en la enzima al ser inmovilizada.

$$\% I = \frac{(\text{Enzima ofrecida} - \text{Enzima en sobrenadante}) * 100}{\text{Enzima ofrecida}}$$

$$\% R = \frac{(\text{Actividad suspensión}) * 100}{\text{Actividad enzima ofrecida} - \text{Actividad enzima en sobrenadante}}$$

A su vez, se realiza la síntesis de nanopartículas de sílica a partir de otro catalizador aminado: poli-lisina.

Se añaden 80 µl de buffer fosfato de sodio 10 mM pH 8,0 y 40 µL de β-glucuronidasa gel filtrada y se vortexea. Seguidamente, se añaden 100 µL del catalizador aminado, en este caso la poli-lisina. Luego se agrega a la preparación 12,5 µL de TMOS previamente hidrolizado y se incuba la preparación 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavan 3 veces las muestras mediante centrifugaciones a 13500 rpm por 5 minutos, se descarta el sobrenadante y se resuspende con 200 µL de buffer fosfato de sodio 10 mM pH 8,0.

3.8.2.2 Por adsorción a superficie

Para realizar esta estrategia de inmovilización, se parte de nanopartículas de sílica vacías preformadas (como se describe en el apartado 3.5.1) y sonicadas previamente. A su vez, se realiza una dilución de la enzima (0,49 mg/mL) en buffer fosfato de sodio 25 mM pH 7,0. Se toman 300 µL de NPs preformadas a las cuales se las centrifuga por 5 minutos a máxima

velocidad y se descarta el sobrenadante. Al pellet, se le agrega 1 mL de la dilución de enzima y se incuba dicha suspensión a temperatura ambiente con agitación a lo largo del tiempo. Se toman alícuotas a diferentes tiempos: 0, 10, 20, 30, 60, 90 minutos.

Para medir la actividad enzimática de dichas muestras, se toman 40 μ L para medir la suspensión y 60 μ L para medir la actividad en el sobrenadante (a estos 60 μ L se los centrifuga 5 minutos a máxima velocidad y se toman 40 μ L para medir el sobrenadante obtenido).

3.9 INMOVILIZACIÓN DE β -GLUCURONIDASA EN NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Para llevar a cabo la inmovilización de GUS en las nanopartículas de magnetitas comerciales (Chemicell), se realiza una primera etapa de lavado de las nanopartículas para eliminar restos de detergente que viene en la solución comercial. En primer lugar, se lavan 100 μ L de nanopartículas carboxiladas fluidMAG-PAA 3 veces, con 125 μ L de MES 10 mM (pH 5,5).

Luego, para la inmovilización covalente se requiere una etapa de activación. Se resuspenden las nanopartículas en 125 μ L de solución EDC (5 mg) y NHS (7,5 mg) en MES 10 mM (pH 5,5) durante 30 minutos a 37 °C en agitación. EDC (PM = 171,91 g/mol), NHS (PM = 115,09 g/mol). Seguidamente, se lava dos veces con buffer MES 10 mM (pH 5,5) 5 min. Posteriormente, se procede a realizar la etapa de unión de la enzima. Se incuban las nanopartículas con 250 μ L de la enzima (0,49 mg/mL) en MES 10 mM pH 5,5 durante 60 minutos a 37 °C en agitación. Luego, se realiza un lavado con MES durante 5 minutos.

Para el caso de la unión covalente, se requiere un paso adicional. Para eliminar la enzima que no se haya unido covalentemente, pero que queda absorbida iónicamente se incuban la suspensión de nanopartículas con enzima en 250 μ L de MES 10 mM pH 5,5 con 300 mM de

NaCl durante 15 minutos a 37 °C en agitación. Por último, se realiza un lavado con MES, y se guarda el sobrenadante y la suspensión a 4 °C para analizarlos posteriormente.

Cabe destacar que este procedimiento se realizó tanto para las nanopartículas carboxiladas fluidMAG-PAA de 200 nm, así como para las nanopartículas aminadas fluidMAG-Amine de 100 nm.

3.10 ATRAPAMIENTO DEL CONJUGADO β -GLUCURONIDASA-MNPs EN SÍLICA BIOMIMÉTICA

Una vez obtenido el conjugado β -glucuronidasa-MNPs, se realiza el atrapamiento del mismo en sílica biomimética.

Se toma como aplicado la preparación de β -glucuronidasa-MNPs en MES 10 mM pH 5,5. Se toma una parte de 200 μ L del conjugado al cual se le cambia el buffer MES por fosfato de sodio 0,1 M pH 8,0. Luego se agregan 50 μ L de polietilenimina (PEI) 10% pH 8,0 y 50 μ L de TMOS hidrolizado. Se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos. La preparación resultante se pega al imán de la gradilla magnética, se colecta el sobrenadante y luego se realiza un lavado con buffer fosfato de sodio 10 mM con 154 mM de NaCl pH 7,2 para eliminar las proteínas adsorbidas iónicamente sobre la superficie de la matriz de sílica.

Por último se resuspende con 300 μ L de buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8,0 y se almacena a 4°C durante el experimento.

3.11 ESTABILIDAD TÉRMICA DE LA ENZIMA INMOVILIZADA

Se realizaron medidas de actividad a diferentes tiempos de incubación para medir la estabilidad térmica de la enzima inmovilizada frente a la enzima soluble y poder comparar. Ambas muestras se sometieron a las diferentes temperaturas en un termobloque para llevar a cabo el ensayo. Para realizar este experimento, en las dos muestras (enzima inmovilizada y soluble) se parte de la misma concentración de enzima ya que ésta influye sobre la estabilidad. A partir de los datos obtenidos, se determinó el porcentaje de actividad remanente para cada muestra, se graficó (% Actividad residual en función del tiempo) en el programa Excel con los desvíos estándar correspondientes y se compararon los resultados.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se buscó llevar a cabo la inmovilización de la enzima GUS para ser potencialmente utilizada en terapia enzimática directa. Al tener muy pocos reportes de las características bioquímicas de esta enzima, se llevó a cabo en primer lugar la caracterización parcial de la misma. A su vez, como nunca se había trabajado con dicha enzima en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT se debieron optimizar todas las condiciones de medida para determinar la actividad enzimática.

Se estudiaron los parámetros óptimos y estables de la enzima, el efecto que otorga la inmovilización de la enzima en la estabilidad y la caracterización los nanoinmovilizados obtenidos.

4.1 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE GUS

4.1.1 Ensayo de actividad enzimática evaluando diferentes sustratos

Se buscó desarrollar un método simple, sensible y confiable para medir la actividad de GUS, debido a que es clave para poder caracterizar la misma. Se evaluaron dos sustratos, pNPG y 4-MUG, ambos se basan en la detección óptica de la actividad enzimática.

4.1.1.1 Sustrato cromogénico - pNPG

En primer lugar, se buscó poner a punto el ensayo de actividad enzimática para la enzima β -glucuronidasa y el sustrato pNPG. Como se describió en el apartado 3.2, el pNPG es un sustrato cromogénico utilizado para la detección de la enzima GUS. El pNPG se escinde por

GUS dando como resultado la producción de p-nitrofenol que tiene una absorbancia de 405 nm generando un producto de reacción color amarillo.

Se testaron diferentes diluciones de la enzima desconociendo de partida la concentración proteica, para poder determinar cuál relación era la indicada (Tabla 1). De este modo, se realizaron medidas de actividad enzimática por triplicado de diferentes diluciones evaluadas (1/10, 1/50, 1/100) de la enzima soluble. La medida se realiza por 10 minutos (cada 30 segundos), a 24°C en lector de placa multipocillo.

Tabla 1. Diferentes diluciones evaluadas de β -glucuronidasa para medir actividad enzimática con pNPG.

| Diluciones de enzima | UI/mL |
|----------------------|------------------------|
| GUS 1/10 | 4,57E-05 \pm 0,00002 |
| GUS 1/50 | 1,97E-05 \pm 0,00001 |
| GUS 1/100 | 7,87E-06 \pm 0,00001 |

Analizando los valores obtenidos, se determinó continuar trabajando con la dilución 1/10 ya que con las demás condiciones estudiadas se obtuvieron valores más bajos como se observa en la Tabla 1.

A su vez, se midió la actividad enzimática a diferentes temperaturas para determinar si ésta influye en la misma. Las medidas fueron realizadas por 10 minutos a 24°C, 37°C y 42°C.

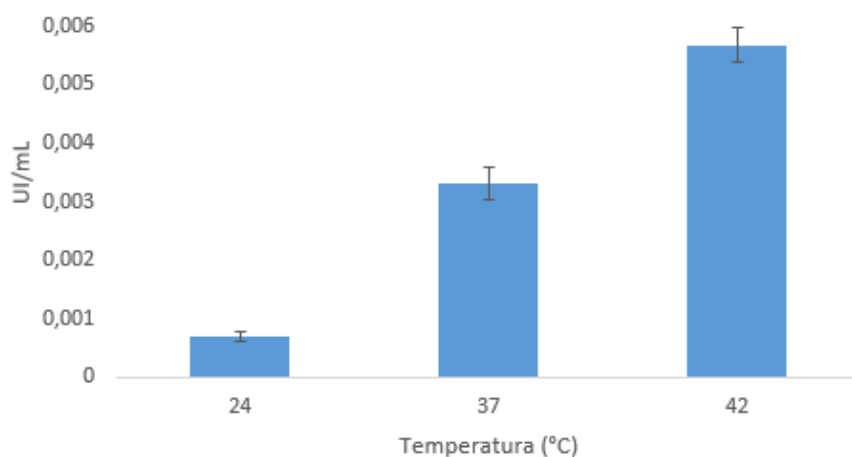


Figura 4. Medida de actividad de β -glucuronidasa a diferentes temperaturas.

En la Figura 4, se observa un aumento significativo en la actividad enzimática al aumentar la temperatura. A pesar de que a 42 °C la enzima presenta mayor actividad, se optó por continuar midiendo a 37°C ya que es la temperatura corporal del ser humano y ésta investigación tiene como objetivo final su aplicación en el área de la biomedicina humana.

Luego, se optimizaron diferentes ensayos para medir la actividad de GUS, variando las cantidades de buffer, sustrato y enzima para determinar cuál era la mejor condición (Tabla 2).

Tabla 2. Diferentes condiciones evaluadas para medir actividad de β -glucuronidasa.

| | [pNPG] mM | [GUS*] mg/mL | UI/mL |
|----------|--------------|-----------------|---------------------|
| Ensayo 1 | 1,6 | 0,199 | 4,50E-03 \pm 0,28 |
| Ensayo 2 | 3,2 | 0,199 | 2,70E-04 \pm 0 |
| Ensayo 3 | 1,6 | 0,398 | 5,40E-03 \pm 0,14 |
| Ensayo 4 | 1,6 | 0,498 | 2,70E-03 \pm 0,14 |

En cuanto a los resultados obtenidos en la Tabla 2, se observa que en el ensayo 2, al mantener la cantidad de enzima y aumentar la concentración de sustrato (respecto al ensayo 1), la actividad enzimática disminuye, lo que podría deberse a una inhibición de sustrato. En la inhibición por sustrato, a altas concentraciones de sustrato, la actividad enzimática disminuye progresivamente debido a que el sitio de unión de la enzima y sustrato se ocupa, inhibiendo la enzima. Cuando hay poco sustrato, se ocupa el sitio de alta afinidad y sigue la cinética normal ⁵⁰.

En el ensayo 3, se logró obtener la mejor actividad con respecto al resto de los ensayos lo que puede relacionarse con el volumen de enzima utilizado, siendo éste mayor, lo que influye en la actividad final (Figura 5). Con respecto al ensayo 4, posiblemente al aumentar aún más la cantidad de enzima, la actividad se ve afectada ya que la relación enzima-sustrato no es la óptima para medir la actividad en el ensayo.

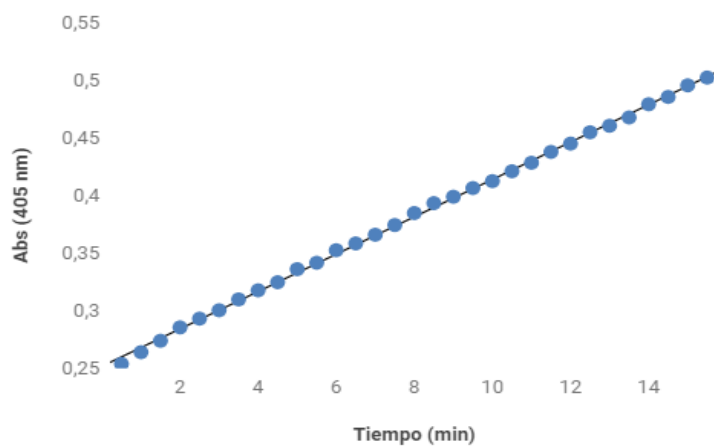
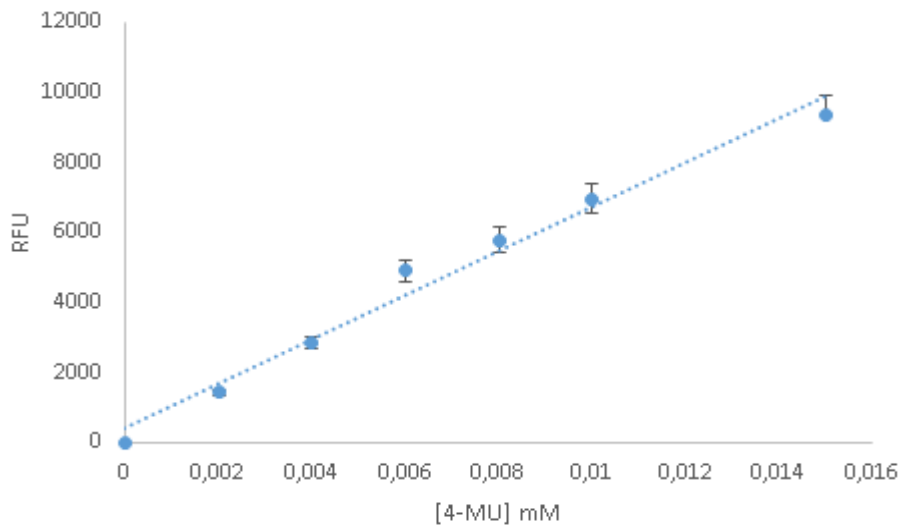


Figura 5. Absorbancia a 405 nm en función del tiempo (min) del ensayo 3 de pNPG.

4.1.1.2 Sustrato fluorescente - 4-MUG

En primer lugar, se realizó una curva de calibración con el fluoróforo 4-MU para poder determinar las unidades enzimáticas por mL. Éste es un componente de la molécula 4-MUG que hace que ésta sea fluorescente. Es un grupo funcional de la molécula que absorberá energía de una longitud de onda específica y la volverá a emitir en otra determinada de mayor longitud de onda. Debido a la diferente configuración electrónica de los fluorocromos cada uno presenta un espectro de excitación y de emisión característico. En este caso, el λ de excitación y emisión fue 321- 447, respectivamente. Debido a que se realizaron medidas de actividad enzimática utilizando dos buffers diferentes, se realizaron dos curvas de calibración, una de ellas utilizando NaP 25 mM pH 8,0, y la otra con MES 10 mM pH 5,5 (Figura 6).

a.



b.

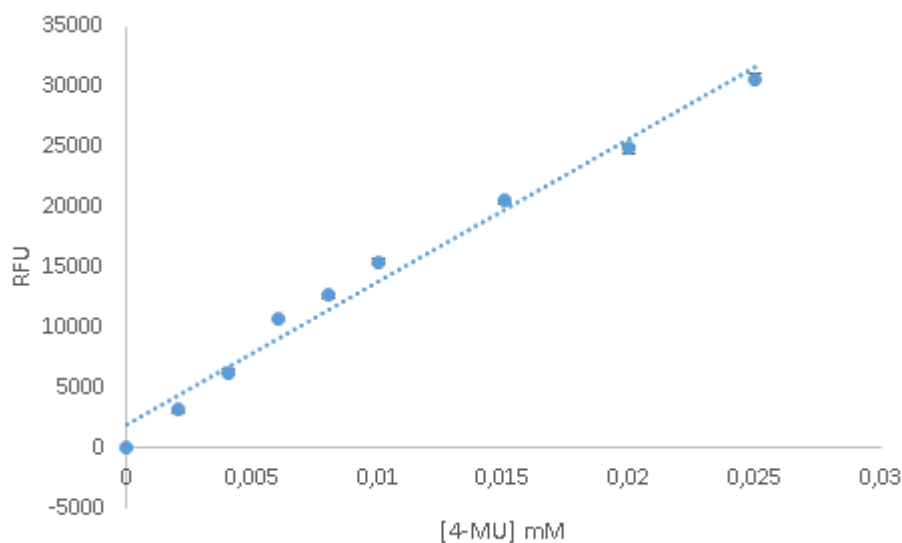


Figura 6.a. Curva de calibración del fluoróforo 4-MU utilizando buffer NaP 25 mM pH 8,0. La ecuación de la recta es: $y = 634115x + 389,49$. **b.** utilizando buffer MES 10 mM pH 5,0. La ecuación de la recta es: $y = 1E+06x + 1886,3$

Luego de obtener la curva de calibración, se hicieron los cálculos para convertir las pendientes obtenidas en RFU/min a UI/mL.

Se estudiaron, además, las condiciones para medir actividad enzimática con 4-MUG. Como fue descrito anteriormente, éste es un sustrato que no emite fluorescencia hasta que es escindido por la enzima para generar el fluoróforo 4-metilumbeliferona (4-MU). El producto de la reacción genera fluorescencia. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Diferentes condiciones evaluadas para medir actividad de β -glucuronidasa a 321/447 nm utilizando buffer fosfato de sodio 25 mM pH 8,0.

| | [4-MUG] mM | [GUS*] mg/mL | UI/mL |
|-----------------|---------------|-----------------|-------------------|
| Ensayo 1 | 0,02 | 0,398 | 0,018 \pm 0 |
| Ensayo 2 | 0,01 | 0,398 | 0,017 \pm 0,71 |
| Ensayo 3 | 0,02 | 0,199 | 0,0037 \pm 0,07 |

(*) Enzima comercial diluida en buffer NaP 25 mM pH 7,0.

Con respecto a los resultados obtenidos en la Tabla 3, se observa que en los ensayos 1 y 2 no se muestra una diferencia significativa a pesar de que en el ensayo 2 se utiliza la mitad de concentración de sustrato. En cuanto al ensayo 3, las UI/mL obtenidas son más bajas, lo que puede adjudicarse al menor volumen de enzima utilizado. Por lo tanto, se optó por realizar las medidas de actividad utilizando las condiciones del ensayo 2 ya que se obtuvieron prácticamente las mismas UI/mL utilizando la menor concentración de sustrato.

También se evaluaron diferentes condiciones para medir actividad enzimática utilizando otro buffer (MES 10 mM pH 5,5). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Diferentes condiciones evaluadas para medir actividad de β -glucuronidasa a 321/447 nm utilizando buffer MES 10 mM pH 5,5.

| | [4-MUG] mM | [GUS *] mg/mL | UI/mL |
|-----------------|-----------------------|--------------------------|------------------|
| Ensayo 1 | 0,02 | 0,398 | 0,03 \pm 0,01 |
| Ensayo 2 | 0,01 | 0,398 | 0,06 \pm 0,01 |
| Ensayo 3 | 0,02 | 0,199 | 0,005 \pm 0,01 |
| Ensayo 4 | 0,01 | 0,199 | 0,025 \pm 0 |

(*) Enzima comercial diluida en buffer MES 10 mM pH 5,5.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos (Tabla 4), al comparar los ensayos 1-2 y 3-4, se pudo determinar que utilizando una mayor concentración de sustrato (0,02 mM) e igual concentración de enzima los valores de UI/mL disminuyeron. A pesar de que el ensayo 2 fue el que presentó el valor más alto de UI/mL, se optó por seguir trabajando bajo las condiciones del ensayo 4 ya que se buscaba utilizar la menor cantidad de enzima y sustrato con valores confiables debido a la escasez de stock de estos reactivos.

4.1.2 Cuantificación proteica por método BCA

Para saber la concentración de proteína que se tenía en las diluciones previamente ensayadas, se realizó una cuantificación proteica por el método BCA. Se realizó una curva estándar a partir de la cual se extrapolan los valores y de este modo se determinó la concentración para cada dilución. Se evaluó la enzima sin gel filtrar y gel filtrada para poder determinar si los preservantes que contienen las enzimas comerciales influyen en la concentración proteica.

Tabla 5. Concentración proteica (mg/mL) de β -glucuronidasa en las diferentes diluciones

| Diluciones de GUS | [Proteínas] mg/mL |
|--------------------------|------------------------------|
| 1/50 sin gel filtrar | 1,99 \pm 0,05 |
| 1/200 gel filtrada | 0,48 \pm 0,01 |

Según los resultados obtenidos en el ensayo de concentración proteica de GUS, se observó que no hay una contribución relevante de los aditivos de la enzima comercial ya que al multiplicar la concentración de proteína obtenida por el factor de dilución correspondiente, los valores no presentaron diferencias significativas (99,5 \pm 2,47 mg/mL sin gel filtrar y 96 \pm 2,83 mg/mL gel filtrada) (Tabla 5). Por lo tanto, se continuó trabajando con la enzima sin gel filtrar. A su vez, se evaluó la actividad enzimática de la enzima sin gel filtrar y gel filtrada para verificar estos resultados (Tabla 6).

Tabla 6. Medidas de actividad de la enzima gel filtrada y sin gel filtrar de GUS.

| Diluciones de GUS | UI/mL |
|--------------------------|---------------------|
| 1/50 sin gel filtrar | 7,70E-05 \pm 0,01 |
| 1/200 gel filtrada | 2,30E-05 \pm 0,21 |

Los valores de actividad obtenidos corroboran que se puede trabajar sin inconvenientes con la enzima pura ya que no se observa un aporte significativo de los preservantes en las medidas de actividad enzimática cuando se comparan las UI/mL de la enzima sin gel filtrar con la gel filtrada.

4.1.3 Perfil cromatográfico - FPLC

Se realizó una cromatografía de exclusión molecular en un sistema de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad con el propósito de determinar el peso molecular de GUS, ya que el mismo no está reportado (Figura 7).

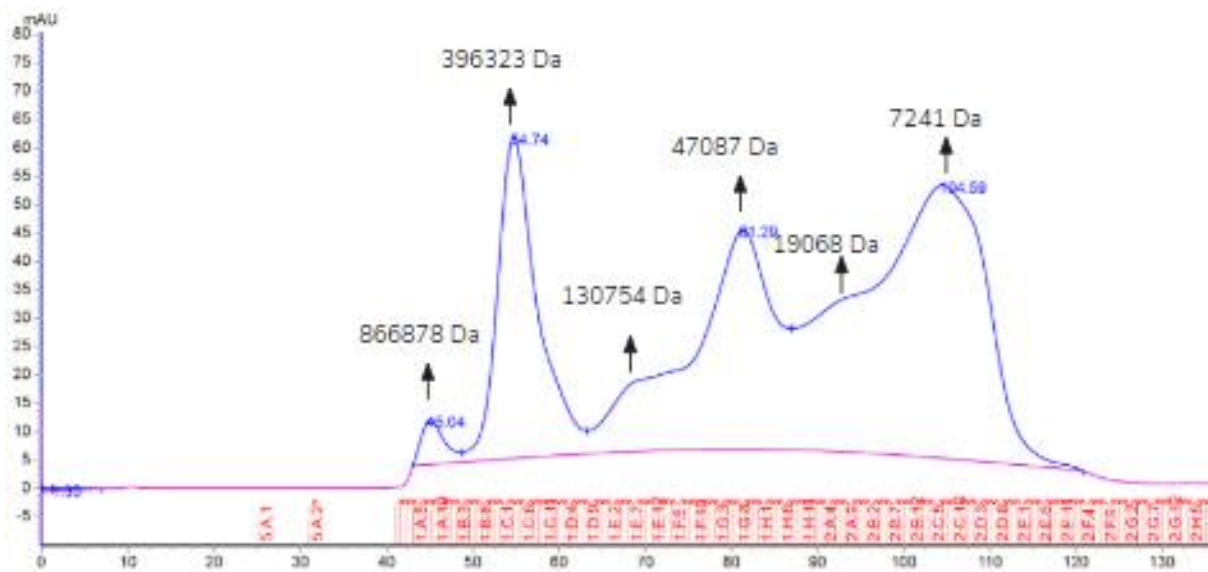


Figura 7. Cromatograma de FPLC de enzima GUS comercial.

En base al cromatograma obtenido, se evaluaron los 6 picos más relevantes, calculando el peso molecular de cada uno a partir de una curva de calibración. A su vez, se midió la actividad enzimática de los mismos y la única fracción que presentó actividad fue la del segundo pico, correspondiente a 396 kDa. Posteriormente, se realizó un análisis por electroforesis desnaturizante en gel de gradiente (Figura 8), se corrieron muestras de los 6 picos obtenidos en el cromatograma, muestra del stock de enzima y el aplicado que se utilizó para inyectar en la FPLC.

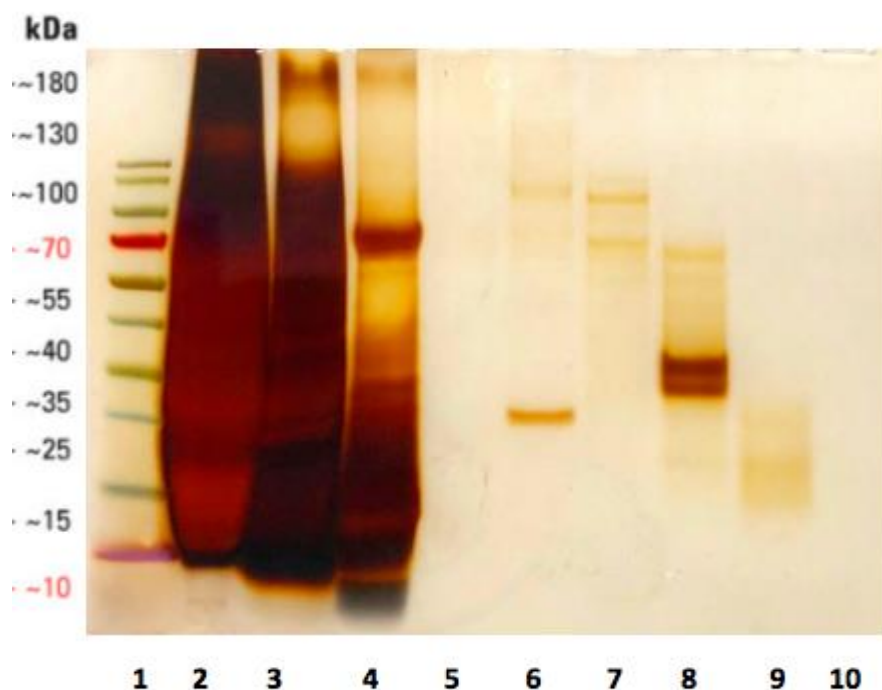


Figura 8. Electroforesis SDS-PAGE en gradiente. **Carril 1:** Marcador de peso molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder 26616, Thermo Scientific™), **Carril 2:** Enzima stock, **Carril 3:** Aplicado, **Carril 4:** Pellet, **Carril 5:** pico 1 (45,04 mL– 866 kDa), **Carril 6:** pico 2(54,78 mL – 396 kDa), **Carril 7:** pico 3 (68,58 mL– 130 kDa), **Carril 8:** pico 4 (81,29 mL– 47 kDa), **Carril 9:** pico 5 (92,54 mL– 19 kDa), **Carril 10:** pico 6 (104,59 mL– 7 kDa)

En cuanto a los resultados obtenidos en la Figura 8, se prestó especial atención al carril 6, ya que el mismo corresponde a la única fracción de la cromatografía que presentó actividad enzimática ($0,02 \pm 0,00034$ UI/mL). Se puede observar en los demás carriles la presencia de diversas proteínas de origen desconocido, las cuales no corresponden a la enzima de interés. Por lo tanto, en el carril 6 se observan dos bandas de diferente peso molecular, una correspondiente a 30 kDa y otra correspondiente a 100 kDa. Ante estos resultados surgieron diversas alternativas con respecto al peso real de GUS, debido a que ambas bandas se podrían corresponder a la enzima formando un complejo heterodimérico o que una de las bandas no

se correspondiera con la proteína de interés. Conforme a esto, se decidió realizar un zimograma para determinar la actividad enzimática de dichas bandas. Desafortunadamente, el ensayo no fue exitoso dado a que no se logró ver ningún indicio de la actividad de GUS. A su vez, se realizó un gel nativo de poliacrilamida, al que luego se le realizó tinción con Azul de Coomassie. En este gel se corrió solamente la fracción de interés con el fin de determinar si las bandas observadas en el carril 6 de la Figura 8 correspondían a la misma proteína.

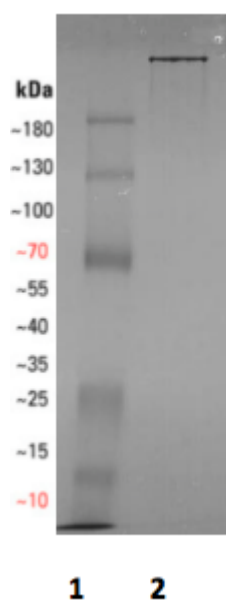


Figura 9. Gel nativo de poliacrilamida. **Carril 1:** Marcador de peso molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder 26616, Thermo Scientific™), **Carril 2:** Fracción correspondiente al pico 2 de la cromatografía.

Con respecto a la Figura 9, en el carril 2 se observa la presencia de una única banda de alto peso molecular pudiéndose relacionar con el pico 2 del cromatograma de la FPLC el cual se corresponde con 396 kDa. Esto no se pudo determinar con certeza ya que el marcador utilizado tiene un rango de 10-180 kDa y la banda está por encima de dicho valor. De todas maneras, se pudo confirmar que las dos bandas observadas previamente en el carril 6 de la Figura 8 corresponden a la enzima de interés.

Se consultó a la base de datos de información molecular y bioquímica sobre enzimas “BRENDA” para averiguar el peso molecular de GUS de otros organismos y se encontró que para la mayoría de las especies la enzima está compuesta por un complejo heterodimérico de alto peso molecular lo que coincide con los resultados obtenidos (Tabla 7). Por lo tanto, este complejo podría consistir en tres cadenas de 100 kDa y 30 kDa.

Tabla 7. Pesos moleculares de β - glucuronidasas de diferentes organismos.

| Peso molecular (kDa) | Organismo | Comentarios | Referencias |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------|
| 85 | <i>Aspergillus niger</i> | X * 85 kDa | 51 |
| 90 | <i>Neurospora crassa</i> | X * 90 kDa | 51 |
| 230 | <i>Scutellaria baicalensis</i> | - | 52 |
| 280 - 300 | <i>Oryctolagus cuniculus</i> | - | 53 |
| 288 | <i>Escherichia coli</i> | 4 * 72 kDa | 54 |

4.1.4 Estudio de parámetros óptimos

A su vez, se procedió a estudiar el pH óptimo, temperatura óptima, estabilidad a diferentes temperaturas y pH de la enzima. Esto nos permitió tener mayor conocimiento del comportamiento de la misma, ya que no se tiene mucha información sobre los parámetros funcionales del organismo con el que se trabajó (*Patella vulgata*).

La caracterización de las enzimas está directamente vinculada a su rol como catalizadores biológicos, por lo tanto, es de suma importancia conocer sobre sus características bioquímicas y fisicoquímicas debido a que cada enzima tiene valores de pH, y temperatura en que su actividad es la óptima debido a que son parámetros que influyen en las acciones enzimáticas.

4.1.4.1 pH óptimo

Las enzimas son muy sensibles a los cambios de pH, la actividad enzimática varía según el pH utilizado para llevar a cabo la reacción. Por esta razón, es de suma importancia determinar cuál es el efecto en la actividad enzimática al variar los valores de pH. Estos resultados se presentan en una curva actividad-pH. Esta gráfica es diferente para cada tipo de enzimas ya que depende del comportamiento ácido-base de la enzima y del sustrato ya que éstos pueden tener grupos funcionales ácidos y básicos, por lo tanto, su grado de disociación va a depender del pH.

Además, los estudios de actividad enzimática a diferentes valores de pH nos permitirán determinar aspectos sobre el mecanismo catalítico de las enzimas. El pH que presente mayor actividad enzimática es el que se define como pH óptimo ⁵⁵.

Para determinar el pH óptimo de GUS, se estudió un rango de pH de 3,0 a 10,0. Posteriormente se realizó una curva de actividad enzimática (UI/mL) en función de los diferentes pH (Figura 10).

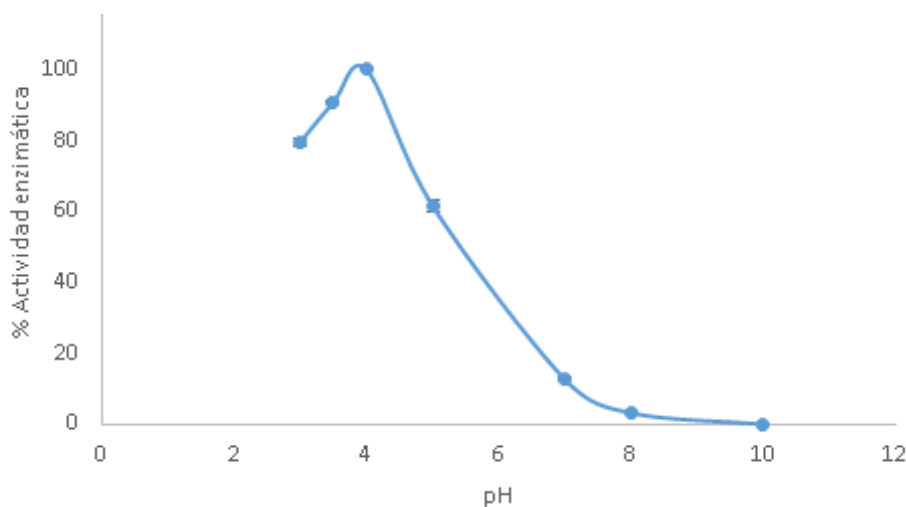


Figura 10. pH óptimo de GUS. % Actividad enzimática en función de los diferentes pH. Se tomó

como 100 % al valor más alto de actividad enzimática.

En la Figura 10 se observa que a valores bajos de pH (3,0 - 3,5), la actividad va aumentando progresivamente hasta alcanzar el pH óptimo, el cual se encuentra en 4,0. Con respecto a los pH por encima de dicho valor se ve una disminución significativa en la actividad, perdiéndola por completo a valores entre 8,0 - 10,0.

Se consultó a la base de datos de información molecular y bioquímica sobre enzimas “BRENDA” para averiguar si había relación con GUS de otros organismos, y se observó que la mayoría presenta valores de pH óptimos entre 4-6 (Tabla 8).

Tabla 8. pH óptimo de β - glucuronidasas de diferentes organismos.

| pH óptimo | Organismo | Referencias |
|------------------|--------------------------------|--------------------|
| 3 - 4 | <i>Aspergillus niger</i> | 56 |
| 4 | Zea mays | 57 |
| 4,5 - 6,5 | <i>Sulfolobus solfataricus</i> | 58 |
| 4 - 4,5 | <i>Homo sapiens</i> | 59 |
| 4,5 | <i>Drosophila melangaster</i> | 60 |

4.1.4.2 Temperatura óptima

La temperatura es un factor que influye en la velocidad de una reacción. Para determinar tal efecto en la actividad enzimática, se realizan estudios a diferentes temperaturas y se construye una curva de actividad enzimática en función de temperatura. Generalmente, la velocidad de una reacción aumenta hasta llegar a un valor máximo denominado temperatura

óptima y a valores superiores la actividad disminuye debido a que la enzima sufre procesos de desnaturalización y por lo tanto, de inactivación ⁵⁵. Debido a la importancia de la temperatura en la actividad de la enzima, realizamos los estudios de temperatura óptima para continuar con la caracterización bioquímica de GUS.

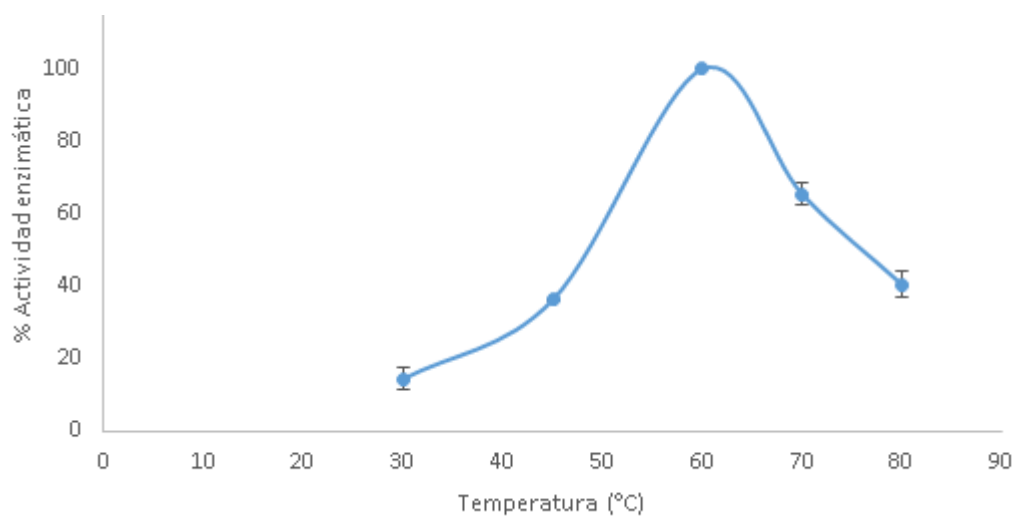


Figura 11. Temperatura óptima de GUS. % Actividad remanente en función de la temperatura (°C). Se tomó como 100 % al valor más alto de actividad enzimática.

A partir de la Figura 11, se determina que la temperatura óptima de GUS se encuentra en 60 °C, ya que es el valor en el cual la enzima presenta mayor actividad. A valores más altos de dicha temperatura, se puede observar que la enzima disminuye su actividad, lo que puede deberse a la desnaturalización de la proteína como consecuencia de su exposición a temperaturas muy elevadas.

4.1.4.3 Estabilidad térmica

En primera instancia, se procedió a realizar el estudio de estabilidad térmica a diversas

temperaturas para poder comparar y determinar si la misma tenía un efecto sobre la actividad de la enzima. Los estudios de estabilidad térmica de GUS se realizaron a 4, 25, 37 y 45 °C.

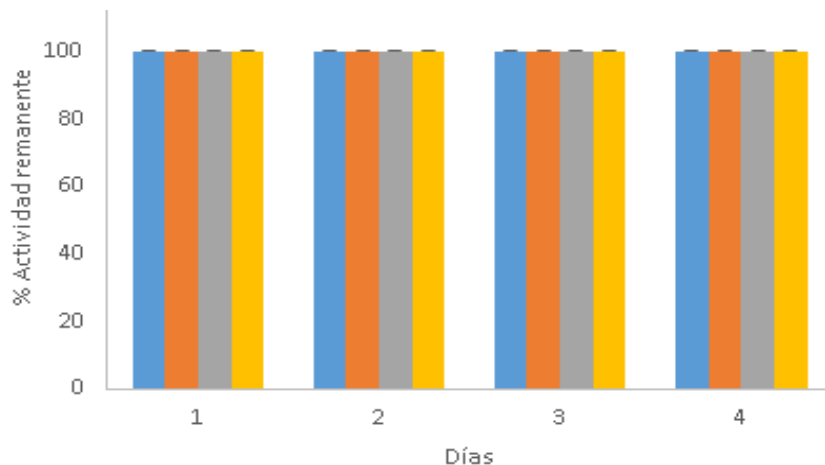


Figura 12. Estabilidad térmica a 4, 25, 37 y 45°C. Porcentaje de actividad remanente a lo largo de 4 días. La barra azul corresponde a 4°C, la naranja a 25°C, la gris a 37°C y la amarilla a 45°C.

La Figura 12 muestra que la actividad remanente de la enzima a lo largo de cuatro días se mantiene en el 100%. Por lo tanto, se puede determinar que en las diferentes temperaturas estudiadas la enzima permanece estable. A su vez, al tener previo conocimiento de que se trata de una enzima termofílica, se decide aumentar significativamente la temperatura para poder determinar la vida media de la enzima, en las condiciones estudiadas. Dichos resultados se presentan a continuación en la Figura 13.

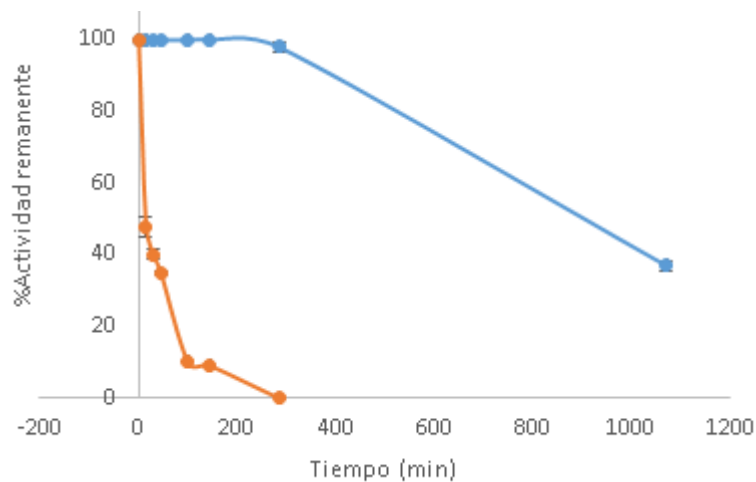


Figura 13. Porcentaje de actividad remanente a lo largo del tiempo (min) a 60 y 75°C. La curva azul corresponde a 60°C y la naranja a 75°C.

En la Figura 13 se observa el porcentaje de actividad remanente en función del tiempo (min). Este ensayo se realizó tanto para 60°C así como para 75°C. Se observa que a 60 °C, a las 25 horas de incubación, la enzima presentó una vida media de 900 minutos (15 horas). La vida media de una enzima se define como el tiempo que tarda la enzima en alcanzar el 50 % de su actividad inicial. En cambio, a 75°C, GUS presentó una vida media de 15 minutos.

4.1.4.4 Estabilidad de la enzima frente a diferentes condiciones de pH

Se estudió la estabilidad de GUS a diferentes pH para determinar si éstos afectan su actividad. Se realizó una gráfica del porcentaje de actividad remanente a los 60 minutos, en función de los diferentes pH (Figura 14).

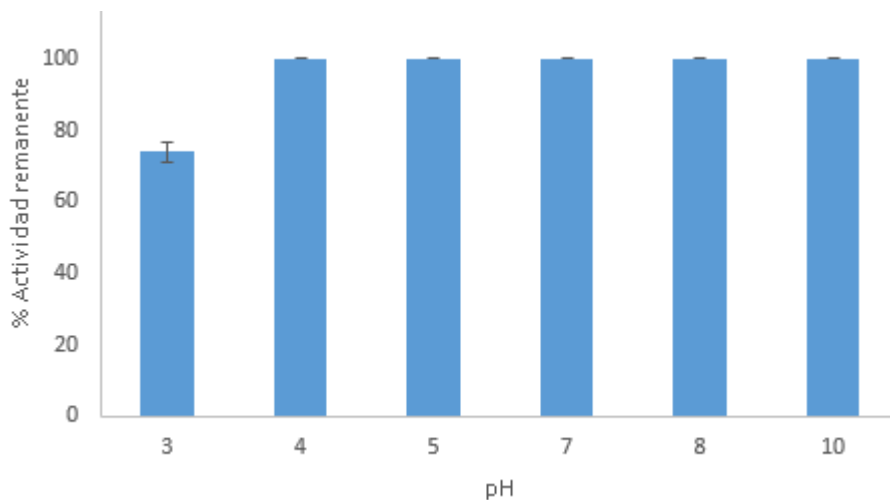


Figura 14. Estabilidad de pH a lo largo de 60 minutos. Porcentaje de actividad remanente a diferentes pH (3,0, 4,0, 5,0, 7,0, 8,0 y 10,0).

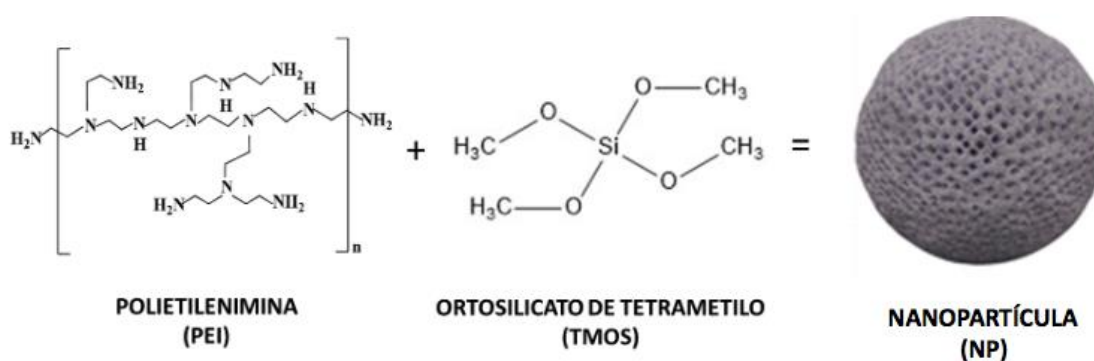
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la Figura 14, se pudo determinar que en el período de estudio (60 minutos), GUS es muy estable a los diferentes pH evaluados ya que en la mayoría de las condiciones conserva el 100% de actividad. Sin embargo, el pH 3,0 fue la excepción debido a que su actividad disminuyó al $74 \pm 2,82$ %.

4.2 INMOVILIZACIÓN DE GUS EN NANOPARTÍCULAS

Las enzimas presentan grandes ventajas sobre los catalizadores no biológicos, entre ellas gran actividad catalítica, a temperatura ambiente y presión atmosférica, y gran especificidad de sustrato. Sin embargo, son inestables y presentan la dificultad de poder separarse de sustratos y productos. Por lo tanto, se ideó el método de inmovilizarlas a un soporte inerte. La inmovilización de enzimas puede permitir una mejora significativa de su estabilidad, lo que hace posible su empleo en la producción industrial de productos químicos, farmacéuticos, alimentos; en el tratamiento de residuos; en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, entre otras aplicaciones ³¹.

4.2.1 Síntesis de nanopartículas en ausencia de enzima

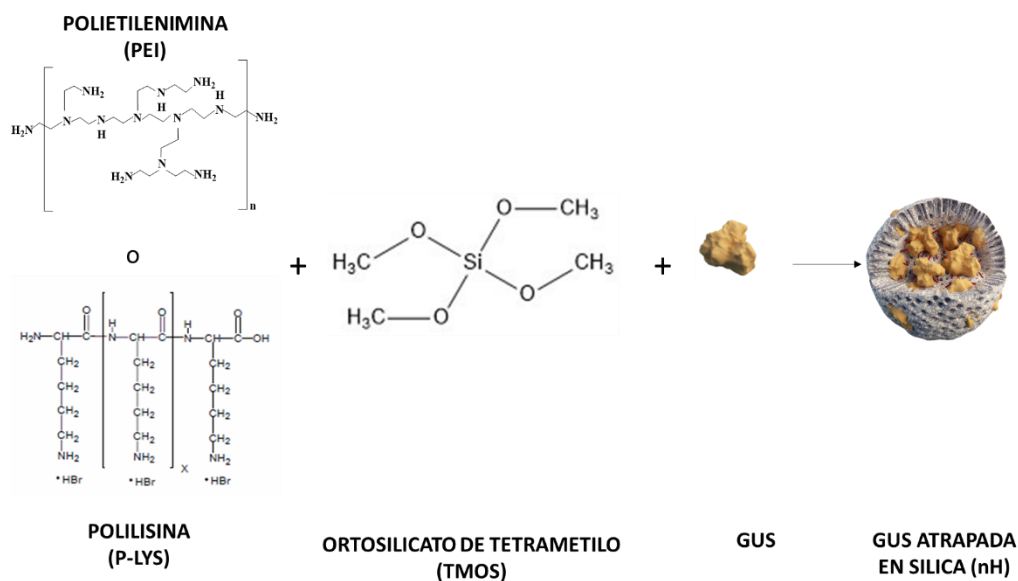
Se realizó la síntesis de nanopartículas de sílica vacías como un control para evaluar la estrategia de precipitación de la sílica. A partir de 300 µL de mezcla reactiva se obtuvo un pellet de 0,0193 g de NPs (Esquema 1).



Esquema 1. Representación de la síntesis de nanopartículas de sílica biomimética vacías.

4.2.2 Atrapamiento en sílica biomimética utilizando diferentes catalizadores aaminados

Teniendo en cuenta las condiciones estudiadas, se procedió a inmovilizar la enzima realizando un atrapamiento en sílica biomimética. En primer lugar, se evaluaron dos fuentes distintas de catalizadores aaminados (PEI (P.M. 1300 Da) y poli-lisina (P.M. 70000 - 150000 Da)) (Esquema 2). En este estudio, se busca evaluar el resultado de la inmovilización, comparando los porcentajes de inmovilización y rendimiento (Tabla 9).



Esquema 2. Representación de la inmovilización de la enzima GUS en nanopartículas de sílica a partir de diferentes catalizadores aminados.

Tabla 9. Porcentajes de inmovilización y rendimiento de β -glucuronidasa inmovilizada en nanopartículas de sílica biomimética utilizando diferentes catalizadores aminados.

| Catalizadores aminados | % I | % R | UI/mL |
|-------------------------|-------------|-----|-------------------|
| PEI sin lavado con NaCl | 82 ± 0,5357 | 100 | 4,10E-03 ± 0,0006 |
| PEI con lavado con NaCl | 32,5 ± 0,92 | 0 | 0 |
| Poli lisina | 100 | 0 | 0 |

En primer lugar, cabe destacar que las pendientes fueron tomadas hasta el minuto 3,5 debido a que luego de este tiempo las mismas disminuyen significativamente. Puede ser que las nanopartículas hayan precipitado dentro del pocillo de la placa, ya que al observar dicha placa

se vio que el fondo estaba completamente cubierto, lo que incluso con agitación antes de cada lectura era difícil de homogeneizar.

Con respecto a la inmovilización con PEI sin lavado con NaCl, se obtuvo un porcentaje de inmovilización de $82 \pm 4\%$ y un rendimiento de $100 \pm 0\%$. Sin embargo, al incorporar un paso de lavado con NaCl, no se obtuvo actividad en el inmovilizado lo que puede deberse a que la enzima se encontrara adsorbida iónicamente en la superficie de las nanopartículas y no atrapada en la matriz de sílica.

Más adelante, se procedió con el atrapamiento de β -glucuronidasa en nanopartículas de sílica biomimética utilizando poli-lisina como catalizador aminado. En la inmovilización con poli lisina se ofrecen $3,75E-03 \pm 0,00007$ UI/mL de enzima y se obtiene un 100 % de inmovilización pero el porcentaje de rendimiento fue 0. Analizando los sobrenadantes, no se observa actividad, lo cual da un indicio de que toda la enzima ofrecida se encuentra atrapada en la matriz. Por ello, estos resultados pueden relacionarse con que la concentración de enzima ofrecida fue muy baja y, por lo tanto, durante el atrapamiento podría haber perdido su actividad o la difusión del sustrato podría estar restringida a la enzima atrapada.

Además, se evaluó el efecto de la trehalosa como estabilizante en la inmovilización. La trehalosa es un disacárido formado de dos moléculas de glucosa donde la unión glucosídica de tipo α involucra los grupos OH de los dos carbonos anoméricos. Se sabe que la trehalosa, un osmolito de origen natural, es un estabilizador excepcional de las proteínas y ayuda a retener la actividad de las enzimas en solución, así como en el estado liofilizado y desnaturalización térmica.

Se observó que dicha molécula no logró aumentar la actividad enzimática en la inmovilización ya que el rendimiento continuó siendo 0.

Más adelante, se realizó otra inmovilización de GUS en nanopartículas de sílica extendiendo el tiempo de medida. En este caso, la medida de actividad fue realizada por un tiempo de 30 minutos. Se observó que en los primeros 10 minutos no había un aumento en la actividad de la enzima, mientras que luego de pasado este tiempo, la actividad aumentaba considerablemente. Esto posiblemente pudo deberse a problemas de reparto de sustrato y producto lo que generaba este retraso en la aparición de producto generado. Por ello, los valores de pendiente se toman a partir de los 10 minutos. Cabe destacar, que se llevó un control sin enzima.

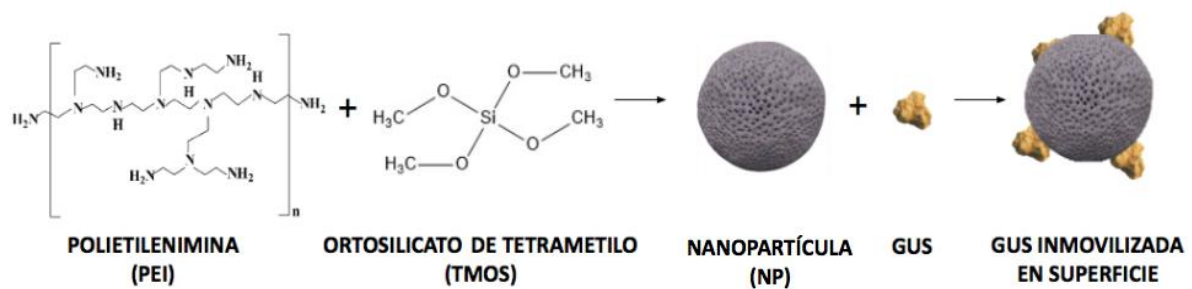
A pesar de haber obtenido unidades enzimáticas más altas luego de los 10 minutos, el ensayo mostró solamente un porcentaje de inmovilización de $28,5 \pm 0,8471$. Cabe destacar que se analizaron los sobrenadantes obtenidos luego de cada paso de la inmovilización y se observó que de $7,25E-03 \pm 0,0002$ UI/mL ofrecidas de enzima, en el primer sobrenadante quedaron $4,65E-03 \pm 0,0002$ UI/mL. Esto da un indicio de que más de la mitad de enzima ofrecida no fue atrapada. A su vez, la poca cantidad de enzima que quedó atrapada en la matriz de sílice, no se encontraba activa, ya que el porcentaje de rendimiento fue 0.

Dicho esto, se buscaron nuevas formas de inmovilizar a la enzima ya que el atrapamiento de GUS en sílica biomimética no fue exitoso. Se procedió a evaluar la inmovilización de la enzima por adsorción en superficie.

4.2.3 Adsorción iónica en nanopartículas de sílica biomimética

Más adelante, al no haber sido posible obtener un inmovilizado activo con nanopartículas de sílica biomimética, se procedió a inmovilizar mediante otro método. Se sintetizaron nanopartículas y se adsorbió iónicamente la enzima a la superficie (Esquema 3). La polietilenimina utilizada como catalizador aminado en la síntesis de las nanopartículas de

sílica va a aportar la carga positiva mientras que la enzima va a aportar la carga negativa y de este modo generar la adsorción iónica.



Esquema 3. Representación esquemática de la inmovilización por adsorción iónica de la enzima GUS a las nanopartículas de sílica preformadas.

Cabe destacar que a pesar de haber realizado una intensa búsqueda bibliográfica, no se tiene conocimiento acerca del punto isoeléctrico (PI) de GUS, particularmente del organismo *Patella vulgata*. Se optó por evaluar los puntos isoeléctricos de otros organismos de GUS (*Escherichia coli*, *Scutellaria baicalensis*, *Aspergillus niger*, entre otros). Para esto, se realizó una intensa búsqueda bibliográfica, se accedió a la base de datos BRENDA y se encontró que los PI se encuentran entre valores de 4,5 - 5,5. Conforme a esto, se determina que la enzima presenta carga negativa al realizar la inmovilización ya que la misma se hizo a pH 8.

Por lo tanto, teniendo esto en cuenta, se procedió a realizar la inmovilización de GUS a nanopartículas de sílica mediante adsorción iónica la cual fue descrita recientemente.

Luego de realizar la inmovilización, dicha suspensión se incubó a temperatura ambiente y se tomaron medidas a lo largo del tiempo para evaluar el porcentaje de actividad enzimática en la suspensión de nanopartículas con respecto a la actividad enzimática en el sobrenadante (Figura 15).

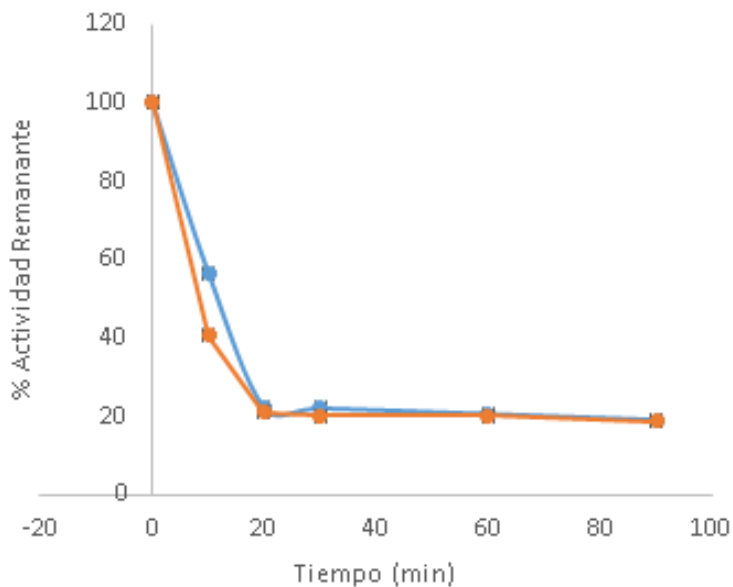


Figura 15. Cinética de inmovilización. Porcentaje de actividad enzimática en la suspensión de nanopartículas y en el sobrenadante a lo largo del tiempo (min). La curva azul corresponde al sobrenadante y la naranja a la suspensión.

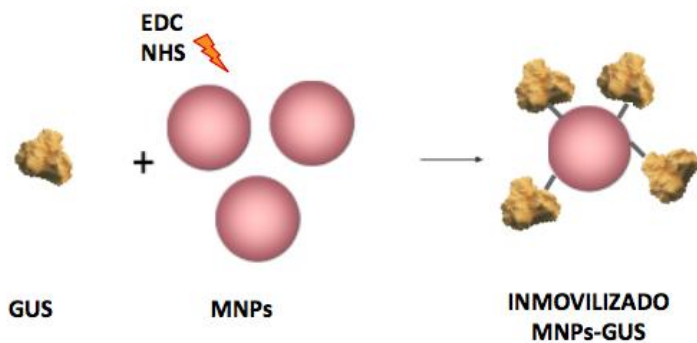
Se incubaron nanopartículas de sílica con la enzima durante un período de tiempo, y se mide la actividad de la suspensión y del sobrenadante. En la Figura 15 se muestra la cinética de inmovilización. Se esperaba que a lo largo del tiempo, la actividad en la suspensión se mantuviera debido a la adsorción de la enzima al soporte, mientras que en el sobrenadante disminuyera. Sin embargo, en los primeros minutos ambas muestras disminuyen, lo cual puede indicar que la enzima se unió al soporte pero se inactiva al ser inmovilizada, por lo cual no se observa actividad ni en el sobrenadante ni en la suspensión de nanopartículas. A pesar de no haber llevado un control de la enzima soluble, anteriormente ya se había estudiado que en las condiciones que se realizó el ensayo, la misma no presentaba alteraciones en la actividad. Por lo tanto, esto permitiría determinar que la disminución se debe factores de la inmovilización. Se podría realizar nuevamente este ensayo probando otros pH más cercanos al PI y evaluar si hay una mejor adsorción a la superficie.

4.2.4 Inmovilización en nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas presentan grandes ventajas para ser utilizadas en la inmovilización de enzimas. Son fáciles de separar tras la aplicación de un campo magnético, presentan alta de superficie, y su momento magnético hace posible que éstas puedan absorber energía y liberarla en forma de calor cuando se aplica un campo magnético alterno, lo que ha dado lugar al desarrollo de una terapia enzimática para el tratamiento del de cáncer. Por estas razones, es de gran interés estos nanomateriales en el área de biomedicina⁸.

4.2.4.1 Unión covalente

Se probaron diferentes estrategias para inmovilizar la enzima a las nanopartículas magnéticas (MNPs), entre ellas la unión covalente. En este caso, las MNPs se modifican para que dispongan de grupos químicos (aminos, hidroxilos, etc) que reaccionen con grupos funcionales de la enzima. Para activar dichas nanopartículas, se utilizaron dos componentes EDC y NHS los cuales son agentes de entrecruzamiento utilizados para unir grupos carboxilos o fosfatos a aminas primarias, generando mayor estabilidad en los enlaces (Esquema 4). Para realizar esta inmovilización, se utilizaron las MNPs fluidMAG-PAA comerciales las cuales cuentan con una matriz polimérica de ácido poliaspártico el cual es un intercambiador de cationes fuerte. Por lo tanto, se siguió el protocolo adecuado descrito en el apartado 3.11 y se obtuvieron los siguientes resultados.



Esquema 4. Representación de la inmovilización de la enzima GUS en MNPs (fluidMAG-PAA) mediante unión covalente.

Los porcentajes de inmovilización y rendimiento fueron $69,5 \pm 0,7$ y $93,5 \pm 4,9$ respectivamente. En primera instancia los resultados indican que la inmovilización había sido exitosa, sin embargo, para confirmar que la enzima estaba unida covalentemente a las nanopartículas, se incubó la suspensión de fluidMAG-PAA-GUS por 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con el buffer de actividad NaP 25 mM, pH 8,0. Seguidamente, se tomó una alícuota del sobrenadante para verificar la ausencia de actividad enzimática en esta muestra. No obstante, el sobrenadante presentó actividad, lo cual indica que el buffer fosfato de sodio con el cual fue incubado desplaza a la enzima, por lo tanto esto comprueba que la enzima no estaba unida completamente de forma covalente, ya que los porcentajes de inmovilización y rendimiento disminuyen luego de esta incubación. Estos resultados se presentan en la siguiente tabla (Tabla 10).

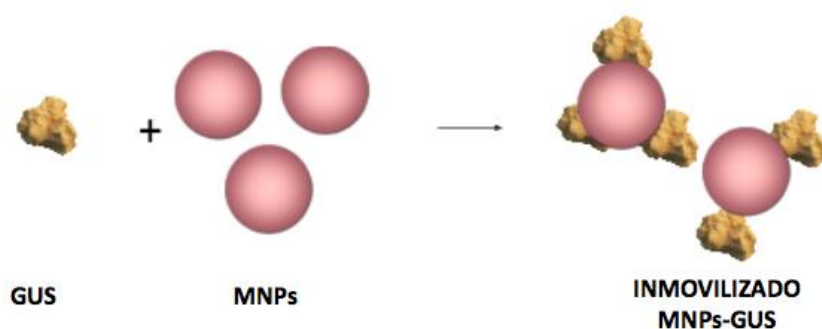
Tabla 10. Porcentajes de inmovilización y rendimiento, presentes en las muestras (suspensión) pre y post incubación por 30 minutos con buffer fosfato de sodio.

| Muestras | UI/mL | %I | %R |
|-----------------|--------------|------------|------------|
| pre-incubación | 0,33 ± 0 | 69,5 ± 0,7 | 93.5 ± 4,9 |
| post-incubación | 0,065 ± 0,01 | 47.5 ± 2,1 | 21.5 ± 2,1 |

4.2.4.2 Adsorción iónica

En base a que las UI/mL obtenidas en las suspensiones con la estrategia anteriormente probada no fueron significativas, se decidió probar otra estrategia de unión química, como lo es la adsorción iónica. Este procedimiento de inmovilización consiste en inmovilizar la enzima por adsorción sobre un soporte de intercambio iónico (Esquema 5). Para este estudio se evaluaron dos tipos diferentes de nanopartículas magnéticas:

- fluidMAG-PAA, matriz polimérica de ácido poliaspártico
- fluidMAG-Amine, las cuales constan de una matriz polimérica de aminosilano.



Esquema 5. Representación de la inmovilización de la enzima GUS en MNPs (fluidMAG-PAA y fluidMAG-Amine) mediante adsorción iónica.

En primer lugar, una vez obtenida la suspensión de nanopartículas se procedió a calcular los porcentajes de inmovilización y rendimiento para cada conjugado (Tabla 10). Se observa que para las fluidMAG-PAA se obtiene un porcentaje de inmovilización de $53 \pm 0,7$, mientras que el rendimiento obtenido fue de $150 \pm 11,3$, lo cual no es un resultado válido ya que el rendimiento no puede superar el 100%. Esto puede deberse a errores de manipulación ya que se realizó una prueba para verificar si había o no contribución de las fluidMAG-PAA en las medidas de actividad y se determinó que las mismas no influyen en la actividad enzimática. Sin embargo, la inmovilización con las nanopartículas fluidMAG-Amine fue exitosa ya que se logró obtener un porcentaje de inmovilización del $100 \pm 0 \%$ y un rendimiento de $93 \pm 0,7 \%$, lo cual implica que del 100% de enzima inmovilizada en las MNPs, un 93 % se encuentra de manera activa (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentajes de inmovilización y rendimiento obtenidos para las diferentes MNPs utilizadas.

| | fluidMAG-PAA | fluidMAG-Amine |
|-----------|---------------------|-----------------------|
| %I | $53 \pm 0,7$ | 100 ± 0 |
| %R | $150 \pm 11,3$ | $93 \pm 0,7$ |

Más adelante, para la inmovilización con fluidMAG-Amine, se realizó la misma prueba que se hizo para el conjugado fluidMAG-PAA-GUS. En este caso, se incubó la muestra por 30 minutos con diferentes buffers para determinar si los mismos desplazan o no a la enzima. Se espera que el fosfato de sodio desplace a GUS ya que los enlaces generados por adsorción iónica son débiles en comparación con los enlaces covalentes, por lo tanto, el pH del buffer podría afectar la carga superficial de la enzima.

A su vez, se evaluó con buffer MES 10 mM pH 5,5, el mismo que se utiliza para realizar las inmobilizaciones. Se realizó nuevamente el ensayo incorporando esta variante, se incubó por 30 minutos con dicho buffer para observar los resultados. En este caso, los sobrenadantes pre y post incubación no presentan diferencias. Conforme a esto, se determina que el nuevo buffer de actividad evaluado no desplaza la enzima.

Tabla 12. Porcentajes de inmobilización y rendimiento para las diferentes muestras (sobrenadante) pre y post incubación por 30 minutos utilizando buffer NaP 25 mM pH 8,0 para medir actividad.

| Muestras | %I | %R |
|-----------------|----------|---------|
| pre-incubación | 98 ± 2,6 | 5 ± 0,4 |
| post-incubación | 46 ± 1,4 | 0 |

Con respecto a la Tabla 12, se puede comprobar que el fosfato de sodio desplaza a la enzima ya que una vez incubado con el mismo, el porcentaje de inmobilización disminuye significativamente lo que puede relacionarse con el elevado aumento en la actividad enzimática del sobrenadante. En cuanto al rendimiento, se observa que pre-incubación el mismo era de 5 ± 0,4%, esto significa que del 98 ± 2,6% que se inmobilizó, solo un 5 ± 0,4% se encuentra de manera activa. Una vez incubada la muestra, la enzima pierde por completo su actividad. Por lo tanto se verifica que el fosfato de sodio afecta significativamente a GUS.

Tabla 13. Porcentajes de inmovilización y rendimiento para las diferentes muestras (sobrenadante) pre y post incubación por 30 minutos utilizando buffer MES 10 mM pH 5.5 para medir actividad.

| Muestras | UI/mL | %I | %R |
|-----------------|-------|---------|----------|
| pre-incubación | 0 | 100 ± 0 | 93 ± 0,7 |
| post-incubación | 0 | 100 ± 0 | 92 ± 1,4 |

En cuanto a la incubación con buffer MES (Tabla 13), se obtiene un porcentaje de inmovilización de 100 ± 0 % y un rendimiento de $92 \pm 1,4$ % lo cual no presenta ninguna variación con respecto a la muestra pre-incubada. Además, el sobrenadante pre-incubación y post-incubación no mostraron actividad enzimática, lo que permite determinar que dicho buffer no desplaza a la enzima por lo cual se decidió continuar midiendo actividad bajo estas condiciones.

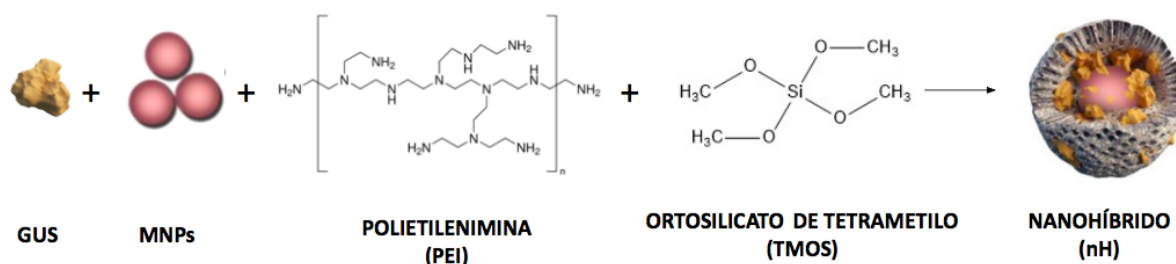
Una vez obtenido el núcleo magnético con la enzima inmovilizada, la siguiente estrategia fue continuar con el recubrimiento del mismo con un material adecuado. La finalidad del recubrimiento es diversa, las más relevantes se nombran a continuación:

- Limita las interacciones interparticulares (Van der Waals, electrostáticas, dipolos magnéticos, etc) que producen aglomerados de tamaños micrométricos generando poblaciones polidispersas.
- Evita o retarda el reconocimiento por el Sistema Reticuloendotelial (RES) que eliminaría las NPs de la circulación antes de hacer su función.
- Protege al núcleo metálico de la oxidación debida a la gran relación entre la superficie y masa de las NPs ^{28, 61}.

Teniendo en cuenta algunas de las posibles maneras de generar la cubierta (recubrimientos orgánicos o inorgánicos), se optó por recubrir el núcleo magnético con un material inorgánico, como lo es la sílica biomimética.

4.2.4.3 Atrapamiento en sílica

Una vez obtenido el conjugado MNPs-GUS, se procedió a recubrir dicha preparación con sílica biomimética (Esquema 6). En primer lugar, se probó esta estrategia para la inmovilización con fluidMAG-PAA-GUS mediante unión covalente. Los porcentajes de inmovilización y rendimiento obtenidos fueron 100 ± 0 y $37 \pm 2,5$ respectivamente. Sin embargo, se realizó la prueba de incubar la suspensión con el buffer NaP 0,1 M pH 8,0 utilizado para la síntesis de nanopartículas de sílica. En este caso, el buffer desplaza a la enzima y la actividad presente en la suspensión de nanopartículas no es propiamente de la enzima inmovilizada sino que de la enzima desplazada en solución. Además, el sobrenadante de este atrapamiento también presentó actividad lo cual indica que no se inmovilizó correctamente. Posiblemente, esto sucede debido a que la enzima no es atrapada por la sílica sino que se encuentra adsorbida iónicamente.



Esquema 6. Esquema representativo del atrapamiento en nanopartículas de sílica del conjugado enzima GUS-MNPs.

El mismo ensayo fue realizado para el inmovilizado fluidMAG-Amine-GUS obteniendo un porcentaje de inmovilización de 100 ± 0 y un rendimiento de 100 ± 0 %. Al igual que lo mencionado recientemente para fluidMAG-PAA-GUS, se confirmó que el fosfato de sodio utilizado para realizar la síntesis de nanopartículas de sílica desplaza a la enzima GUS, desestabilizando el conjugado previamente generado. Por lo tanto, la cubierta de sílica biomimética no pudo lograrse exitosamente.

4.2.5 Caracterización de los nanoinmovilizados

4.2.5.1 Estabilidad térmica

Se realizaron medidas de actividad a diferentes tiempos de incubación para medir la estabilidad térmica de la enzima inmovilizada en nanopartículas magnéticas fluidMAG-Amine frente a la enzima soluble y poder comparar la vida media de cada una y determinar si la inmovilización contribuye con dicho parámetro. Para esto, ambas muestras (enzima soluble e inmovilizada) se sometieron a diferentes temperaturas. Previamente se realizaron estudios para caracterizar la enzima soluble (apartado 4.1.5) y determinar a qué temperatura realizar este experimento, de forma de poder definir el factor de estabilización de la enzima inmovilizada.

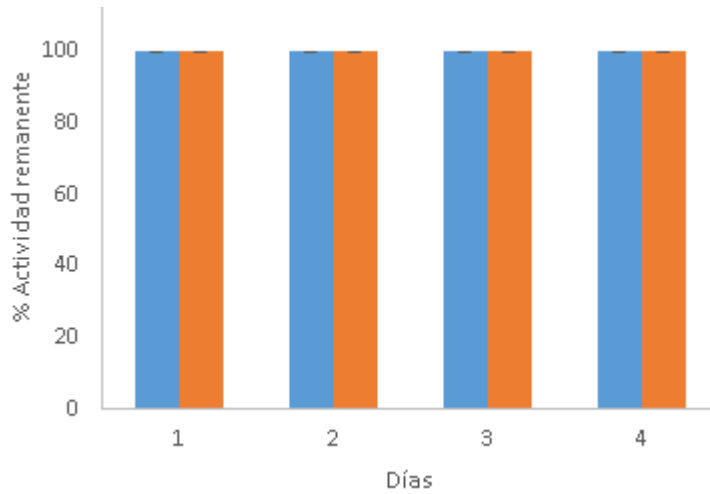


Figura 16. Estabilidad térmica del conjugado fluidMAG-Amine-GUS a 45°C. La barra azul corresponde a la enzima soluble y la naranja a la inmovilizada.

Se observa que la estabilidad térmica del conjugado fluidMAG-Amine-GUS a 45°C se mantiene estable conservando el 100% de su actividad, al igual que la enzima soluble (Figura 16). Por lo tanto, teniendo en cuenta estos resultados, se decidió elevar la temperatura para lograr ver el factor de estabilización del conjugado frente a la enzima soluble (Figura 17).

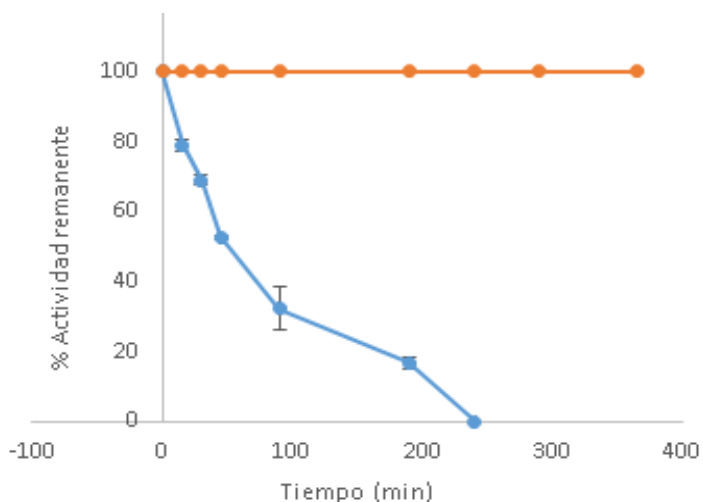


Figura 17. Estabilidad térmica del conjugado fluidMAG-Amine-GUS a 75°C. La curva azul corresponde a la enzima soluble y la naranja a la inmovilizada.

Según se puede observar en la Figura 17, la enzima inmovilizada a las nanopartículas magnéticas (curva naranja) fue significativamente más estable en comparación con la enzima soluble (curva azul), ya que esta última presenta una vida media de 45 minutos mientras que el inmovilizado permanece estable conservando el 100% de su actividad. Sin embargo, los resultados no permiten determinar un factor de estabilización debido a que no se pudo definir la vida media del inmovilizado ya que no se logró ver la caída de la actividad enzimática a lo largo del tiempo.

Con el propósito de poder determinar la vida media de este inmovilizado buscando el factor de estabilización, se intentó elevar la temperatura a 80°C pero el efecto de agregación de las nanopartículas impedía ver el comportamiento de la estabilidad en el tiempo. Se podría haber realizado un control de las nanopartículas en ausencia de enzima para evaluar si las mismas contribuyen con el efecto de agregación.

4.3 PROYECCIONES FUTURAS

A partir de los resultados obtenidos en nuestro trabajo, se podría continuar la caracterización de los nanoimmobilizados, buscar nuevas alternativas de soportes para la inmovilización de enzimas y finalmente poder realizar estudios de conversión de la pro-droga a su forma activa.

5. ANÁLISIS ECONÓMICO

Debido a que el proyecto está en las primeras etapas de la investigación, aún no se piensa en el desarrollo de un producto comercializable. Por este motivo, el análisis económico no es aplicable al marco del proyecto presentado.

6. CONCLUSIONES

- Se lograron optimizar satisfactoriamente las condiciones para medir la actividad enzimática de GUS con diferentes sustratos ya que en el laboratorio no se disponía previamente de esta información.
- Se logró una caracterización bioquímica parcial de la enzima GUS de *Patella vulgata*, pudiéndose determinar la temperatura y pH óptimo, la estabilidad térmica y una estimación del peso molecular.
- Se logró una preparación inmovilizada de la enzima en nanopartículas fluidMAG-Amine mediante adsorción iónica, con altos porcentajes de inmovilización y rendimiento, 100 ± 0 y $93\pm 0,7$ respectivamente.
- En cuanto a los nanoinmovilizados, se evaluó la estabilidad térmica del conjugado con respecto a la enzima soluble pudiéndose comprobar el aumento significativo en la estabilidad del inmovilizado a lo largo del tiempo.

7. REFERENCIAS

1. Weinberg RA. The nature of cancer: the biology of cancer. [Internet] New York. Garland Sciencenh; 2007 [citado 2019 Feb 2]. Disponible desde: http://www.nhri.org.tw/NHRI_ADM/userfiles/file/1010510.pdf.
2. Tratamientos contra el cáncer [Internet] Winship Cancer Institute [citado 2019 Feb 2]. Disponible desde: <https://www.cancerquest.org/es/para-los-pacientes/tratamientos>.
3. Tranoy-Opalinski I, Legigan T, Barat R, Clarhaut J, Thomas M, Renoux B, Papot S. b-glucuronidase-responsive prodrugs for selective cancer chemotherapy: an update. European Journal of Medicinal Chemistry [Internet] 2014 [citado 2019 Feb 7]; 3(74): 302-313. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24480360>
4. Karjoo Z, Chen X, Hatefia A. Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. Advanced Drug Delivery Reviews. [Internet] 2015 [citado 2019 Feb 2]; 99: 113-128. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4758904/>
5. Hueto E, Pozuelo M. Trabajo fin de grado terapias dirigidas contra el cáncer. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense [Internet] 2016 [citado 2019 Feb 8]. Disponible desde: http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MARIA_POZUELO_CABANELL.pdf

6. Hansel T, Kropshofer H, Cantante T, Mitchell JA, George AJ. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature Reviews Drug Discovery* [Internet] 2010 [citado 2019 Feb 8]; 9: 325-338. Disponible desde: <https://doi.org/10.1038/nrd3003>
7. Bongartz T1, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and metaanalysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA* [Internet] 2006 [citado 2019 Feb 8]; 295(19): 2275-2285. Disponible desde: <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/202873>
8. Ruiz P. Nanopartículas magnéticas para tratamiento y diagnóstico de cáncer. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense [Internet] [citado 2019 Feb 10]. Disponible desde: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/PAULA%20RUIZ%20BRIONES.pdf>
9. Terapias dirigidas contra el cáncer. National Cancer Institute. [Internet] [citado 2019 Feb 2]. Disponible desde: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-dirigida/hoja-informativa-terapias-dirigidas>.
10. Yang T, Choi M, Cui F, Lee S, Chung S, Shim C, Kim D. Antitumor effect of paclitaxel-loaded pegylated immunoliposomes against human breast cancer cells. *Pharmaceutical research* [Internet]. 2007 [citado 2019 feb 1]; 24: 2402-2411. Disponible desde: <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9425-y>
11. Allen T, Cullis P. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced drug delivery reviews* [Internet]. 2014 [citado 2019 feb 1]; 65: 36-48. Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2012.09.037>

12. Needham D, Anyarambhatla G, Kong G, Dewhirst MW. A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer Research* [Internet]. 2000 [citado 2019 feb 5]; 60(5): 1197–2001. Disponible desde: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10728674>
13. Perche F, Torchilin V. Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumor targeting. *Journal of Drug Delivery* [Internet]. 2013 [citado 2019 feb 6]; 1-32. Disponible desde: <https://doi.org/10.1155/2013/705265>
14. Hu C, Zhang L. Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. *Biochemical Pharmacology* [Internet]. 2012 [citado 2019 feb 7]; 83(8): 1104–1111. Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2012.01.008>
15. Mattheolabakis G, Rigas B, Constantinides P. Nanodelivery strategies in cancer chemotherapy: biological rationale and pharmaceutical perspectives. *Nanomedicine* [Internet]. 2012 [citado 2019 feb 7]; 7(10): 1577–1590. Disponible desde: <https://doi.org/10.2217/nnm.12.128>
16. Lim J, Simanek E. Triazine dendrimers as drug delivery systems: from synthesis to therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* [Internet]. 2012 [citado 2019 feb 4]; 64(9): 826–835. Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2012.03.008>
17. Webster D, Sundaram P, Byrne M. Injectable nanomaterials for drug delivery: carriers, targeting moieties, and therapeutics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [Internet]. 2013 [citado 2019 feb 10]; 84(1): 1–20. Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2012.12.009>

18. Fabbro C, Ali-Boucetta H, Da Rosa T, Kostarelos K, Bianco A, Prato M. Targeting carbon nanotubes against cancer. *Chemical Communications* [Internet]. 2012 [citado 2019 feb 2]; 48(33): 3911 - 3926. Disponible desde: <https://doi.org/10.1039/c2cc17995d>
19. Libutti S, Paciott G, Byrnes A, Alexander R, Gannon W, Walker M, Seidel G, Yuldasheva N, Tamarkin L. Phase I and pharmacokinetic studies of CYT-6091, a novel pegylated colloidal gold-rhTNF nanomedicine". *Clinical Cancer Research* [Internet]. 2010 [citado 2019 feb 18]; 16(24): 6139–6149. Disponible desde: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0978>
20. Bhattacharyya S, Kudgus RA, Bhattacharya R, Mukherjee P. Inorganic nanoparticles in cancer therapy. *Pharmaceutical Research* [Internet] 2011 [citado 2019 Feb 8]; 28(2): 237–259. Disponible desde: <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0318-0>
21. Correa S, Sierra T, Asín L, Betancor L, Grazú V. Nanobiohíbridos para la termoactivación de una enzima terapéutica por hipertermia magnética. *J Neuro-Oncology Cancer Med* [Internet] 2011 [citado 2019 Feb 2]; 1034(5): 317–324. Disponible desde: http://enaqui.fq.edu.uy/Resumen_Correa_Sonali.pdf
22. Lal S, Verma J, Van Noorden C. Nanoparticles for hyperthermic therapy: synthesis strategies and applications in glioblastoma. *Int J Nanomedicine* [Internet] 2014 [citado 2019 Feb 22]; 10(9): 2863-2877. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24959075>
23. Krishnan S, Diagaradjane P, Cho S. Nanoparticle-mediated thermal therapy: Evolving strategies for prostate cancer therapy. *Int J Hyperthermia*. [Internet] 2010 [citado 2019 Feb 22]; 26(8): 775-789. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20858069>

24. Christophi C, Winkworth A, Muralihdaran V, Evans P. The treatment of malignancy by hyperthermia. *Surg Oncol*. [Internet] 1998 [citado 2019 Feb 8]; 7(1-2): 83-90. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10421511>

25. García S. Nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas tesis doctoral. Universitat de Barcelona, Facultat de Fàrmacia. [Internet] 2012 [citado 2019 Feb 26]. Disponible desde: http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/41856/2/SGJ_TESIS.pdf

26. Wankhede M, Bouras A, Kaluzova M, Hadjipanayis C. Magnetic nanoparticles: an emerging technology for malignant brain tumor imaging and therapy. *Expert Rev Clin Pharmacol*. [Internet] 2012 [citado 2019 Feb 26]; 5(2): 173-186. Disponible desde: http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/41856/2/SGJ_TESIS.pdf

27. Jordan A, Scholz R, Wust P, Schirra H, Thomas Schiestel, Schmidt H, Felix R. Endocytosis of dextran and silan-coated magnetite nanoparticles and the effect of intracellular hyperthermia on human mammary carcinoma cells in vitro. *J Magn Magn Mater*. [Internet] 1999 [citado 2019 Feb 26]; 194(1-3): 185-196. Disponible desde: <https://core.ac.uk/download/pdf/10701475.pdf>

28. Colombo M, Carregal S, Casula M, Gutiérrez L, Morales M, Böhm I, Heverhagen JT, Prospero D, Parak WJ. Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem Soc Rev*. [Internet] 2012 [citado 2019 Feb 26]; 41(11): 4306-4034. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22481569>

29. Vallet-Regi M, Arcos D. Nanoceramics in Clinical Use: from materials to applications. *RSC Nanoscience & Nanotechnology* [Internet]. 2016 [citado 2019 Feb 26]; 275-312. Disponible

desde:<https://epdf.tips/biomimetic-nanoceramics-in-clinical-use-from-materials-to-applications-rsc-nanos.html>

30. Amancay G. ORT Argentina. Aliadas de la biotecnología: las enzimas [Internet]. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología; 2014 [citado 2019 Feb 12]. Disponible desde: <https://campus.ort.edu.ar/articulo/524948/aliadas-de-la-biotecnologia-las-enzimas>

31. Arroyo M. Inmovilización de enzimas, fundamentos, métodos y aplicaciones. Ars Pharmaceutica [Internet]. 1998 [citado 2019 Feb 26]; 39(2): 23-39. Disponible desde: https://www.researchgate.net/publication/237564145_Inmovilizacion_de_enzimas_Fundamentos_metodos_y_aplicaciones

32. β -Glucuronidase (GUS) Activity Assays of Transformed Plants [Internet]. Wellesley College BISC 219 Genetics; 2009 [citado 2019 Feb 24]. Disponible desde: https://openwetware.org/wiki/BISC_219/2009:_Mod_3_Experiment_2_Assaying_the_transgenic_plants

33. Fishman W, Anylan A. The presence of high beta-glucuronidase activity in cancer tissue. Journal of Biological Chemistry [Internet]. 1947 [citado 2019 Feb 15]; 162(2): 449-450. Disponible desde: <http://www.jbc.org/content/169/2/449.citation>

34. Bosslet K, Straub R, Blumrich M, Czech J, Gerken M, Sperker B, Kroemer HK, Gesson JP, Koch M, Monneret C. Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy. Cancer Research [Internet]. 1998 [citado 2019 Feb 25]; 58(6): 1195-1201. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9515805>

35. Tranoy-Opalinski I, Legigan T, Barat R, Clarhaut J, Thomas M, Renoux B, Papot S. β -glucuronidase-responsive prodrugs for selective cancer chemotherapy: an update. *European Journal of Medicinal Chemistry* [Internet]. 2014 [citado 2019 Feb 23]; 74: 302-313. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24480360>

36. β -Glucuronidase from limpets (*Patella vulgata*). Sigma Aldrich [Internet]. [citado 2019 Feb 25]. Disponible desde: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g2174?lang=en®ion=UY>

37. Briciu-Burghina C, Heery B, Regan F. Continuous fluorometric method for measuring β -glucuronidase activity: comparative analysis of three fluorogenic substrates. *Royal Society of Chemistry* [Internet]. 2015 [citado 2019 Feb 26]; 140 (17): 5953-5964. Disponible desde: https://www.researchgate.net/publication/280584497_Continuous_fluorometric_method_for_measuring_beta-glucuronidase_activity_comparative_analysis_of_three_fluorogenic_substrates

38. Wingard J, Lemuel B. Enzyme Engineering. *Advances in Biochemical Engineering* [Internet]. 2005 [citado 2019 Feb 27]; 1-48. Disponible desde: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/BFb0006665>

39. Brena B, González P, Batista F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *Immobilization of Enzymes and Cells*. [Internet] 2013 [citado 2019 Feb 22]; 15-31. Disponible desde: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-550-7_2

40. Hartmeier, W. Immobilized biocatalysts: from simple to complex systems. *Trends in Biotechnology*. [Internet] 1985 [citado 2019 Feb 8]; 3(6): 149-153. Disponible desde: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167779985901040>

41. Martinek K, Mozhaev VV. Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry. [Internet] 1985 [citado 2019 Feb 8]; 179-249. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3898741>

42. Arroyo M. Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Complutense de Madrid [Internet] 1998 [citado 2019 Feb 22]. Disponible desde: <https://www.ugr.es/~ars/abstract/arroyo.pdf>

43. Fajardo R, Osuna J, Velázquez C, Escalante P, Ibarra V. Inmovilización de células y enzimas [Internet]. Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Químicas, México [citado 2019 Feb 23]. Disponible desde: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%206/5.html>

44. Klivanov AM. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. Science [Internet] 1983 [citado 2019 Feb 2]; 219(4585): 722-727. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17814033>

45. Klivanov AM, Kaplan NO, Kamen MD. A rationale for stabilization of oxygen-labile enzymes: application to a clostridial hydrogenase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA [Internet] 1978 [citado 2019 Feb 8]; 75(8): 3640-3643. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC392841/>

46. Reslow M, Adlercreutz P, Mattiasson B. On the importance of the support material for bioorganic synthesis. Influence of water partition between solvent, enzyme and solid support in water-proof reaction media. Eur. J. Biochem [Internet] 1988 [citado 2019 Feb 22]; 172: 573-

578. Disponible desde: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13927.x>

47. Cuantificación proteica. Bicinchoninic Acid Kit. Sigma-Aldrich. [Internet] [citado 2019 Feb 8]. Disponible desde: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/protein-quantitation/bicinchoninic-acid-kit.html>

48. Protocolo cuantificación proteica por BCA. Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit. Sigma-Aldrich. [Internet] [citado 2019 Feb 8]. Disponible desde: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/bca1bul.pdf>

49. Kang K, Oh H, Kim D, Shim G, Lee C. Synthesis of silica nanoparticles using biomimetic mineralization with polyallylamine hydrochloride. *Journal of Colloid Interface Science* [Internet]. 2017 [citado 2019 Feb 28]; 507: 145–153. Disponible desde: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979717308822>

50. Clifford E. *Enzymes*. Academic Press. 1979 [citado 2019 Abr 21]; (3): 1899-1985. Disponible desde: <https://trove.nla.gov.au/work/9925629?q&versionId=224102694>

51. Konishi T, Kotake T, Soraya D, Matsuoka K, Koyama T, Kaneko S, Igarashi K, Samejima M, Tsumuraya Y. Properties of family 79 beta-glucuronidases that hydrolyze beta-glucuronosyl and 4-O-methyl-beta-glucuronosyl residues of arabinogalactan-protein. *ScienceDirect* [Internet]. 2008 [citado 2019 Abr 16]; 343(7):1191-1201. Disponible desde: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008621508001298?via%3Dihub>

52. Morimoto, S.; Harioka, T.; Shoyama, Y. Purification and characterization of flavone-specific beta-glucuronidase from callus cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Planta* [Internet]. 1995 [citado 2019 Abr 16]; 195: 535-540. Disponible desde: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00195712>

53. Nakamura T, Takagaki K, Majima M, Kimura S, Kubo K, Endoss M. A new type of exo-beta-glucuronidase acting only on non-sulfated glycosaminoglycans. *The Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1990 [citado 2019 Abr 16]; 265(10): 5390-5397. Disponible desde: <http://www.jbc.org/content/265/10/5390.long>

54. Kim DH, Jin YH, Jung EA, Han MJ, Kobashi K. Purification and characterization of beta-glucuronidase from *Escherichia coli* HGU-3, a human intestinal bacterium. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* [Internet]. 1995 [citado 2019 Abr 16]; 8(9): 1184-1188. Disponible desde:

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb1993/18/9/18_9_1184/_article/-char/ja/

55. Aldave M, Jorrín J. Estudio cinético de la actividad invertasa de levadura de panadería [Internet]. Campus Universitario de Rabanales. [citado 2019 Feb 17]. Disponible desde: <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/32%20INVERTASA%20CINETICA.pdf>

56. Konishi T, Kotake T, Soraya D, Matsuoka K, Koyama T, Kaneko S, Igarashi K, Samejima M, Tsumuraya Y. Properties of family 79 beta-glucuronidases that hydrolyze beta-glucuronosyl and 4-O-methyl-beta-glucuronosyl residues of arabinogalactan-protein. *ScienceDirect* [Internet]. 2008 [citado 2019 Abr 18]; 343(7): 1191-201. Disponible desde: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008621508001298?via%3Dihub>

57. Sudan C, Prakash S, Bhomkar P, Jain S, Bhalla-Sarin N. Ubiquitous presence of beta-glucuronidase (GUS) in plants and its regulation in some model plants. *Planta* [Internet]. 2006 [citado 2019 Abr 18]; 224(4): 853–864. Disponible desde: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00425-006-0276-2>
58. Honarbakhsh M, Villafane AA, Ruhl I, Sannino D, Bini E. Development of a thermostable β -glucuronidase-based reporter system for monitoring gene expression in hyperthermophiles. *Biotechnology and Bioengineering* [Internet]. 2012 [citado 2019 Abr 18]; 109(7): 1881-1886. Disponible desde: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.24432>
59. Chen KC, Cheng TL, Leu YL, Prijovich ZM, Chuang CH, Chen BM, Roffler SR. Membrane-localized activation of glucuronide prodrugs by beta-glucuronidase enzymes. *Cancer Gene Therapy* [Internet]. 2007 [citado 2019 Abr 18]; 14(2): 187-200. Disponible desde: <https://www.nature.com/articles/7700999>
60. Langley SD, Wilson SD, Gross AS, Warner CK, Finnerty V. A genetic variant of beta-glucuronidase in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1983 [citado 2019 Abr 18]; 258: 7416-7424. Disponible desde: <http://www.jbc.org/content/258/12/7416.long>
61. Sun C, Lee J, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* [Internet]. 2008 [citado 2019 Feb 11]; 60(11):1252-1265. Disponible desde: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X08001014>