

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



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Nanobiorreactores con actividad enzimática como terapia para
la galactosemia clásica.**

Tesis

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

Presenta:

Pedro Antonio

Ensenada, Baja California, México
2019

Tesis defendida por

Pedro Antonio Gama López

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Director de tesis

Dr. Andrés Zárate Romero

Dra. Carolina Álvarez Delgado



Dr. Sergio Fuentes Moyado
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Pedro Antonio Gama López** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

Nanobiorreactores con actividad enzimática como terapia para la galactosemia clásica.

Resumen aprobado por:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Director de tesis

La galactosemia clásica es una enfermedad hereditaria que resulta en la deficiencia de la enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (**GALT**), cuando la actividad de GALT es deficiente en el organismo se acumulan compuestos tóxicos como el galactitol o galactonato que comprometen seriamente la salud de los pacientes. El objetivo de este proyecto fue sintetizar nanopartículas con actividad catalítica GALT para aplicaciones en la terapia de la galactosemia clásica. Para alcanzar el objetivo, realizamos la síntesis de bionanorretores (GALT-BMV) con actividad enzimática GALT mediante la encapsidación de la enzima GALT dentro de cápsides del virus BMV por el método de autoensamble. Nosotros adquirimos la enzima comercial GALT y por otra parte produjimos y purificamos virus nativo BMV a partir de plantas previamente infectadas, del virus obtenido se aisló y purifico la proteína de capsido CP-BMV necesaria para el ensamble. Se probaron tres relaciones en masa de la proteína CP con respecto a la enzima GALT para la reacción ensamble y a partir de un ensayo de movilidad electroforética determinamos cuál de estas relaciones es la más efectiva para la síntesis de nanopartículas GALT-BMV. En función de la relación optima encontrada realizamos un ensayo de síntesis a mayor escala para producir muestra suficiente para los ensayos de caracterización. La actividad enzimática GALT fue caracterizada y cuantificada por la aparición de producto (UDP-galactosa) de la reacción con ayuda de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se cuantifico la actividad catalítica tanto de la enzima GALT-libre, así como de la enzima confinada dentro de las cápsides virales GALT-BMV. Con la información de los cromatogramas obtenidos por el HPLC, se realizó una regresión de Michaelis-Menten, respectivamente. Bajo este análisis, encontramos que el sustrato es más afín a la enzima cuando está en forma libre ($K_M = 0.91$) que cuando esta confinada GALT-BMV ($K_M = 1.64$). Nosotros encontramos que la enzima encapsidada tiene un rendimiento del 16% de la actividad catalítica, K_{cat} de 282.6 min^{-1} , en comparación con la enzima GALT-libre K_{cat} de $1,709.9 \text{ min}^{-1}$. Con las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de transmisión encontramos que los bionanorretores sintetizados poseen una geometría cuasi-esférica y de tamaño de $28 \pm 8.2 \text{ nm}$ y por lo tanto numero triangulación $T=3$. Finalmente, concluimos que sintetizamos nanopartículas GALT-BMV con actividad enzimática GALT y con un alto potencial para su uso en el tratamiento de la galactosemia clásica.

Palabras clave: Galactosemia clásica, Galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT), bionanorretores, cápsides virales, BMV.

Abstract of the thesis presented by **Pedro Antonio Gama López** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

Nanobioreactors with catalytic activity for classic galactosemia therapy.

Abstract approved by:

Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Thesis Director

Classic galactosemia is a hereditary disease that implies a deficiency in galactose-1-phosphate uridyl transferase (**GALT**) enzyme. When GALT enzyme activity is not efficient in the organism, this implies an accumulation of toxic compounds such as galactitol or galactonate, which seriously risks patients' health. The main objective of this project was to synthesize nanoparticles with GALT catalytic activity for applications in classic galactosemia therapy. To achieve it, the synthesis of bionanoreactors (GALT-BMW) with GALT enzymatic activity was performed through the encapsidation of the GALT enzyme inside the BMV virus capsids using molecular self-assembly. A commercial version of GALT human enzyme was acquired, and native BMV virus was purified through previously infected plants, obtaining the CP-BMV capsid protein needed for the assembly. Three in mass relationships between CP and GALT enzyme for the assembly reaction were tested and starting from an Electrophoretic Mobility Assay the effectivity of each relationship in the synthesis of GALT-BMW nanoparticles was proved in order to obtain the most effective one. From the optimal relationship, a synthesis assay was made in a larger scale to produce enough sample for the catalytic and structural characterization assays. Enzymatic GALT activity was characterized and quantified by means of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). There was a characterization of catalytic activity of GALT-free enzyme and the enzyme confined to the viral capsid GALT-BMW as well. Using the information provided by the HPLC chromatographs a Michaelis-Menten regression was performed for both cases. We find that the substrate is more related to the enzyme in its free form ($K_M = 0.91$) than when it's confined GALT-BMV ($K_M = 1.64$). The encapsidated enzyme has a 16% performance from catalytic activity, K_{cat} of 282.6 min^{-1} in comparison to the GALT-free enzyme, which shows a K_{cat} of $1,709.9 \text{ min}^{-1}$. Micrographs obtained by Transmission Electron Microscopy show that the symmetry of the synthesized bionanoreactors is semi-spherical, with a $28 \pm 8.2 \text{ nm}$ size and a triangulation number of $T=3$. It is concluded that GALT-BMW nanoparticles with enzymatic GALT activity were synthesized and they have a high potential for their use in classical galactosemia treatment.

Keywords: Classic galactosemia, galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT), bionanoreactors, virus capsids, BMV.

Dedicatoria

Dedico a mi madre y al amor infinito que me ha brindado los esfuerzos invertidos en la elaboración este trabajo.

Agradecimientos

Agradezco al CONACyT por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de posgrado.

Agradezco al CICESE y al CNyN y a todo su personal académico y administrativo por su atención y paciencia.

Agradezco a mi asesor Rafael Vázquez Duhalt por el apoyo incondicional académico y personal que me ha brindado, así como a toda la sabiduría que me ha transmitido.

Agradezco a mi comité de tesis la Dra. Carolina Álvarez Delgado y al Dr. Andrés Zarate Romero por sus asesorías y el tiempo que me brindaron para darle seguimiento a mi proyecto.

Agradezco a la Dra. Katrin Quester y la M. A. Itandehui Betanzo Gutiérrez por su apoyo técnico.

Agradezco a Javier Perez Robles por su apoyo técnico en la elaboración de este proyecto.

Agradezco a mi Familia por todo su apoyo infinito. A mi madre Felix López Honorato y a mis hermanas Edith, Araceli , Sandra, Ana Luisa y también a mis sobrinos por su amor cariño y apoyo.

Agradezco el apoyo incondicional que me ofrecieron mis amigos del posgrado: Alma Castañeda, Kora Lu Rojas, Jose Ruiz Mariscal, Laura Caballero y a todos los compañeros de mi generación que me brindaron su apoyo

Agradezco el apoyo que me brindaron todos mis compañeros del laboratorio de Bionanotecnología del CNyN, en especial a Josemarco Mendoza.

Tabla de contenido

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tabla.....	x
Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Antecedentes.....	4
2.1. Deficiencia enzimática.....	4
2.2. Galactosemia clásica	5
2.2.1. Incidencia y prevalencia	5
2.2.2. El gen y estructura de la enzima GALT	5
2.2.3. La reacción de GALT.....	6
2.3. Tratamiento de la galactosemia clásica	7
2.4. Terapia por remplazo enzimático	8
2.5. Nanobiorreactores enzimáticos tipo VLP.....	9
2.6. Cápsides virales o VLP's (virus-like particles).....	9
2.6.1 Compartimentalización de las VLP's y moléculas cargo.....	10
2.6.2. Producción y ventajas de las VLP's.....	11
2.7. EL BMV	12
Capítulo 3. Justificación, hipótesis y objetivos.	14
3.1. Justificación	14
3.2. Hipótesis.....	14
3.3. Objetivos	14
3.3.1. General	14
3.3.2. Específicos	15
Capítulo 4. Metodología	16
4.1. Diseño de bionanorretores GALT-BMV	16
4.1.1. Análisis <i>in silico</i> de las propiedades electrostáticas de la enzima GALT y los capsómeros de virus BMV.	17
4.1.2. Perfil del potencial Z de la enzima GALT y de la proteína de cápside BMV.....	17
4.1.3. Radio hidrodinámico de la enzima GALT por Dispersión Dinámica de Luz	17
4.2. Síntesis de bionanorretores GALT-BMV	18

4.2.1. Producción y purificación de la proteína de la cápside CP del BMV	19
4.2.2. Infección de plantas de cebada y cosecha de hojas	19
4.2.3. Extracción y purificación del virus BMV	19
4.2.4. Purificación de la proteína CP-BMV.....	21
4.2.5. Ensamblajes de prueba GALT-BMV en microvolúmenes de reacción.....	22
4.2.6. Ensayo de movilidad electroforética de los ensamblajes de prueba en gel de agarosa	22
4.2.7. Ensamble final GALT-BMV	23
4.2.8. Purificación de las nanopartículas GALT-BMV.....	23
4.2.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	24
4.3. Caracterización de los bionanorreactores	24
4.3.1 Actividad catalítica de las nanopartículas medida por HPLC.....	24
4.3.2 Estructura superficial de los bionanorreactores.	26
Capítulo 5. Resultados	27
5.1. Propiedades electrostáticas de la enzima GALT y de la proteína de cápside.	27
5.1.1. Distribución superficial de carga de la enzima GALT y de los capsómeros del BMV.....	27
5.1.2. Potencial Z y radio hidrodinámico de la enzima GALT, la proteína CP y el virus BMV.	27
5.2. Purificación de virus BMV y de proteína de cápside CP-BMV.....	34
5.3. Ensamblajes prueba GALT-BMV y ensayo de movilidad electroforética.....	34
5.4. Síntesis y purificación de las nanopartículas GALT-BMV	36
5.6. Actividad catalítica de las nanopartículas BMV.	38
5.7. Estructura superficial de los bionanorreactores GALT-BMV.	40
Capítulo 6. Discusión	43
Capítulo 7. Conclusiones.....	47
Literatura citada.....	48

Lista de figuras

- Figura 1.** Ruta metabólica de la galactosa (Vía de Leloir). 1
- Figura 2.** Representación tridimensional de la estructura de la enzima GALT humana. Se ilustra el homodímero de GALT, de color rojo la cadena A y de azul la cadena B. Los átomos del cofactor Zn^{2+} se ilustran de color amarillo..... 6
- Figura 3.** Reacción enzimática de la conversión de galactosa 1-fosfato (Gal-1-F) en glucosa 1-fosfato catalizada por la enzima GALT. Figura modificada de *Holden et al., 2003. Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway*..... 7
- Figura 4.** Compartimientos disponibles en VLP's para cargar moléculas de interés. Figura modificada de Douglas y Young, 2006. *Viruses: Making Friends with Old Foes*..... 10
- Figura 5.** Representación esquemática de la estructura de una cápside del virus BMV T=3. a) Cuadrante de la sección transversal de una cápside vacía del BMV con radio exterior 14.2nm. b) Perspectiva del interior hueco de las VLP's del BMV, el color azul indica la densidad de cargas electrostáticas positivas. C) Perspectiva de la superficie exterior de la cápside del BMV, se distingue una tonalidad mas rojacea, que indica una mayor distribución de cargas positivas sobre la superficie del virus. Figura modificada de *Lucas et al. (2002) The crystallographic structure of brome mosaic virus*..... 13
- Figura 6.** Proceso de producción y purificación del virus nativo BMV. a) Infección de plantas de cebada, se observa un patrón de clorosis en líneas paralelas a la vena media de las hojas. b) Extracción de virus a partir de un triturado de hojas infectadas. c) Separación en dos fases por centrifugación del macerado. d) extracto final recuperado de la fase superior (amarilla) después de la centrifugación. e) Colchón de sacarosa para el aislamiento de virus a partir del extracto final de virus. f) Purificación del virus BMV por gradiente de sacarosa..... 21
- Figura 7.** Análisis *in silico* de la distribución superficial de carga eléctrica de la enzima humana GALT y de los capsómeros del BMV utilizando el software Maestro de Shrödinger®. a) y b) Superficie de la enzima GALT vistas desde una posición frontal y una posterior respectivamente. Superficie de un pentámero de CP del BMV: c) superficie interna y d) externa con respecto a su orientación en la cápside. Superficie de un hexámero de CP del BMV, e) superficie interna y f) externa con respecto a su orientación en la cápside. En la figura se muestra una escala de color rojo a azul, los sitios de color rojo son negativos y los de color azul positivos eléctricamente. 28
- Figura 8.** Perfil de potencial Z de la enzima GALT en función del pH (4,5,6 y 7). El potencial Z (mV) de GALT en este intervalo fue siempre negativo..... 29
- Figura 9.** Perfil de potencial Z de la proteína CP-BMV en función del pH (4,5,6 y 7). Se observa que alrededor del pH 6.5 la proteína alcanza el punto isoeléctrico, a valores más altos de este pH la proteína CP-BMV tiene un potencial negativo y a menores a pH 6.5 el potencial de la proteína CP es positivo. 29
- Figura 10.** Perfil de potencial Z del virus BMV en función del pH (4,5,6 y 7). Se observa que alrededor del pH 6.3 el virus alcanza el punto isoeléctrico, a valores más altos de este pH el potencial Z del

- virus BMV es negativo mientras que a valores menores al punto isoelectrico el virus BMV adquiere un potencial Z positivo..... 30
- Figura 11.** Distribución de tamaño de la enzima GALT a pH 7 estimado mediante DLS. De acuerdo a esta distribución se observa que en la muestra domina una población de partículas de 7.64nm en promedio..... 31
- Figura 12.** Distribución de tamaño del virus BMV a pH 7 estimado mediante DLS. De acuerdo a esta distribución de tamaño se observa que en la muestra domina una población de partículas de 29.8nm en promedio..... 32
- Figura 13. Ensayo de movilidad electroforética en gel de agarosa de los ensambles en microvolúmenes de reacción. Carril 1, proteína de cápside CP-libre. Carril 2, virus BMV. Carril 3, 4 y 5 ensambles GALT-BMV a 3:6, 3:9 y 3:12ug m:m de enzima GALT: proteína CP, respectivamente. Carril 6 enzima GALT-libre. La electroforesis fue corrida a pH 6. 35
- Figura 14.** Distribución de tamaño de las nanopartículas GALT-BMV sintetizadas por el método de autoensamble y purificadas por ultrafiltración. El diámetro hidrodinámico de las partículas GALT-BMV fue de (29.4±8.2)nm en promedio, el área bajo la curva de distribución corresponde con el 86.5% del volumen total de la muestra en la medición por DLS. 36
- Figura 15.** Electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida. Carril 1, corresponde al marcador de peso molecular (Bio-Rad 20-250KDa). Carril 2, 15uL de muestra del ensamble GALT-BMV. Carril 3-6, gradiente de concentración en masa de enzima GALT 1, 2, 4 y 9ug respectivamente. Carril 7-10, gradiente de concentración en masa de proteína de cápside CP 0.317, 0.634, 1.268 y 6.340ug respectivamente..... 38
- Figura 16.** Cinética enzimática de la enzima GALT-libre. Los puntos en azul corresponden a los datos experimentales cuantificados por HPLC y la línea azul corresponde a la regresión de Michaelis-Menten calculada en el software Curveexpert professional 2.6 5. 39
- Figura 17.** Cinética enzimática de los bionanorretores GALT-BMV. Los puntos en azul corresponden a los datos experimentales cuantificados por HPLC y la línea azul corresponde a la regresión de Michaelis-Menten calculada en el software Curveexpert professional 2.6 5. 40
- Figura 18.** Micrografía de virus nativo BMV, observada bajo microscopio electrónico de transmisión. El tamaño promedio de las partículas virales es de 28nm, T=3..... 41
- Figura 19.** Micrografía de los bionanorretores GALT-BMV purificados, observados bajo microscopio electrónico de transmisión. El tamaño promedio estimado de las partículas virales fue de 28 ± 8.2..... 42

Lista de tablas

- Tabla 1.** Con un equipo Zetasizer Nano ZS de Malver por DLS fue estimado el diámetro hidrodinámico de la enzima GALT, el virus BMV a diferentes valores de pH y las nanopartículas GALT-BMV sintetizadas y purificadas. 33
- Tabla 2.** Constantes catalíticas de la enzima GALT-libre y de las VLP's GALT-BMV..... 40

Capítulo 1. Introducción

La galactosemia es una enfermedad hereditaria y resulta en el error del metabolismo de la galactosa o vía de Leloir, **Figura 1**. La vía de Leloir es responsable en el organismo de la conversión de galactosa a glucosa y son tres enzimas involucradas en esta ruta metabólica: galactocinasa (GALK), galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT) y uridina difosfato galactosa 4-epimerasa (GALE). Dependiendo de la enzima que esté ausente o deficiente en el metabolismo de galactosa, existen diferentes tipos de galactosemia. Por ejemplo, la deficiencia de la enzima GALT produce galactosemia clásica y se debe a errores por mutaciones en el gen que codifica para GALT (Anderson, 2018; Berry, 2018; Holden, *et al.* 2003).

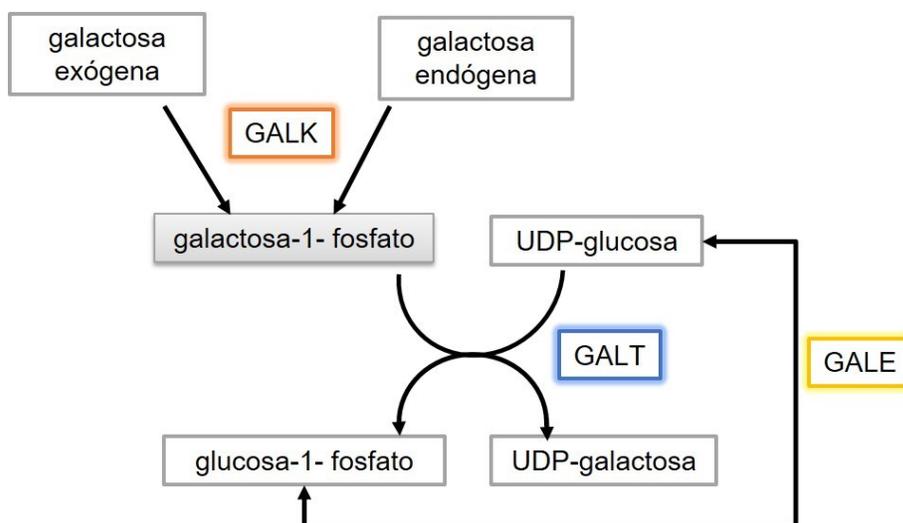


Figura 1. Ruta metabólica de la galactosa (Vía de Leloir).

La galactosemia clásica está relacionada con numerosos padecimientos, más de 300 mutaciones en GALT están asociadas a enfermedades (ARUP Laboratories; McCorvie *et al.*, 2016). Algunos de los trastornos relacionados con la acumulación de galactosa son: problemas neurológicos y motrices (Rubio-Agusti *et al.*, 2013; Waisbren *et al.*, 2012; Welling *et al.*, 2016), discapacidad intelectual (Broomfield, *et al* 2011), retraso en el crecimiento (Panis, *et al* 2007), cataratas a temprana edad, (Broomfield *et al.*, 2011), osteopenia y osteoporosis (Berry, 2018; Mayatepek, *et al* 2010; Welling, *et al* 2016), hipogonadismo

hipergonadotrópico (Broomfield, *et al.* 2011), fallo ovárico a largo plazo (Sanders *et al.*, 2009), hepatomegalia, cirrosis, fallo renal, entre otros, incluso en neonatos esta condición puede ser mortal (Anderson, 2018).

Al ser un trastorno genético hereditario la galactosemia clásica es una enfermedad que resulta difícil de atender ya que el error se encuentra codificado en todas las células de los pacientes y la expresión del gen de GALT está reportada en el Bio-proyecto PRJEB4337 para la mayoría de los tejidos y órganos del cuerpo (Fagerberg *et al.*, 2014). Hasta hoy en día el tratamiento se ha limitado a la exclusión estricta de los alimentos que contienen galactosa en la dieta. No obstante, esta restricción no es suficiente para garantizar la salud de los pacientes, ya que en el organismo también existe galactosa de manera endógena (Anderson, 2018; ARUP, n.d.; Tang, *et al.* 2012). Tang y cols. en 2012 para atender a los pacientes con galactosemia clásica propusieron una terapia innovadora que consiste en la inhibición de la vía de Leloir arriba a la reacción catalizada por GALT, pero esta propuesta no es suficiente para resolver por completo las consecuencias derivadas de esta enfermedad, porque se tienen que asumir los efectos secundarios del bloqueo de la ruta metabólica. Por lo tanto, se requiere de una estrategia que permita poner frente a la galactosemia clásica de una manera eficiente y sin generar daños colaterales. Una estrategia que resulta interesante, bajo este contexto, es la terapia por remplazo enzimático *in situ* de la actividad GALT.

La terapia por remplazo enzimático es un tratamiento médico que consiste en suministrar enzimas exógenas para remplazar la actividad de una enzima nativa que es deficiente o que está ausente en el organismo (Germain, 2017; NIH, 2019; Tang *et al.*, 2012). En la actualidad esta terapia ha sido ampliamente utilizada para atender diferentes trastornos metabólicos como: Síndrome de Hurler, Enfermedad de Fabry y de Gaucher así como la fenilcetonuria, por mencionar algunas (Arıkan-Ayyıldız *et al.*, 2011; Germain, 2017; Tang *et al.*, 2012).

En este sentido, la inmovilización de enzimas en cápsides virales o partículas tipo virus (VLP's) cobra gran relevancia en la producción de nanobiorreactores o bionanorretores para el acarreo *in situ* de actividad enzimática. Las VLP's ofrecen numerosas ventajas como bionanorretores para la terapia por remplazo enzimático gracias a que brindan protección al sitio activo de las enzimas, además son biocompatibles y biodegradables, además de que las VLP's se forman por autoensamble (Fiedler, Brown, Lau, & Finn, 2010; Jordan *et al.*, 2016; Sánchez *et al.*, 2015).

Por lo tanto, en este proyecto nos planteamos diseñar un sistema de bionanorreactores que sirva para poner frente a los padecimientos relacionados con la galactosemia clásica, reduciendo el surgimiento de posibles efectos colaterales. Desde el campo de la catálisis enzimática o biocatálisis en el grupo de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología nos propusimos realizar la síntesis de nanobiorreactores de partículas tipo virus con actividad enzimática GALT para el remplazo enzimático que puedan ser implementados en la terapia para la galactosemia clásica. El desarrollo de este proyecto consistió de tres etapas. En primer lugar, se realizó el diseño de los bionanorreactores, donde consideramos las propiedades electrostáticas que poseen la enzima GALT necesarias para el proceso de síntesis. La segunda etapa consistió en la síntesis de nanopartículas tipo virus, la cual se logró mediante la encapsidación de la enzima GALT por autoensamble en cápsides del virus BMV. Finalmente, realizamos la caracterización de actividad enzimática y estructural de los bionanorreactores.

Capítulo 2. Antecedentes

2.1. Deficiencia enzimática.

Los seres vivos realizan a cada instante miles reacciones bioquímicas necesarias para mantener el equilibrio y asegurar su subsistencia. Las enzimas son los catalizadores biológicos responsables de realizar todas las reacciones metabólicas en el organismo, su función es reducir la energía de activación para la transformación y síntesis de metabolitos. El acoplamiento de las reacciones enzimáticas involucradas en tareas comunes origina rutas metabólicas que se interconectan entre sí para armonizar los mecanismos biológicos y garantizar el equilibrio del organismo. Actuando de manera armonizada, las enzimas catalizan cientos de reacciones paso a paso para degradar nutrimentos, conservar y transformar energía, y sintetizar macromoléculas biológicas a partir de precursores simples. Las enzimas son fundamentales para todo proceso bioquímico (Nelson y Cox, 2017).

En la naturaleza existe un gran número de enzimas, que, al ser macromoléculas de origen biológico han estado sujetas a procesos evolutivos, y como resultado hoy en día existe una gran variedad que cataliza eficientemente distintas reacciones con alto grado de selectividad por los reactantes o sustratos (Cech y Bass, 1986). La alta especificidad de una enzima por sus sustratos implica que, la ausencia o deficiencia de alguna compromete severamente la homeostasis del organismo. Por lo tanto, los errores en el funcionamiento de las enzimas pueden provocar enfermedades graves.

El estudio de las enzimas tiene gran importancia en el campo de la medicina, ya que, algunas enfermedades, especialmente trastornos genéticos hereditarios, pueden producir deficiencia o incluso una ausencia total de una o más enzimas, mientras que otras enfermedades pueden ser causadas por la actividad excesiva de una enzima (Nelson y Cox, 2017).

Existen numerosos padecimientos relacionados a la deficiencia enzimática. Algunas de las enfermedades relacionadas con la deficiencia enzimática son: Enfermedad de Gaucher, debida errores en la enzima glicosilceramidasa ácida lisosomal y provoca hepatomegalia, anemia y complicaciones neurológicas (Arıkan-Ayyıldız et al., 2011); Hipofosfatasa por deficiencia de la enzima fosfatasa alcalina y afecta el desarrollo del hueso (Mornet, 2018); Enfermedad de Fabry, relacionando con la deficiencia de la enzima alfa-galactosidasa y puede afectar diferentes tejidos del cuerpo, entre ellos, el riñón, el corazón y la piel (Germain, 2017); así, como la galactosemia clásica, por mencionar algunas.

2.2. Galactosemia clásica

2.2.1. Incidencia y prevalencia

La galactosemia clásica es una condición genética anómala de origen hereditario que deriva en un amplio conjunto de síntomas y padecimientos que comprometen severamente la salud e integridad de los pacientes. En el mundo existe una incidencia de 1 de cada 60,000 nacimientos, aunque el reporte de incidencia varía de acuerdo a la zona geográfica, por ejemplo, en Europa ocurren 1 por cada 30,000 – 40,000 nacimientos, en Japón 1 cada millón y en los Estados Unidos 1 cada 53,000. Por otra parte, la prevalencia de esta enfermedad es de 1 por cada 48,000 habitantes (Berry, 2000; Demirbas, *et al.* 2018). La tasa de incidencia y prevalencia parece a grosso modo relativamente baja. No obstante, es tan representativa que, en la actualidad, existe una prueba clínica básica que se realiza en la mayoría de los hospitales del mundo a todos los neonatos, en el ensayo conocido como TAMIZ neonatal (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2017) ya que es de suma importancia detectar a tiempo esta condición para evitar intoxicación por acumulación de galactosa debido a la ingesta de leche materna, de hecho, se estima el 75% de mortalidad los lactantes que no son tratados (Kotb et al., 2018).

2.2.2. El gen y estructura de la enzima GALT

El gen que codifica para la enzima GALT, de nombre redundante GALT, está codificado en el cromosoma 9 y las mutaciones de este gen producen enzimas deficientes, provocando galactosemia clásica, que es un trastorno de carácter autosómico recesivo (Anderson, 2018). Este gen se expresa en una proteína de 379 residuos y masa molecular 43,363 Da.

La estructura tridimensional de la enzima GALT completa fue elucidada por difracción de rayos X en 2016 por McCorvie y cols. La enzima GALT (**Figura 2**) presenta estructura cuaternaria, resultando un homodímero, donde los monómeros están unidos por dos puentes salinos, entre la Asp113 de la cadena B con la Arg228 de la cadena A y la His114 de la cadena B con la Glu220 de la cadena A, respectivamente. GALT tiene como cofactor al Zn^{2+} ligado por uniones metálicas. El sitio activo de GALT se localiza en la histidina 186 de cada monómero (McCorvie et al., 2016).

De acuerdo con lo reportando en distintas bases de datos: Human Protein Atlas, Expression Atlas y Bgee, a la fecha, la expresión de GALT ocurre en casi todos los órganos del cuerpo, pero es más significativa la expresión en órganos como el intestino delgado, hígado, piel y bazo (NCBI, 2019). En el contexto celular, la enzima GALT se encuentra localizada en el citoplasma y en el aparato de Golgi (Uniprot, 2019).

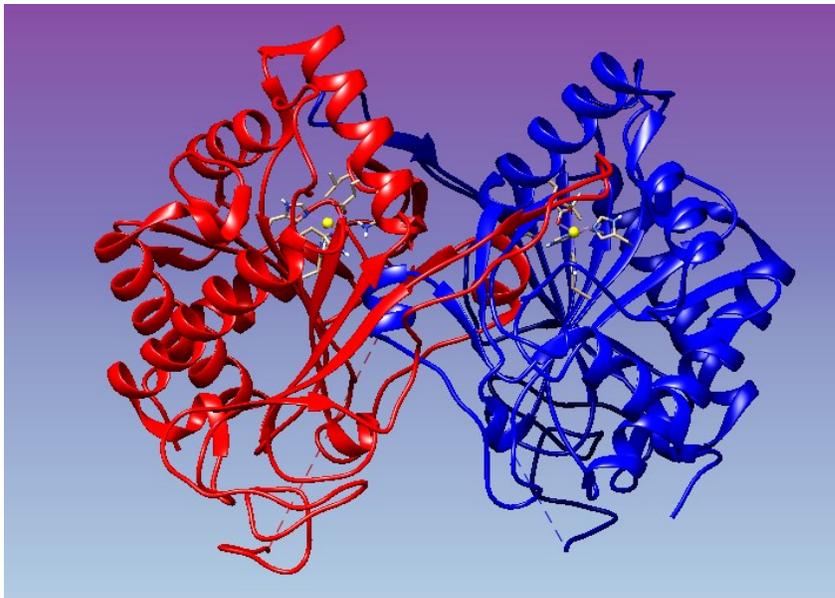


Figura 2. Representación tridimensional de la estructura de la enzima GALT humana. Se ilustra el homodímero de GALT, de color rojo la cadena A y de azul la cadena B. Los átomos del cofactor Zn^{2+} se ilustran de color amarillo.

2.2.3. La reacción de GALT

La enzima GALT utiliza como sustrato dos compuestos: La galactosa-1-fosfato (Gal-1-f) y la uridina difosfato glucosa (UDP-Glu), y la reacción que cataliza GALT es la transferencia del grupo fosfato de la Gal-1-f a la glucosa, y el grupo UDP de la UDP-Glu a la galactosa, resultando como productos uridina difosfato galactosa (UDP-Gal) y glucosa-1-fosfato (Glu-1-f), **Figura 3**. La UDP-Gal continúa su paso por la vía de Leloir para ser convertida en UDP-Glu por reacción reversible catalizada por la enzima GALE y de esta forma reintegrarse al ciclo en la ruta metabólica, mientras que la Glu-1-f es aprovechada por la célula como recurso energético (Holden et al., 2003; Tang et al., 2012).

Cuando la actividad de GALT es deficiente la Gal-1-F se acumula en las células y la galactosa es convertida a galactitol u oxidada a galactonato. La acumulación de estas sustancias en la sangre y en los tejidos desencadena varios síntomas que comprometen seriamente la salud de los pacientes (Varela-Lema et al., 2016).

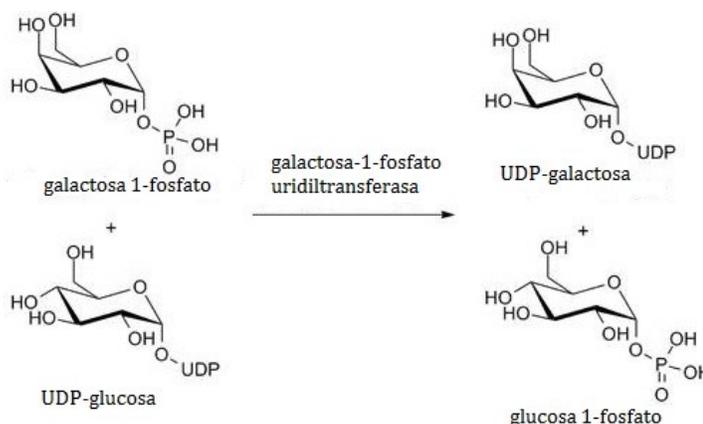


Figura 3. Reacción enzimática de la conversión de galactosa 1-fosfato (Gal-1-F) en glucosa 1-fosfato catalizada por la enzima GALT. Figura modificada de *Holden et al., 2003. Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway.*

2.3. Tratamiento de la galactosemia clásica

La principal fuente de galactosa en humanos es por la dieta, sobre todo por el consumo de productos que contienen lactosa, pero incluso otros alimentos que no son lácteos también pueden contener restos de galactosa. Por lo tanto, el tratamiento convencional para la galactosemia clásica consiste en minimizar la acumulación de galactosa en el organismo, excluyendo de la dieta los alimentos que la contienen. Sin embargo, en los humanos, la galactosa también se puede producir de forma endógena, principalmente a través de la conversión enzimática de GALE entre UDP-glucosa y UDP-galactosa, así como el recambio de glucoproteína y glucolípidos (Berry *et al.*, 1993; Berry *et al.*, 1995)

Los recién nacidos que padecen galactosemia clásica generalmente se enferman días después del nacimiento si se exponen a la leche materna o fórmula que contiene lactosa. Inicialmente, el bebé desarrolla ictericia, y si la exposición a la lactosa continúa, surgen otras complicaciones como insuficiencia hepática o sepsis por *Escherichia coli*, y finalmente la muerte (Tang et al., 2012).

A pesar de una dieta restringida en galactosa, la mayoría de los pacientes con galactosemia clásica continúan acumulando una cantidad significativa de galactosa, galactitol y gal-1P en sus células. Además, ha quedado claro que incluso con la detección temprana e intervención dietética, todavía existe una carga significativa de esta enfermedad debido a complicaciones crónicas que surgen en la infancia y la edad adulta. Las complicaciones más comunes son la dispraxia del habla, la ataxia y la insuficiencia ovárica prematura (Gitzelmann, 1995; Waisbren et al., 2012).

2.4. Terapia por remplazo enzimático

En la actualidad existen diferentes enfoques terapéuticos para atender los errores innatos del metabolismo, por ejemplo: trasplantes de órganos o tejidos, terapia génica y a nivel de RNA, terapia por remplazo enzimático y el control de concentraciones de moléculas pequeñas como la reducción del sustrato o evitar la producción de metabolitos (NIH, 2019; Tang et al., 2012).

Tang y cols. en 2012, propusieron una terapia innovadora para el tratamiento de la galactosemia clásica que consiste en bloquear la actividad de la enzima GALK para inhibir la producción de Gal-1-f y de esta manera reducir la acumulación de este monosacárido en el organismo disminuyendo las complicaciones debidas a la intoxicación por Gal-1-f. Los autores realizaron una investigación exhaustiva para encontrar pequeñas moléculas candidatas que puedan funcionar para inhibir actividad de GALK y con ello evitar la acumulación de Gal-1-f y sus efectos patógenos. No obstante, aún bajo la implementación de esta terapia que se plantea como un complemento a la terapia convencional, la deficiencia metabólica no queda remplazada, y más aún sé que tiene decidir entre cuál es el efecto menos nocivo, si la acumulación de Gal-1-f por deficiencias de la enzima GALT o la acumulación de α -D-galactosa por inhibición de la enzima GALK.

En este sentido la terapia por remplazo enzimático para la galactosemia clásica cobra gran relevancia como complemento del tratamiento convencional. No obstante, en la actualidad no existe algún registro o reporte sobre aplicaciones de este tipo de terapia con aplicaciones en la galactosemia clásica. Por otra parte, hoy en día, se están desarrollando sistemas de nanopartículas con actividad enzimática con aplicaciones para la terapia de remplazo enzimático. Las cápsides virales o por sus siglas en inglés Virus-

Like Particles (VLP's) son nanopartículas que presentan propiedades para contener enzimas en su interior hueco y mantener la actividad catalítica de las enzimas. Por lo tanto, las VLP's son altamente potenciales como nanovehículo para el acarreo de enzimas en la terapia por remplazo enzimático. Incluso las VLP's

son biocompatibles, biodegradables y presentan un bajo efecto inmunogénico en el cuerpo (Escobedo Rodríguez, 2018; Sánchez et al., 2015).

2.5. Nanobiorreactores enzimáticos tipo VLP

Las VLP's pueden ser aprovechadas para la producción de nanorreactores enzimáticos mediante el confinamiento de enzimas activas. Los nanorreactores enzimáticos basados en VLP's pueden ayudar a la prospección de propiedades catalíticas no elucidadas (Comellas-Aragonès *et al.*, 2007), de hecho, se han reportado bionanorreactores con propiedades y capacidades catalíticas diferentes a las que tienen las enzimas sin encapsular (Sánchez Sánchez, 2014).

Las VLP's pueden albergar los sitios catalíticos activos y controlar el acceso de reactivos y productos, lo que significa reacciones catalíticas mucho más estables (Jordan *et al.*, 2016). En este tipo de nanobiorreactor, las enzimas quedan protegidas frente a la degradación de proteasas (Fiedler et al., 2010; O'Neil et al, 2013), así como, ante el reconocimiento por el sistema inmune (Inoue et al., 2008).

Se han identificado más de 100 VLPs originarias de microorganismos, plantas, insectos y mamíferos, derivados de 35 familias diferentes de virus. Estas estructuras conservan propiedades estructurales como la envoltura, estructura esférica o filamentosa (Escobedo Rodríguez, 2018).

2.6. Cápsides virales o VLP's

Las cápsides virales o VLP's son partículas que mimetizan la estructura de un virus natural (Ding et al., 2018). Son básicamente cápsides virales huecas, sin material genómico del virus, es decir, sin potencial infeccioso (Tapia Moreno, 2015). Presentan arquitecturas altamente ordenadas de dimensiones nanométricas que tienen la capacidad de autoensamblarse (Sánchez Sánchez, 2014). La cápside está constituida por proteínas estructurales que interactúan entre sí para formar subunidades proteicas llamadas capsómeros que se unen para conformar la cápside (Hernández Meza, 2017). En la naturaleza, de acuerdo con su geometría se conocen tres formas de cápsides virales: los icosaédricos, los helicoidales y los bacteriófagos. La mayoría de las VLP generalmente tienen simetría de cápside icosaédrica o helicoidal (Schoonen y Van Hest, 2014). Algunas VLP's presentan polimorfismo estructural dependiendo de las

condiciones de pH, fuerza iónica y concentración de iones divalentes en las que se encuentra (Sánchez Sánchez, 2014).

2.6.1 Compartimentalización de las VLP's y moléculas cargo

La capacidad de compartimentalizar diferentes moléculas cargadas de las VLP's ha revolucionado la carga, acarreo y liberación controlada de moléculas, útil para diversas aplicaciones en nanotecnología, biotecnología y medicina (Ding et al., 2018). La estructura de las VLP's tiene cuatro fases disponibles, **Figura 4**, para ser aprovechadas dependiendo de la aplicación: el interior hueco, la superficie interna, la superficie externa y la interface entre las subunidades proteicas que conforman la cápside, (Douglas & Young, 2006).

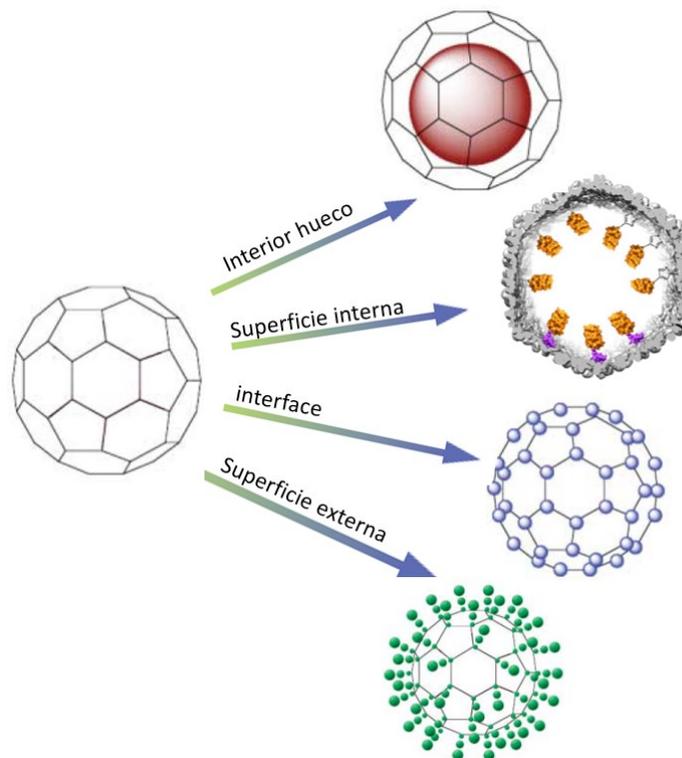


Figura 4. Compartimientos disponibles en VLP's para cargar moléculas de interés. Figura modificada de Douglas y Young, 2006. *Viruses: Making Friends with Old Foes*.

Inicialmente las VLP's fueron diseñadas para ser usadas como vacunas en humanos, aplicación que sigue siendo la más común (Ding et al., 2018). Actualmente se han utilizado para encapsular diversos materiales como metales (Hooker et al., 2007), medicamentos (Ren et al., 2007), DNA (Verma y Weitzman, 2005) y proteínas (Lipin et al., 2008) con el fin de generar nuevos materiales, catalizadores y sistemas de suministros, incluso algunas VLP's también exhiben propiedades eléctricas, que pueden usarse para la generación de energía (Lee et al., 2012).

Las VLPs tienen la capacidad de contener ácidos nucleicos u otras moléculas pequeñas, por lo que pueden actuar como vehículos de entrega para células, tejidos u órganos específicos. El principal mecanismo de entrega e introducción a la célula es el de endocitosis mediada por receptores. Durante este proceso, la célula engulle moléculas a través de la membrana plasmática, junto con el fluido extracelular y lo invagina en vesículas que circulan dentro de la célula. Las VLPs pueden liberarse de estas vesículas antes de que sean degradadas en lisosomas y como carecen de material genético, no hay riesgo de una infección viral (Escobedo Rodríguez, 2018; Zdanowicz & Chroboczek, 2016).

2.6.2. Producción y ventajas de las VLP's

En general las VLP's se pueden obtener aislando las proteínas de cápside del virus nativo a partir de plantas infectadas con el virus (Cadena-Nava et al., 2012), o por recombinación genética (Sánchez Sánchez, 2014).

Las VLP's ofrecen varias ventajas clave: estructura perfectamente definida, estabilidad, amplia variedad de tamaños y formas, alta capacidad de carga, autoensamble homogéneo, biocompatibilidad, baja toxicidad que pueden utilizarse convenientemente para diversos fines (inmunogenicidad), pueden ser modificadas y funcionalizadas con diferentes ligandos (Schoonen y Van Hest, 2014) y debido a su carácter proteico las VLP's también son biodegradables (Ding et al., 2018; Sánchez Sánchez, 2014). Su alcance tecnológico no solo se refleja en el desarrollo de vacunas, sino también en la entrega controlada de fármacos, imagenología, materiales, biocatálisis y nanodispositivos electrónicos (Ding et al., 2018).

En el contexto de la biomedicina, Sánchez y col. (2014) transfectaron células cancerosas de la línea celular HeLa utilizando el método de lipofección para probar la actividad CYP de los nanorreactores dentro de las células cancerosas y el uso potencial en la terapia del cáncer. Evaluaron la actividad catalítica de los nanorreactores en el citoplasma de las células usando MCF, utilizaron el sustrato 7-benciloxi-4-trifluorometilcumarina (no fluorescente), cargado dentro de la cápside, que al ser metabolizado por la CYP

es convertido en 7-hidroxi-4-trifluorometilcumarina, que es un compuesto fluorescente fácilmente detectable. La intensidad de fluorescencia de las células tratadas con las nanopartículas fue significativamente mayor en comparación con las observadas a partir de las células HeLa no tratadas. El efecto fluorescente se localizó claramente en la región citoplásmica tal como se esperaba. Finalmente Sánchez y col. concluyen que los nanobiorreactores con actividad CYP puede emplearse para la terapia del cáncer al activar pro-fármacos anticancerígenos en sus metabolitos activos (Sánchez et al., 2015; Tapia Moreno, 2015). Estas evidencias manifiestan el gran potencial de los nanobiorreactores con actividad enzimática para aplicaciones en terapia en el campo de la biomedicina.

2.7. EL BMV

El virus del mosaico del bromo (BMV, por sus siglas en inglés), es un virus que infecta naturalmente a gramíneas. El BMV está conformado por una cápside constituida por 180 copias idénticas de subunidades de proteína de cápside (CP) de masa molecular 20,835Da, **Figura 5**. El N-terminal altamente positivo de cada una de estas proteínas queda expuesto hacia el interior, de manera que la unión entre el virus y su material genético se favorece electrostáticamente. La cápside del BMV tiene la capacidad de ser sometida a transiciones estructurales para encapsular moléculas pequeñas de manera controlada y reversible. A pH 7.5 o mayor y una fuerza iónica igual o mayor a 0.5 M, la cápside se disocia en dímeros. Después de reestablecer un pH y fuerza iónica bajos se puede llevar a cabo su reensamble. Este método se ha utilizado para encapsular moléculas aniónicas. También se ha demostrado que este proceso es dependiente de pH, fuerza iónica y temperatura. El BMV mide en promedio 28 nanómetros y tiene un número de triangulación $T=3$ y simetría icosaédrica. El número de triangulación representa el tamaño y la complejidad de las proteínas de la cápside de los virus de simetría icosaédrica. Un icosaedro convencional puede ser generado a partir de una red plana hexagonal, cuyos nodos hexagonales (hexámeros) definidos en puntos específicos de la red, son convertidos en nodos pentagonales (pentámeros) que otorgan curvatura a la estructura, la cual termina siendo formada por 12 vértices pentagonales y 60 subunidades idénticas (Bancroft, 1970; Escobedo Rodríguez, 2018; Lucas et al., 2001; Lucas et al., 2002).

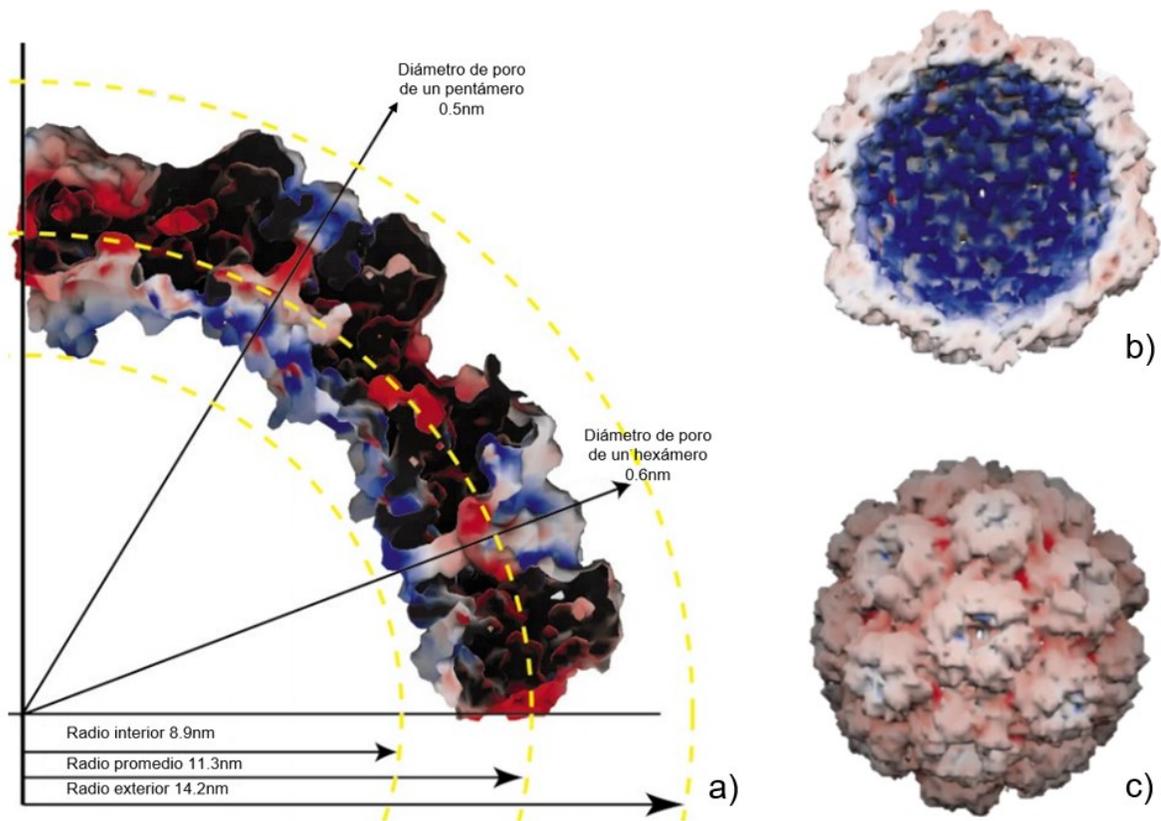


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de una cápside del virus BMV T=3. a) Cuadrante de la sección transversal de una cápside vacía del BMV con radio exterior 14.2nm. b) Perspectiva del interior hueco de las VLP's del BMV, el color azul indica la densidad de cargas electrostáticas positivas. c) Perspectiva de la superficie exterior de la cápside del BMV, se distingue una tonalidad mas rojacea, que indica una mayor distribución de cargas positivas sobre la superficie del virus. Figura modificada de *Lucas et al. (2002) The crystallographic structure of brome mosaic virus.*

Capítulo 3. Justificación, hipótesis y objetivos.

3.1. Justificación

Uno de los grandes retos que se plantean en el campo de la biomedicina, es poner frente a las enfermedades debidas a errores metabólicos por deficiencia enzimática. La galactosemia clásica es un ejemplo de este tipo de padecimientos y es una patología grave que incluso en neonatos puede llegar a ser fatal. Algunos grupos de investigación han realizado esfuerzos por desarrollar un sistema que sirva para atender esta enfermedad. No obstante, la terapia se sigue remitiendo al tratamiento convencional. Por lo tanto, en este proyecto nos propusimos sintetizar nanaopartículas tipo virus con actividad enzimática GALT con el potencial de ser usados en el cuerpo humano para la terapia de galactosemia clásica.

3.2. Hipótesis

La enzima GALT contenida dentro de cápsides virales tendrá actividad catalítica.

La inmovilización de enzimas dentro de cápsides virales ha mostrado ser un efectivo sistema para la producción de bionanorreactores. Por lo tanto, si confinamos la enzima GALT dentro de cápsides del virus BMV; entonces, esperamos que las partículas producidas tendrán actividad catalítica.

3.3. Objetivos

3.3.1. General

Sintetizar bionanorreactores con actividad enzimática galactosa-1-fosfato uridiltransferasa para la terapia de la galactosemia clásica.

3.3.2. Específicos

- Obtener la enzima galactosa-1-fosfato uridiltransferasa y cápsides del virus del mosaico del bromo.
- Producir nanopartículas con actividad enzimática confinando la enzima GALT en cápsides del virus BMV.
- Mostrar actividad catalítica de las nanopartículas producidas
- Caracterizar los bionanorreactores GALT-BMV.

Capítulo 4. Metodología

El objetivo de este proyecto fue logrado utilizando el método de encapsidación por autoensamble descrito por Cadena y colaboradores en 2009.

La enzima GALT fue adquirida en Sigma Aldrich (No. de catálogo G4256). El liofilizado de la enzima GALT fue disuelto en solución amortiguadora de almacenamiento (Fosfato de potasio 100mM, 15% de glicerol a pH 8) a una concentración de 1.08 mg/mL que fue determinada por el ensayo de Bradford utilizando una curva estándar de concentraciones conocidas de albumina de suero bovino. La solución de GALT fue almacenada a -80°C hasta su utilización.

Las partículas virales o viriones del BMV fueron proporcionadas por el Doctor Rubén Dario Cadena Nava del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Estas partículas fueron utilizadas para infectar plantas de cebada y producir suficiente virus BMV para la purificación de proteína de cápside CP-BMV necesaria para la síntesis de los bionanorreactores.

El proceso de producción de los bionanorreactores consistió de tres etapas: diseño, síntesis y caracterización.

4.1. Diseño de bionanorreactores GALT-BMV

Las fuerzas electroestáticas que ocurren entre las biomoléculas durante el autoensamble son la principal interacción intermolecular en la formación de cápsides virales. Por lo tanto, en el diseño de bionanorreactores de partícula tipo virus (VLP's) fue indispensable considerar las propiedades electrostáticas de la superficie de las moléculas (catalizadores) que se pretenden encapsidar, y de esta manera, predecir las posibles interacciones entre las moléculas cargo (enzimas) y las proteínas de cápside para la formación de VLP's.

4.1.1. Análisis *in silico* de las propiedades electrostáticas de la enzima GALT y los capsómeros de virus BMV.

Fue realizado un análisis *in silico* utilizando el software Maestro de Schrödinger® (versión 2019-1) para conocer la distribución superficial de carga eléctrica de la enzima GALT y de la proteína de cápside del virus BMV. Maestro contiene una paquetería que utiliza como modelo teórico a el potencial electrostático de Poisson-Boltzmann para calcular la distribución superficial de carga eléctrica de biomoléculas como proteínas o material genético. Este software ejecuta los cálculos procesando información de un archivo .pdb que contiene las coordenadas espaciales, tipo y carga eléctrica de los átomos que integran la biomolécula.

4.1.2. Perfil del potencial Z de la enzima GALT y de la proteína de cápside BMV

El potencial Z de una partícula en solución describe el potencial eléctrico en la interfaz de una partícula y el medio líquido en el cual se encuentra disuelta y está en función del pH de la solución. Como las interacciones electrostáticas son el principio fundamental por el cual se espera la formación de las nanopartículas tipo virus; fue necesario realizar un perfil del potencial Z de la enzima GALT y de la proteína de capa CP-BMV en el rango de pH de las distintas soluciones amortiguadoras usadas durante el proceso de ensamble.

Fueron preparadas soluciones salinas amortiguadoras de fosfatos (PBS) a diferentes valores de pH (4,5,6,7, y 8) para medir el potencial Z de la enzima GALT, la proteína CP y del virus BMV. Para la enzima GALT se prepararon muestras de PBS a una concentración 2.49uM en los diferentes valores de pH. En el caso de la proteína CP la concentración fue de 62.2mM y del virus BMV 40ug/mL, respectivamente para cada valor de pH. Estas muestras fueron llevadas a un equipo ZetaSizer Nano SZ de Malvern, el cual tiene acoplado un PLS para cuantificar el potencial Z.

4.1.3. Radio hidrodinámico de la enzima GALT por Dispersión Dinámica de Luz

El fenómeno de dispersión de luz ocurre cuando un campo electromagnético interactúa con un medio espacialmente heterogéneo en índice de refracción y la radiación es dispersada en todas direcciones. En

una suspensión coloidal las partículas se encuentran suspendidas en continuo movimiento browniano haciendo fluctuar el índice de refracción de las vecindades locales a las partículas en el fluido. Entonces, cuando se incide un haz colimado sobre una suspensión coloidal la radiación dispersada por el coloide se interfiere constructiva o destructivamente generándose un patrón de interferencia por el desfase de los rayos dispersados de las moléculas adyacentes. Este patrón de interferencia varía con el tiempo debido al constante movimiento browniano de las partículas en el coloide.

La dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) es un método que estudia la autocorrelación en el tiempo de la intensidad de luz dispersada y proporciona información del movimiento traslacional de las partículas. La fluctuación de intensidad dispersada se detecta con sensores especiales y es procesada con un correlacionador digital. La relación entre la intensidad incidente y la dispersada depende de factores tales como el tamaño, masa molecular, concentración, polarización y la longitud de onda incidente. Por lo tanto, con las técnicas de Dispersión Dinámica de Luz (DSL) se pueden obtener propiedades termodinámicas de las partículas disueltas en suspensión coloidal como lo es el radio hidrodinámico, que es el radio de una esfera dura que tiene la misma difusión trasnacional que el objeto de dispersión (partícula coloidal) en el fluido.

Fue estimado el radio hidrodinámico de la enzima GALT mediante la técnica de dispersión dinámica de luz DLS Para tener una referencia del número de enzimas que puede ser contenidas en una cápside del tamaño del virus nativo BMV y de esta forma calcular la relación molar de la enzima GALT con respecto a la proteína de cápside del BMV más apropiada para los ensayos de autoensamble. Se utilizó un equipo ZetaSizer Nano SZ de Malvern.

Suponiendo una geometría esférica de GALT de radio igual al radio hidrodinámico estimado y considerando el 75% de volumen interior hueco de las cápsides de BMV, fue calculado el número de enzimas que podrían albergarse dentro de cada cápsides del BMV en función del volumen.

4.2. Síntesis de bionanorreactores GALT-BMV

Después de realizar el análisis *in silico* y experimental de las propiedades eléctricas de la enzima GALT para diseñar la reacción de autoensamble con las condiciones óptimas se prosiguió con la síntesis de las nanopartículas BMV-GALT.

4.2.1. Producción y purificación de la proteína de la cápside CP del BMV

La proteína de cápside del BMV fue obtenida por desensamble del virus nativo. Por lo tanto, fue necesario cultivar plantas de cebada e infectarlas con virus BMV para poder extraer a partir de las hojas infectadas el virus BMV y a partir de los viriones obtener y purificar la proteína de cápside CP-BMV.

4.2.2. Infección de plantas de cebada y cosecha de hojas

La producción del virus BMV fue realizada infectando plantas de *Hordeum vulgare* (cebada, por su nombre común). Fueron cultivadas plantas de cebada en condiciones controladas. Primero se sembraron semillas y posterior a su germinación, dos semanas después, cuando los primordios foliares se encontraban en pleno desarrollo, las plantas fueron expuestas al virus. Con una fina fibra metálica se erosionó suavemente la superficie adaxial de las hojas y sobre el área erosionada se colocaron unas gotas de suspensión de virus nativo BMV a una concentración de 0.1ug/uL. Se dejó incubar el virus en las plantas hasta que las hojas de las plantas mostraron los síntomas típicos de infección, los cuales consisten en la aparición de un patrón de clorosis, es decir manchas amarillas en las hojas. El patrón de clorosis en las hojas de cebada es la aparición de líneas amarillentas paralelas a la vena media a lo largo de la lámina foliar. Cuando la clorosis fue suficientemente evidente para considerar una infección efectiva (**Figura 6.a**), las hojas de cebada fueron cosechadas y almacenadas a -80°C hasta su utilización para la extracción de virus.

4.2.3. Extracción y purificación del virus BMV

Las hojas infectadas almacenadas a -80°C fueron descongeladas hasta alcanzar la temperatura ambiente, después fueron triturados en una licuadora 80g de hojas con solución amortiguadora de extracción virus (acetato de sodio 0.5M, acetato de magnesio 80mM, pH 4.5 ajustado con ácido acético) suficiente para lograr un macerado consistente. Este macerado fue filtrado con una gasa ejerciendo presión para obtener un buen rendimiento de extracto (**Figura 6.b**). EL filtrado fue mezclado 1:1 %Vol. con diclorometano. La mezcla fue centrifugada a 15,000 rpm por 15 min a 4°C. Tras la centrifugación la mezcla se separó en dos fases (**Figura 6.1.c**), la fase superior (de color amarillo claro) fue recuperada y la fase inferior (de color café oscuro) fue descartada. La fase recuperada fue centrifugada nuevamente bajo las mismas condiciones para eliminar residuos de la fase oscura. El sobrenadante final (**Figura 6.d**), que contiene el extracto de

virus, fue colocado en agitación por 12 horas a 4°C para eliminar los residuos de diclorometano. A partir de este extracto se realizó el aislamiento y purificación de las partículas virales.

Las partículas virales fueron aisladas del extracto final por ultracentrifugación utilizando un colchón de sacarosa. Para esto, se prepararon tubos de ultracentrifuga que contenían en el fondo una solución de sacarosa al 10% (m:v) que correspondía al 13% de la capacidad máxima de los tubos. Sobre la solución de sacarosa se vertió el extracto final hasta aforar los tubos al volumen máximo (**Figura 6.e**). Los tubos fueron centrifugados a 32,000 rpm por dos horas a 4°C. Con la centrifugación se formó un pellet que fue recuperado descartando el sobrenadante. Los pellets, que contenían a los viriones, fueron resuspendidos en 150uL de solución amortiguadora de suspensión de virus (acetato de sodio 50mM, acetato de magnesio 8mM, ajustado a pH 4.5 con ácido acético). Esta suspensión fue almacenada a 4°C hasta su utilización para la purificación de virus.

Los viriones fueron purificados a partir de la suspensión de virus por ultracentrifugación utilizando un gradiente de densidad de sacarosa. Previamente se prepararon tubos de ultracentrifuga con un gradiente de densidad de sacarosa. Los tubos fueron preparados agregando 25mL de una solución de sacarosa al 25% (m:v) y se colocaron a -80°C por una hora, después los tubos se dejaron a temperatura ambiente hasta descongelarse. Nuevamente, los tubos fueron llevados a -80°C una hora más y descongelados a temperatura ambiente. Una vez descongelados los tubos fueron almacenados a 4°C. La suspensión de virus fue colocada cuidadosamente sobre los gradientes de sacarosa y los tubos fueron centrifugados a 32,000 rpm por dos horas a 4°C. Al finalizar la centrifugación los tubos fueron observados en un cuarto oscuro, iluminando el tubo con una linterna blanca desde la parte inferior. En medio de la columna de los tubos se apreciaba una clara banda azul (**Figura 6.f**) que fue recuperada utilizando una pipeta Pasteur de vidrio. La fase azul colectada fue mezclada con solución amortiguadora de virus para diluir la concentración de sacarosa y por centrifugación eliminar el exceso de ésta. La mezcla con virus fue centrifugada a 34,000 rpm por 3 horas a 4°C. Tras la centrifugación se formó un pellet, que fue recuperado, descartando el sobrenadante. Cada pellet fue resuspendido en 200uL de solución de suspensión de virus. Finalmente se mezclaron todas las muestras de suspensión de virus.

La concentración y pureza de virus en la muestra final fue determinada según el valor de la absorbancia a 280 y 260nm, medida en un espectrofotómetro UV-Vis. El rendimiento de la purificación fue calculado a partir de la masa total de virus obtenida. La muestra final de virus fue almacenada a -80°C hasta su utilización.

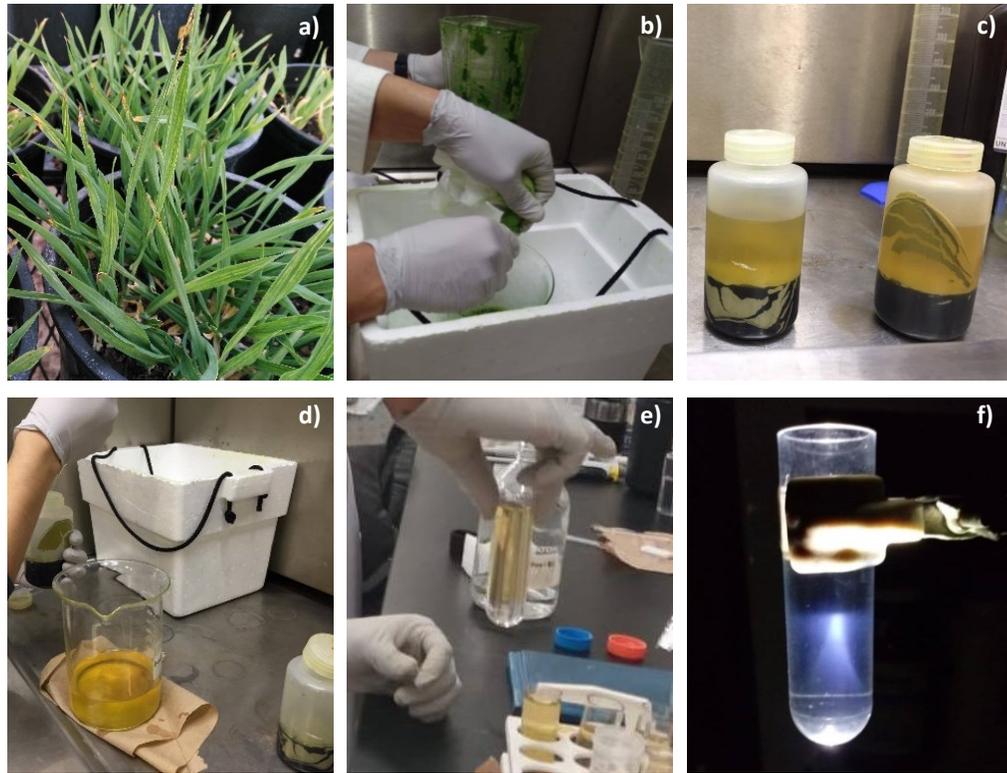


Figura 6. Proceso de producción y purificación del virus nativo BMV. a) Infección de plantas de cebada, se observa un patrón de clorosis en líneas paralelas a la vena media de las hojas. b) Extracción de virus a partir de un triturado de hojas infectadas. c) Separación en dos fases por centrifugación del macerado. d) extracto final recuperado de la fase superior (amarilla) después de la centrifugación. e) Colchón de sacarosa para el aislamiento de virus a partir del extracto final de virus. f) Purificación del virus BMV por gradiente de sacarosa.

4.2.4. Purificación de la proteína CP-BMV

La proteína de cápside del virus BMV necesaria para la síntesis de los bionanorretores fue obtenida por el desensamble de los viriones producidos y purificada por ultracentrifugación. Se colocó una muestra de 4mg de virus BMV dentro de una membrana de diálisis de 14,000Da y esta muestra fue dializada ante una solución amortiguadora de desensamble (cloruro de calcio 0.5M, ácido etilendiaminotetraacético 1mM, dithiothreitol 1mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0.5mM, tris 50mM a pH 7.5) por 24 horas en agitación y a 4°C. Después de la diálisis la muestra de proteína fue centrifugada a 50,000 rpm durante 8:30 horas a 4°C. El sobrenadante fue recuperado tomando alícuotas de 500uL desde la fase superior hasta llegar al fondo del tubo de centrifuga y teniendo cuidado de no resuspender el pellet. Se midió la concentración de proteína en cada muestra con la lectura de la absorbancia a 280nm y la pureza con el cociente de la absorbancia a 280/260nm.

Las muestras seleccionadas como óptimas fueron mezcladas y dializadas en membrana de 14,000Da frente a una solución amortiguadora de proteínas (cloruro de sodio 0.5M, tris 20mM a pH 7.2) por 12 horas a 4°C. La concentración y pureza de la proteína recuperada fue determinada midiendo la absorbancia a 280 y 280/260nm. La solución final de proteína fue esterilizada por filtración con membrana de acetato de celulosa de 0.22um y almacenada a 4°C hasta su utilización. La proteína utilizada para el ensamble de los bionanorreactores no excedía más de dos semanas a partir de la purificación.

4.2.5. Ensamblados de prueba GALT-BMV en microvolúmenes de reacción

La proporción óptima de enzima GALT con respecto a la de proteína de cápside CP-BMV para el autoensamble fue determinada realizando un ensayo de ensamblados a diferentes razones de enzima GALT con proteína de cápside en microvolúmenes de reacción. Cada muestra de reacción de ensamble contenía la misma cantidad de enzima GALT (3ug) mientras que la cantidad de masa de proteína de cápside fue diferente para cada reacción (6,9, y 12ug). Las muestras de reacción fueron aforadas a un volumen final de 50uL con solución amortiguadora de proteínas y llevadas a diálisis en membrana de 14,000Da contra una solución amortiguadora de ensamble (cloruro de sodio 20mM, cloruro de potasio 10mM, cloruro de magnesio 5mM, tris pH 7.2) por 12 horas a 4°C. Posterior a este periodo, las muestras fueron cambiadas a diálisis en solución amortiguadora de acidificación (acetato de sodio 50mM, acetato de magnesio 8mM, pH 6) por 6 horas a 4°C. Al terminar el periodo de acidificación las muestras fueron nuevamente dializadas en solución amortiguadora de ensamble por 6 horas a 4°C. Al finalizar el último periodo de reacción las muestras fueron almacenadas a 4°C.

4.2.6. Ensayo de movilidad electroforética de los ensamblados de prueba en gel de agarosa

El ensayo de movilidad electroforética en gel de agarosa consiste en someter en un campo eléctrico polarizado moléculas inmersas en una matriz de agarosa polimerizada. Bajo la influencia del campo eléctrico y dependiendo de la naturaleza eléctrica de moléculas estas se desplazan en el gel de agarosa hacia el cátodo o ánodo. Las muestras prueba de reacción de ensamble fueron sometidas a un ensayo de movilidad electroforética en gel de agarosa para verificar el éxito del ensamble comparando los resultados con la movilidad del virus nativo, de la proteína de cápside CP-BMV, así como de la enzima GALT libre.

Se preparó un gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora de movilidad electroforética (acetato de sodio 10mM, ácido etilendiaminotetraacético 1mM, a pH 6 ajustado con ácido acético). En cada pozo del gel se sembraron 20uL de muestra de ensamble mezcladas con 5uL de glicerol al 100%, más un control positivo del virus BMV (4ug), de proteína GALT-libre (3ug) y de proteína CP-BMV-libre (3ug). Se indujo un campo eléctrico de 50mV y se dejó correr la electroforesis por 3 horas a 4°C.

4.2.7. Ensamble final GALT-BMV

Con base en los resultados obtenidos en el ensayo de movilidad electroforética de las reacciones de ensamble en microvolúmenes se decidió utilizar la razón 3:12ug enzima GALT: proteína de cápside CP para realizar una reacción de ensamble a mayor escala y producir suficiente cantidad de nanopartículas para los ensayos de caracterización.

Fue preparado un volumen total reacción de ensamble de dos mililitros, la reacción contenía 120ug de la enzima GALT y 480ug de la proteína, aforado con solución amortiguadora de proteínas. La mezcla de reacción se dializo en membrana de 14,000Da frente a solución amortiguadora de ensamble por 12 horas. Después de este periodo la muestra de reacción se cambió a diálisis en solución de acidificación por 6 horas y finalmente se colocó la muestra en diálisis ante solución amortiguadora de ensamble 6 horas más. Todos los periodos de reacción de ensamble se realizaron a 4°C.

4.2.8. Purificación de las nanopartículas GALT-BMV.

Las nanopartículas GALT-BMV producidas fueron llevadas a purificación por ultrafiltración para eliminar el excedente de enzima no hayan quedado confinada durante el ensamble, así como los restos de proteína de cápside CP que no formaron parte de cápsides.

Al finalizar el proceso de ensamble el volumen total de la reacción fue centrifugado en tubos Amicon de ultrafiltración con membrana de 100kDa por 30min, 14,000g a 4°C. La muestra final de nanopartículas fue recuperada colocando de forma invertida la columna de filtración en tubos de colecta y estos fueron

centrifugados por 3min a 1,000xg a 4°C. Las nanopartículas purificadas fueron almacenadas a 4°C hasta su utilización.

4.2.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Fue realizado un ensayo de electroforesis de proteínas desnaturalizadas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para verificar el éxito de encapsidación de la enzima GALT y determinar la concentración de la enzima GALT y de proteína CP en la muestra final de ensamble. Fue preparado un gel de poliacrilamida al 12% con dodecilsulfato sódico. En los pozos del gel se cargaron: 15 uL de muestra del ensamble purificado, cuatro concentraciones diferentes de enzima GALT (1, 2, 4 y 9ug) y cuatro de proteína de cápside (0.317, 0.634, 1.268 y 6.340ug), así como un pozo con 10uL de marcador de masa molecular. La electroforesis fue corrida primero 20 min a 100V y después de este tiempo el voltaje se incrementó a 200V por 40 min más.

Después de la electroforesis el gel fue teñido con Histan-Blue, este colorante tiñe las bandas de proteína de color azul en el gel. La imagen del gel fue capturada con un fotodocumentador (Eva) y posteriormente esta imagen fue procesada con el programa ImageJ para medir la intensidad de las bandas. Finalmente, fue realizada una curva de estandarización de intensidad de las bandas en función de la concentración de enzima GALT o proteína CP respectivamente. La concentración de enzima GALT y la proteína CP en la muestra del ensamble fue determinada a partir de estas curvas estándar de concentración conocida de GALT y proteína CP.

4.3. Caracterización de os bionanorreactores

4.3.1 Actividad catalítica de las nanopartículas medida por HPLC

Fue realizado un ensayo de actividad catalítica GALT para describir la cinética enzimática y las constantes catalíticas de las nanopartículas producidas tomando como referencia el protocolo descrito por Lindhout y colaboradores en 2010. Este protocolo utiliza la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificar la cantidad de producto obtenido después la reacción.

La técnica de HPLC se utiliza para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y una columna cromatográfica. La cromatografía líquida consiste de dos fases, la fase móvil y la fase estacionaria. En la cromatografía la muestra a analizar es mezclada en pequeñas cantidades con la fase móvil (eluyente) y cuando esta pasa por la fase estacionaria, los analitos se retrasan diferencialmente en la columna por interacciones con la fase estacionaria. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza de cada compuesto, de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y es una característica distintiva de cada compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. A medida que los diferentes compuestos de la mezcla eluyen de la columna, estos son identificados y cuantificados por un detector, por ejemplo, de absorbancia UV-Vis.

Para el ensayo de actividad enzimática fueron preparadas reacciones en microtubos que contenían Tris-HCL 40mM a pH 7.0, dithiothreitol 40uM, galactosa-1-fosfato 6mM y una cantidad diferente de glucosa-diuridil-fosfato (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.5 mM) en un volumen final de reacción de 100uL. La concentración de GALT en el ensayo con la enzima libre fue de 2.49×10^{-5} mM y en las reacciones con las VLP's GALT-BMV de $1.752.49 \times 10^{-4}$ mM. El ultimo componente en agregarse a las reacciones fue la enzima GALT o la muestra con las nanopartículas GALT-BMV respectivamente. Inéditamente después de agregar el ultimo reactivo las muestras fueron incubas por 15 min a 37°C, para finalizar la reacción fueron agregados 150uL de ácido perclórico al 3.3% helado, se incubo por 10 min las muestras de reacción a 4°C y posteriormente se centrifugaron a 11,000xg por 7 min a 4°C. El sobrenadante fue recuperado por inversión en microtubos nuevos. Para neutralizar la reacción se agregaron a las muestras 8uL de carbonato de potasio 5M helado y se incubaron por 10 min, después de este periodo, las muestras fueron centrifugadas a 11,000xg por 7 min a 4°C. Finalmente se recuperaron 200uL del sobrenadante, este volumen fue mezclado con 200uL de solución amortiguadora A de la fase móvil (fosfato de amonio 50mM pH 7.0 con 4uM de bisulfito tetrabutilamonio, filtrado con membrana 0.2um de nylon).

El producto formado en las reacciones durante los ensayos de actividad enzimática GALT fue cuantificado con un equipo HPLC (modelo, serie). La separación de compuestos en la reacción fue lograda utilizando un gradiente de solución amortiguadora A de la fase móvil con solución B (metanol 100%) siguiendo el protocolo: de 0-19min 99:1% solución A: solución B; de 20-24 75:25% solución A: solución B; de 25-29 min 50:50% solución A: solución B y finalmente de 30-45 min 99:1% solución A: solución B, el tiempo total de cada corrida fue de 45 min. La detección del producto fue medida con la absorbancia a una longitud de

onda de 262nm. El cálculo de la cantidad de producto generado por cada reacción fue cuantificado mediante una curva estándar con concentraciones conocidas de UDP-Glu.

4.3.2 Estructura superficial de los bionanorreactores.

Fue estimado el radio hidrodinámico de los bionanorreactores por DLS y posteriormente se preparó una muestra para microscopía electrónica de transmisión (TEM) con las nanopartículas BMV-GALT para conocer la estructura superficial de los bionanorreactores y estimar el tamaño de las nanopartículas. Fue colocada una gota de 6 μ L de la suspensión de las nanopartículas sobre una rejilla de cobre para TEM, se dejó incubar un minuto a temperatura ambiente y a continuación la gota fue retirada con papel secante, en seguida a este periodo, se colocó una gota de 6 μ L de acetato de uranilo al 1% sobre la rejilla y se incubó bajo las mismas condiciones, el acetato de uranilo fue retirado con papel secante. Finalmente, las preparaciones fueron observadas bajo un TEM.

Capítulo 5. Resultados

5.1. Propiedades electrostáticas de la enzima GALT y de la proteína de cápside.

5.1.1. Distribución superficial de carga de la enzima GALT y de los capsómeros del BMV.

Fue obtenido del Banco de Datos de Proteínas de Europa el archivo .pdb de la enzima GALT humana (Entrada PDB 5IN3) y el de la proteína de cápside (CP) del virus BMV (Entrada PDB 3J7L). Estos archivos fueron preparados y procesados en Maestro por separado. Bajo el análisis de Poisson-Boltzmann se encontró que la enzima GALT posee una distribución superficial de carga negativa (**Figura 7.a y b**). En el caso de la proteína CP, esta fue analizada en su conformación multimérica (capsómeros) y se encontró que en la superficie interna de los hexámeros (**Figura 7.c y d**) y pentámeros (**Figura 7.e y f**) existe una alta densidad de carga positiva, mientras que en la superficie exterior hay una mayor distribución carga negativa. En la **Figura 7** se ilustra de color rojo las cargas negativas y de color azul las cargas positivas.

5.1.2. Potencial Z y radio hidrodinámico de la enzima GALT, la proteína CP y el virus BMV.

Fue trazado un perfil de potencial Z con los valores estimados en el Zetanosizer Nano SZ de Malvern para la enzima GALT, la proteína de cápside CP y el virus BMV en los diferentes valores de pH. El perfil de potencial Z la enzima GALT (**Figura 8**) muestra que en el rango de pH de 4-7 la enzima tiene un potencial Z negativo, y de acuerdo al trazo de la figura, se espera que el punto isoeléctrico se encuentre más abajo de pH 4. El perfil de potencial Z de la proteína CP-libre (**Figura 9**) muestra que la CP alcanza el punto isoeléctrico alrededor de pH 6.5, a valores más altos de este pH la proteína CP-BMV adquiere un potencial Z negativo, mientras que, a menores valores el potencial resulta positivo. En el Perfil de potencial Z del virus BMV (**Figura 10**) se encontró que el BMV alcanza el punto isoeléctrico alrededor del pH 6.3, a valores más altos al punto isoeléctrico el potencial Z del virus BMV es negativo mientras que a valores menores virus BMV adquiere un potencial Z positivo.

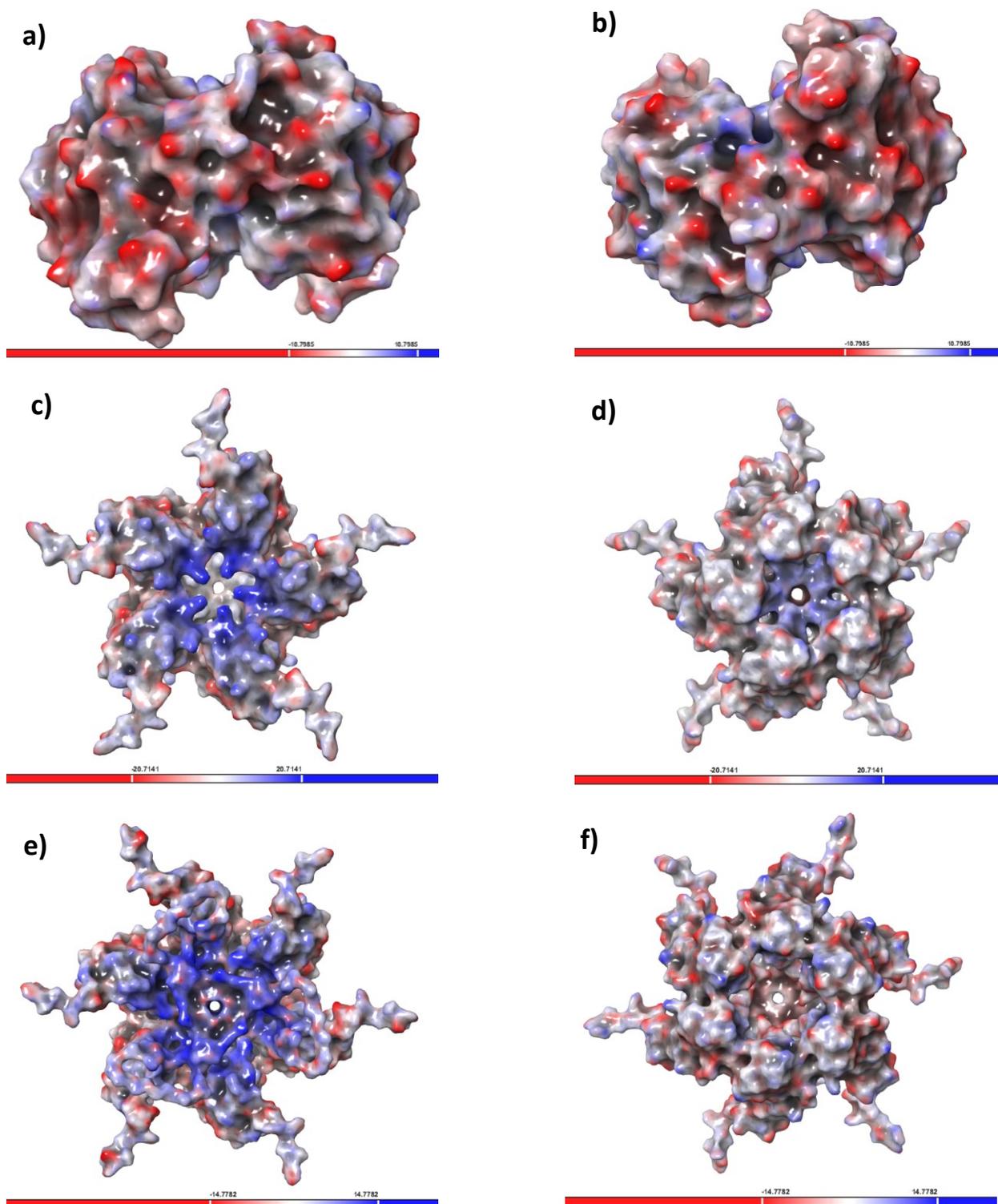


Figura 7. Análisis *in silico* de la distribución superficial de carga eléctrica de la enzima humana GALT y de los capsómeros del BMV utilizando el software Maestro de Schrödinger®. a) y b) Superficie de la enzima GALT vistas desde una posición frontal y una posterior respectivamente. Superficie de un pentámero de CP del BMV: c) superficie interna y d) externa con respecto a su orientación en la cápside. Superficie de un hexámero de CP del BMV, e) superficie interna y f) externa con respecto a su orientación en la cápside. En la figura se muestra una escala de color rojo a azul, los sitios de color rojo son negativos y los de color azul positivos eléctricamente.

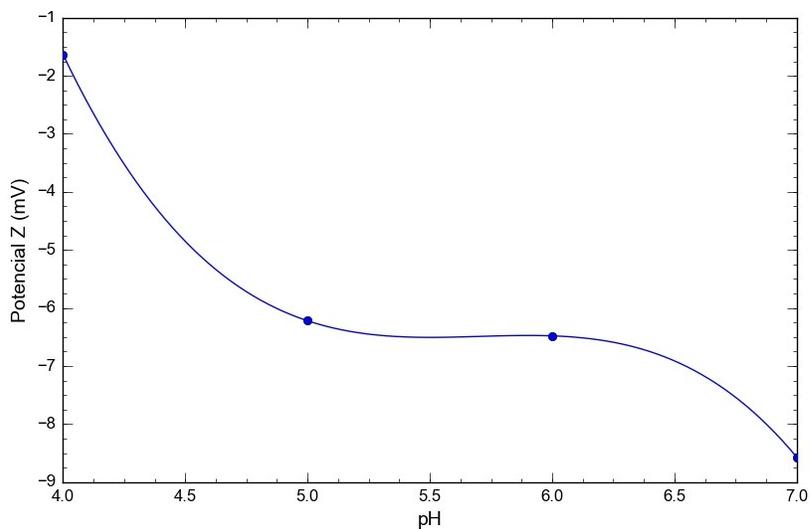


Figura 8. Perfil de potencial Z de la enzima GALT en función del pH (4,5,6 y 7). El potencial Z (mV) de GALT en este intervalo fue siempre negativo.

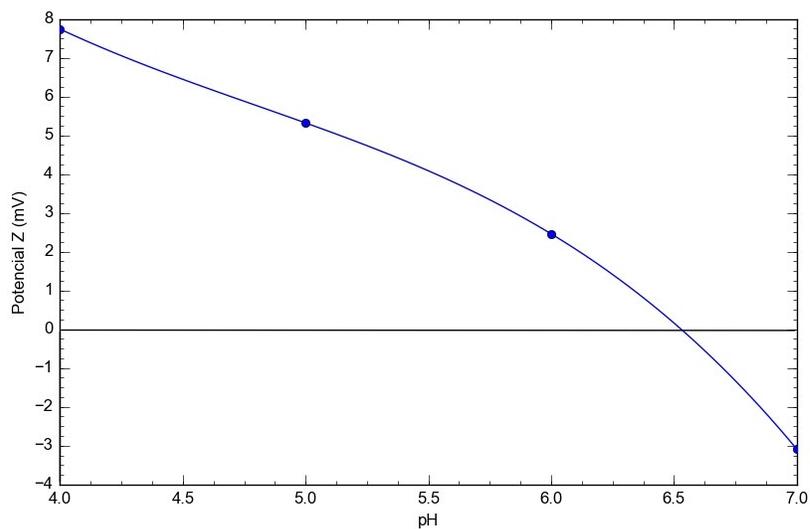


Figura 9. Perfil de potencial Z de la proteína CP-BMV en función del pH (4,5,6 y 7). Se observa que alrededor del pH 6.5 la proteína alcanza el punto isoeléctrico, a valores más altos de este pH la proteína CP-BMV tiene un potencial negativo y a menores a pH 6.5 el potencial de la proteína CP es positivo.

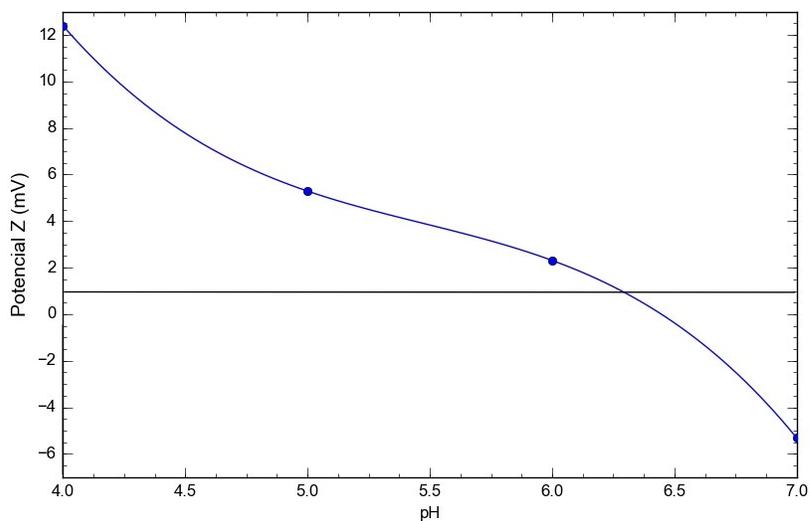


Figura 10. Perfil de potencial Z del virus BMV en función del pH (4, 5, 6 y 7). Se observa que alrededor del pH 6.3 el virus alcanza el punto isoeléctrico, a valores más altos de este pH el potencial Z del virus BMV es negativo mientras que a valores menores al punto isoeléctrico el virus BMV adquiere un potencial Z positivo.

Los valores obtenidos por DLS del diámetro hidrodinámico de la enzima GALT, el virus BMV y de las nanopartículas sintetizadas GALT-BMV se encuentran concentrados en la

Tabla 1. El diámetro de la enzima GALT fue estimado a pH fisiológico resultando un valor de 7.6nm en promedio, **Figura 11.** El diámetro hidrodinámico del virus BMV (**Figura 12**) fue estimado en diferentes valores de pH, resultando una variación del diámetro hidrodinámico en función del pH (26.59nm a pH.5 - 40.38nm a pH 8). El diámetro hidrodinámico del BMV en pH ácido es menor con respecto al diámetro hidrodinámico estimado en pH alcalino.

De acuerdo al valor estimado para la enzima GALT mediante DLS se realizó una aproximación del número de enzimas que podrían ser contenidas dentro de las VLP's del BMV tomando en consideración el espacio disponible en el volumen interior hueco de una capsida del virus nativo, de número de triangulación $T=3$ con diámetro exterior 28nm y 21nm del diámetro interior en promedio (Cadena-Nava et al., 2012).

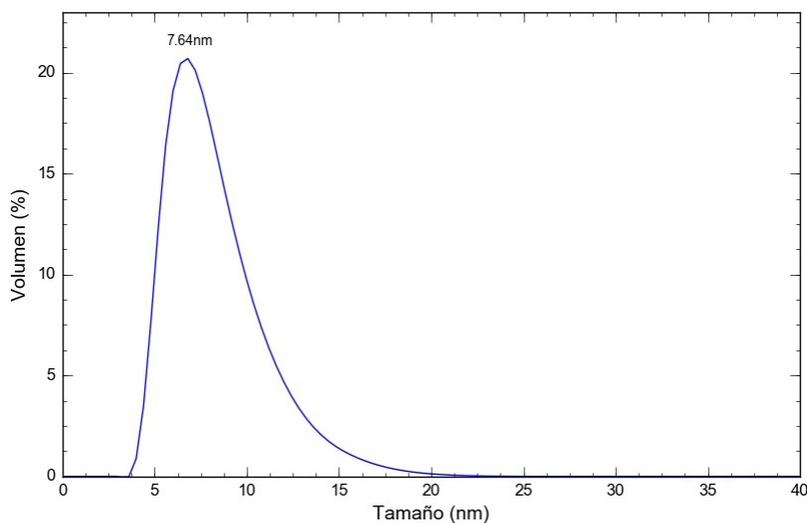


Figura 11. Distribución de tamaño de la enzima GALT a pH 7 estimado mediante DLS. De acuerdo a esta distribución se observa que en la muestra domina una población de partículas de 7.64nm en promedio.

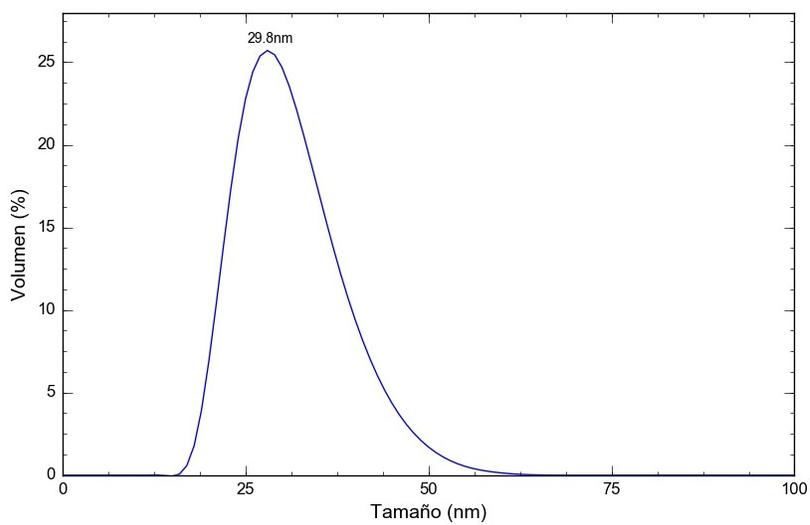


Figura 12. Distribución de tamaño del virus BMV a pH 7 estimado mediante DLS. De acuerdo a esta distribución de tamaño se observa que en la muestra domina una población de partículas de 29.8nm en promedio.

Tabla 1. Con un equipo Zetasizer Nano ZS de Malver por DLS fue estimado el diámetro hidrodinámico de la enzima GALT, el virus BMV a diferentes valores de pH y las nanopartículas GALT-BMV sintetizadas y purificadas.

	pH	Diámetro hidrodinámico (nm)	d.s. (nm)	Volumen (%)
BMV	4.5	26.59	7.591	98.8
	6	27.43	8.152	97.2
	7	29.79	6.791	100
	8	40.38	13.9	98.9
GALT	7	7.637	2.349	99.5
VLPs GALT-BMV	7.2	29.35	8.184	86.5

Se considero el volumen de la enzima GALT, suponiendo que la enzima tuviese una geometría esférica de radio igual a $\frac{1}{2}$ del diámetro hidrodinámico $r_{GALT} \sim 8nm$ estimado por DLS se calculo el numero de veces que este volumen esférico de GALT V_{GALT} pudiese ser contenido en tres cuartas partes del volumen esférico del interior hueco V_{inBMV} de la capsida viral T=3 con radio $r_{inBMV} = 10.5nm$. Entonces

$$N_{\frac{GALT}{inBMV}} = \frac{\frac{3}{4}V_{inBMV}}{V_{GALT}} \quad (1)$$

$$N_{\frac{GALT}{inBMV}} = \frac{3 \left(\frac{4}{3} \pi r_{inBMV}^3 \right)}{4 \left(\frac{4}{3} \pi r_{GALT}^3 \right)} = \frac{3}{4} \left(\frac{r_{inBMV}}{r_{GALT}} \right)^3$$

$$N_{\frac{GALT}{inBMV}} \sim 14 \frac{GALT}{VLP-BMV} \quad (2)$$

Donde $N_{\frac{GALT}{inBMV}}$ representa el numero de enzimas que puede ser contenidas por capsida del BMV. Por lo tanto, para tener una primera aproximación de la concentración a usar de enzima GALT y de proteína CP para la reacción de ensamble se considero una relación de 14 enzimas GALT por capsida con numero de triangulación T=3 (180 subunidades de CP).

5.2. Purificación de virus BMV y de proteína de cápside CP-BMV

La infección de las plantas de cebada con el virus del BMV fue lograda con éxito. A partir de la segunda semana posterior a la infección de plantas el patrón de clorosis en las hojas de cebada fue bastante evidente y este evento dio pie para continuar con la cosecha de hojas. Las hojas fueron cortadas desde de la base de la lámina foliar y se almacenaron a -80° .

La extracción de virus BMV a partir de las hojas infectadas de cebada fue lograda con una solución amortiguadora de extracción de virus siguiendo el protocolo descrito por Cadena y col. 2012. Se obtuvo un rendimiento total de 416.6ug de virus por cada gramo de hojas con una pureza mediada por el cociente de $\frac{A_{280}}{A_{260}} \geq 1.5$ considerada como óptima. El virus fue alicuotado a una concentración de 2mg/mL en solución amortiguadora de virus a -80°C hasta su uso. El virus purificado fue utilizado para obtener proteína CP-libre por desensamble.

La purificación de proteína CP-libre a partir del desensamble del virus nativo BMV fue lograda con éxito. La muestra final de proteína purificada fue almacenada en solución amortiguadora de proteínas a una concentración final 0.97ug/uL determinada usando el coeficiente de extinción molar de la CP (0.845), con una pureza mediada por el cociente de $\frac{A_{280}}{A_{260}} \geq 1.5$, considerada como óptima. Esta proteína fue utilizada para los ensayos de ensamble dentro de las dos primeras semanas posteriores a su purificación.

5.3. Ensamblés prueba GALT-BMV y ensayo de movilidad electroforética.

Para tener una primera aproximación de la cantidad de enzima GALT y proteína CP-libre a utilizar el ensayo de ensamble en microcovolumenes de reacción; primero se decidió fijar una masa inicial de 9ug de proteína CP en 50uL de reacción y bajo la consideración de una relación molar de 14 enzimas por cápside del virus BMV T=3 (180 subunidades de CP) determinado por la ecuación 1 y 2, después se calculó la cantidad en masa de enzima GALT correspondiente (3ug). Finalmente se probaron tres razones distintas 3:6, 3:9 y 3:12ug de GALT:CP respectivamente. Las muestras resultantes de la reacción de ensamble en microvolúmen fueron llevadas a un ensayo de movilidad electroforética para comparar los resultados de

la movilidad electroforética de los ensambles de prueba con la movilidad electroforética del virus nativo, de la proteína CP-libre y de la enzima GALT-libre.

Los resultados del ensayo de movilidad electroforética de los ensambles de prueba se muestran en la **Figura 13**. Los posos donde se sembraron las muestras fueron colocados en la parte central del gel de agarosa. La parte superior del gel con respecto al eje de los posos, corresponde con la dirección del polo positivo (ánodo) y la parte inferior a la dirección del polo negativo (cátodo). En la **Figura 13** se observa que en la electroforesis la proteína CP-libre, el virus BMV y los ensambles de prueba migran hacia el cátodo, mientras que la enzima GALT (carril 6) se desplaza en dirección al ánodo. También se observa que en los carriles 3, 4, y 5 donde se sembraron las muestras de ensamble GALT-BMV 3:6, 3:9 y 3:12ug de GALT:CP-BMV respectivamente, las partículas tienen una movilidad electroforética similar a la del virus nativo (carril 2) y es distinta a la movilidad presentada por la proteína CP-libre (carril 1). El frente de carril de las muestras de ensamble presenta una banda que es comparable con la banda del virus BMV nativo, de hecho, hay un incremento en la intensidad de la banda de los ensambles conforme incrementa la concentración de proteína CP, siendo la muestra de ensamble 3:12ug la razón con mayor intensidad de banda en comparación con las otras muestras de ensamble.

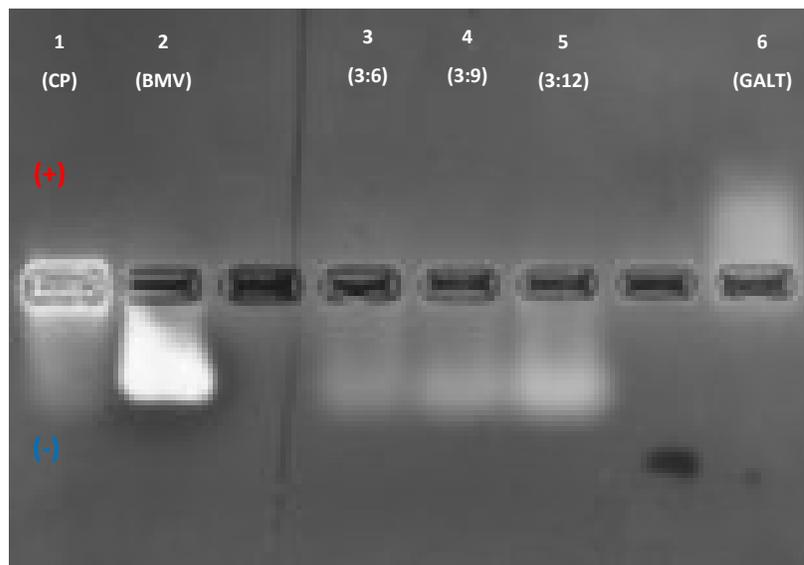


Figura 13. Ensayo de movilidad electroforética en gel de agarosa de los ensambles en microvolúmenes de reacción. Carril 1, proteína de cápside CP-libre. Carril 2, virus BMV. Carril 3, 4 y 5 ensambles GALT-BMV a 3:6, 3:9 y 3:12ug m:m de enzima GALT: proteína CP, respectivamente. Carril 6 enzima GALT-libre. La electroforesis fue corrida a pH 6.

5.4. Síntesis y purificación de las nanopartículas GALT-BMV

La síntesis final de partículas GALT-BMV fue lograda con éxito mediante el método de autoensamble usando una relación en masa de 3:12ug de GALT: CP por cada 50uL de volumen de reacción. Al finalizar el proceso de síntesis las partículas fueron purificadas y concentradas por ultrafiltración con una columna Amicom con membrana de 100KDa para eliminar el exceso de enzima libre y la proteína de CP. Se recuperaron 100uL de ensamble purificado GALT-BMV. Este volumen final fue utilizado para los ensayos de actividad catalítica, electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida, DLS y microscopia electrónica de barrido.

Se tomó una muestra de ensamble purificado para analizar el diámetro hidrodinámico por DLS y de esta forma tener una estimación del tamaño de las partículas producidas en la reacción de ensamble. El diámetro hidrodinámico de las nanopartículas GALT-BMV resultante fue de (29.4 ± 8.2) nm en promedio (**Figura 14**). La medición se registró en porcentaje del volumen total de la muestra, resultando un 86.5% del volumen total bajo la curva de esta distribución de tamaños.

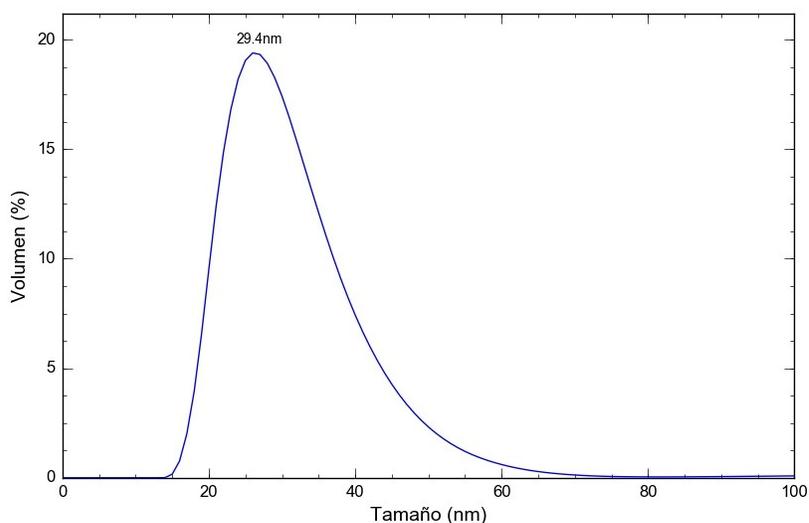


Figura 14. Distribución de tamaño de las nanopartículas GALT-BMV sintetizadas por el método de autoensamble y purificadas por ultrafiltración. El diámetro hidrodinámico de las partículas GALT-BMV fue de (29.4 ± 8.2) nm en promedio, el área bajo la curva de distribución corresponde con el 86.5% del volumen total de la muestra en la medición por DLS.

Fue preparado un SDS-PAGE para verificar la encapsidación de la enzima GALT en las VLP's del BMV y en el mismo ensayo se cargaron muestras con diferentes concentraciones de GALT y de proteína CP. El carril 1 del gel de poliacrilamida (**Figura 15**) corresponde al marcador de masa molecular. El carril 2 corresponde a las nanopartículas GALT-BMV, se observa en este carril la presencia de una banda similar a la que aparece en las muestras donde se cargó la enzima GALT de 43KDa (flecha roja) y también se observa una evidente banda a la altura de 20KDa que coincide con la observada en los carriles donde se cargó la proteína CP (flecha azul). Los carriles 3-6 corresponden al gradiente de concentración en masa de la enzima GALT 1, 2, 4 y 9ug respectivamente, es notable que la intensidad de las bandas incrementa conforme la concentración también aumenta. Los carriles 7-10 corresponden al gradiente de concentración de la proteína de CP, se observa en la imagen el incremento de intensidad de la banda en 20KDa conforme incrementa la concentración de la proteína CP.

Utilizando el software ImageJ fue realizado un análisis de intensidad de las bandas resultantes del gradiente de concentraciones de la enzima GALT y la proteína CP en el gel de poliacrilamida y fue estimada una curva estándar de concentración respectivamente. Mediante una regresión lineal de la intensidad de banda en función de la concentración de GALT o CP en microgramos se obtuvieron las siguientes ecuaciones:

$$m_{GALT} = \left(\frac{I_{banda} - 303.9}{814.7} \right) \quad (3)$$

$$m_{CP} = \left(\frac{I_{banda} - 2040.5}{6851.5} \right) \quad (4)$$

Donde m_{GALT} es la masa en microgramos de enzima GALT, m_{CP} la masa en microgramos de la proteína CP-BMV y I_{banda} la intensidad de la banda en el gel. El coeficiente de correlación de la regresión lineal para curva estándar de la enzima GALT resulto de 0.99, igual al de la curva estándar de la proteína CP. Con base en estas curvas estándar (ecuación 3 y 4) se determinó la concentración en masa de enzima GALT ($7.6 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\mu\text{L}$) y de proteína de cápside CP ($2.3 \times 10^{-1} \mu\text{g}/\mu\text{L}$), respectivamente, en la muestra final de ensamble GALT-BMV purificado.

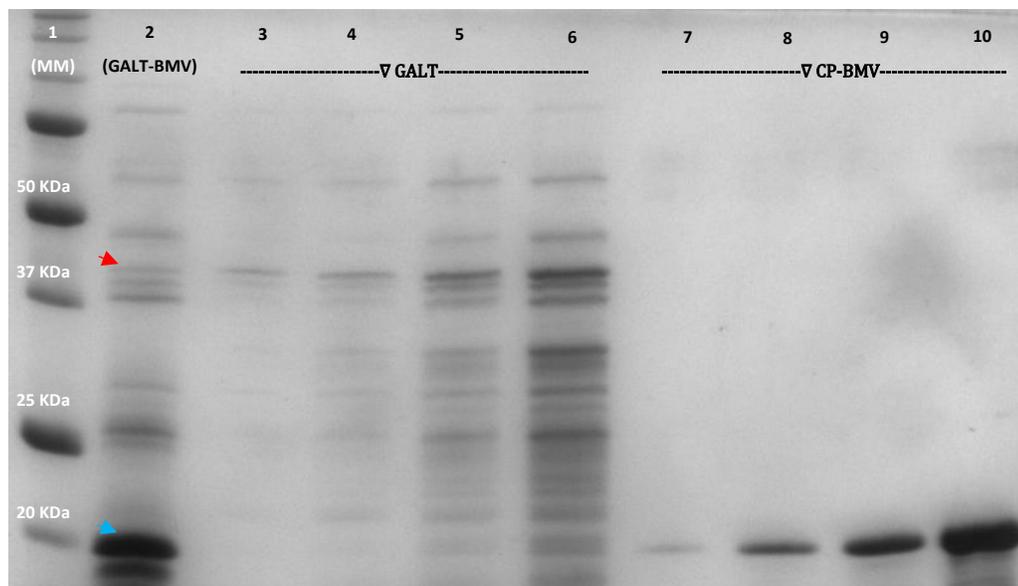


Figura 15. Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida. Carril 1, corresponde al marcador de peso molecular (Bio-Rad 20-250kDa). Carril 2, 15uL de muestra del ensamble GALT-BMV. Carril 3-6, gradiente de concentración en masa de enzima GALT 1, 2, 4 y 9ug respectivamente. Carril 7-10, gradiente de concentración en masa de proteína de cápside CP 0.317, 0.634, 1.268 y 6.340ug respectivamente.

5.6. Actividad catalítica de las nanopartículas BMV.

Con el análisis de los cromatogramas obtenidos en el HPLC de las concentraciones de UDP-Gal se estimó una curva de concentración estándar. Mediante una regresión lineal del área de la absorbancia a 262nm (Abs_{262}) en función de la concentración de UDP-Gal se encontró la siguiente ecuación:

$$[UDP - Gal] = \frac{Abs_{262} - 788}{24056.7} \quad (5)$$

Donde $[UDP - Gal]$ es la concentración de UDP-Gal. El coeficiente de correlación de la curva fue de 0.99. Esta curva de calibración fue empleada para determinar el producto formado en las reacciones con actividad GALT.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la formación de producto, cuantificado por HPLC, en el ensayo de actividad enzimática GALT se estimó una regresión de Michaelis-Menten de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato (UDP-Gal), tanto de la enzima GALT-libre, como de las nanopartículas GALT-BMV. La regresión obtenida para la cinética de Michaelis-Menten de la enzima GALT-libre se muestra en la **Figura 16**, de acuerdo con esta curva, la velocidad máxima es de $V_{max} = 42.6 \pm$

3.8 $\mu\text{M}/\text{min}$ y la constante de Michaelis-Menten $K_M = 0.91 \pm 0.2\text{mM}$, el coeficiente de correlación fue de 0.99 y el error estándar 1.5 $\mu\text{M}/\text{min}$. Con respecto a la cinética de Michaelis-Menten de las nanopartículas GALT-BMV, **Figura 17**, los resultados arrojaron que la velocidad máxima es de $V_{max} = 49.9 \pm 17.5 \mu\text{M}/\text{min}$ y la constante de Michaelis-Menten $K_M = 1.64 \pm 1.0\text{mM}$, el coeficiente de correlación fue de 0.96 y el error estándar 3.7 $\mu\text{M}/\text{min}$.

De acuerdo con resultados encontrados en el análisis de regresión se calculó la constante y la eficiencia catalítica para cada uno de los sistemas ensayados, GALT-libre y GALT-BMV, **Tabla 2**. Constantes catalíticas de la enzima GALT-libre y de las VLP's GALT-BMV. La concentración de GALT utilizada en el ensayo de la enzima libre fue de $2.5 \times 10^{-8}\text{M}$, y, por lo tanto, la constante de actividad catalítica K_{cat} de $1,709.9 \text{min}^{-1}$. En cambio, en el ensayo de actividad con las nanopartículas GALT-BMV la concentración de enzima fue de $1.75 \times 10^{-7}\text{M}$, estimada con la ecuación (3) y, por lo tanto, la K_{cat} de 282.6min^{-1} . La eficiencia catalítica de la enzima libre en comparación con la enzima confinada en las VLP's, fue mayor en un orden de magnitud **Tabla 2**. Constantes catalíticas de la enzima GALT-libre y de las VLP's GALT-BMV., con un valor de $1879.01 \text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ para la enzima libre y de 172.32 para la GALT confinada.

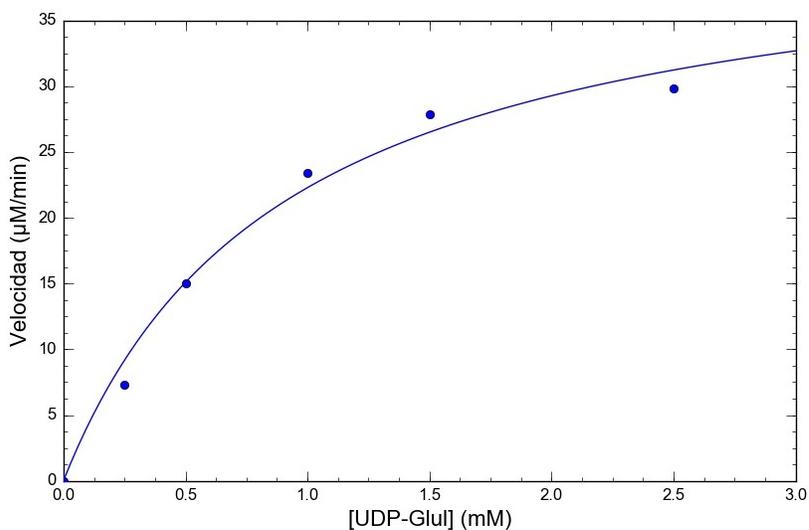


Figura 16. Cinética enzimática de la enzima GALT-libre. Los puntos en azul corresponden a los datos experimentales cuantificados por HPLC y la línea azul corresponde a la regresión de Michaelis-Menten calculada en el software CurveExpert professional 2.6.5.

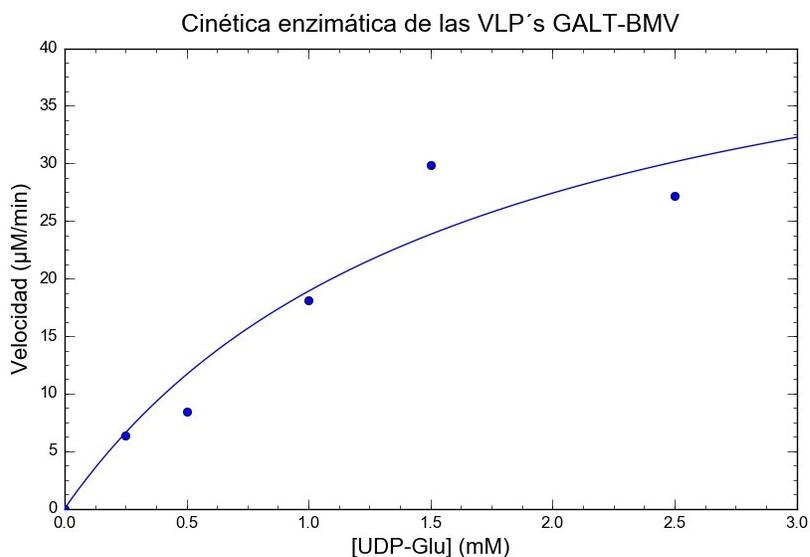


Figura 17. Cinética enzimática de los bionanorretores GALT-BMV. Los puntos en azul corresponden a los datos experimentales cuantificados por HPLC y la línea azul corresponde a la regresión de Michaelis-Menten calculada en el software Curveexpert professional 2.6 5.

Tabla 2. Constantes catalíticas de la enzima GALT-libre y de las VLP's GALT-BMV.

	K_m (mM)	K_{cat} (min^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$)
GALT-libre	0.91 ± 0.2	1,709.9	1879.01
GALT-BMV	1.64 ± 1.1	282.6	172.32

5.7. Estructura superficial de los bionanorretores GALT-BMV.

La estructura superficial de los bionanorretores fue analizada por microscopía electrónica de transmisión. Se preparó una muestra de bionanorretores GALT-BMV y otra del virus nativo BMV, ambas teñidas con acetato de uranilo para observar en TEM. Se capturaron imágenes de diferentes campos para tener al menos una población de 100 partículas de GALT-BMV o virus BMV para el análisis estadístico del tamaño de partícula, el cual, se estimó mediante los resultados procesados en ImageJ a partir de las

imágenes obtenidas por TEM. Se encontró que el tamaño promedio de los bionanorreactores GALT-BMV es de 28 ± 8.2 nm.

De acuerdo con el tamaño estimado de las nanopartículas GALT-BMV 28 nm se determinó el número de triangulación de las VLP's GALT-BMV, $T=3$. Lo que implica que las cápsides están conformadas por 180 subunidades de la proteína CP del BMV. Con base en estos resultados y en los obtenidos en la determinación de la contracción de enzima GALT y de proteína CP por unidad de volumen en la muestra ensamble GALT-BMV, se calculó el número de enzimas contenidas por cápside del BMV $N_{GALT/VLP}$.

$$N_{GALT/VLP} = \frac{n_{GALT}}{n_{VLP's}} \quad (6)$$

$$N_{GALT/VLP} \sim 14 \frac{GALT}{VLP} \quad (7)$$

Donde n_{GALT} es el número de moles de enzima GALT y $n_{VLP's}$ es el número de moles de cápsides virales por unidad de volumen en la muestra de GALT-BMV. Finalmente, estimamos con la ecuación 6 y 7 que existe una relación de 14 moles de enzima GALT por cada mol de VLP del BMV, es decir hay 14 copias de GALT por cápside del BMV de numero de triangulación $T=3$.

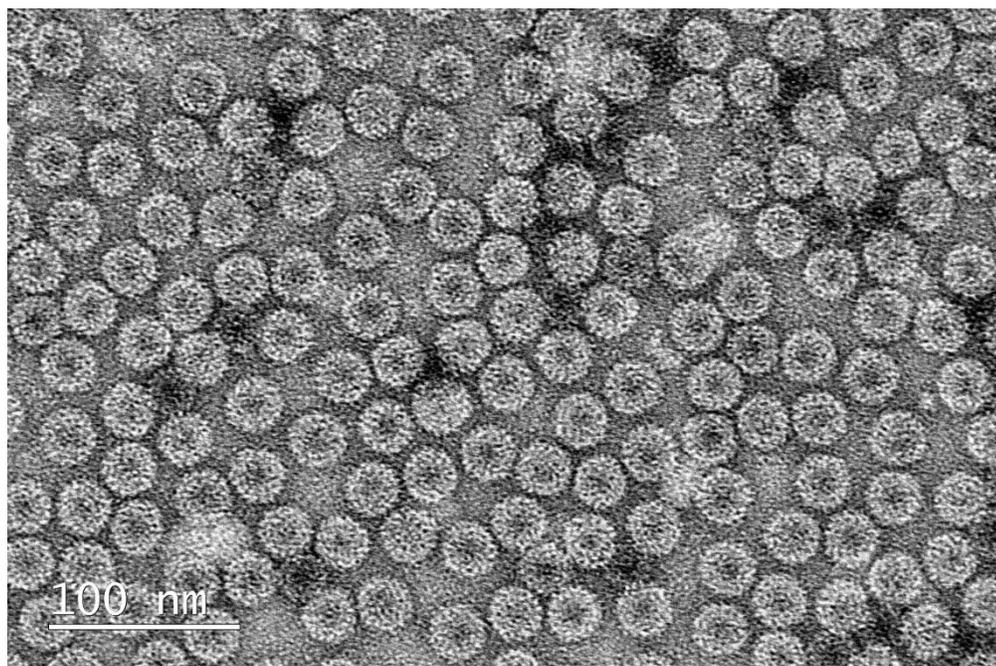


Figura 18. Micrografía de virus nativo BMV, observada bajo microscopio electrónico de transmisión. El tamaño promedio de las partículas virales es de 28nm, $T=3$.

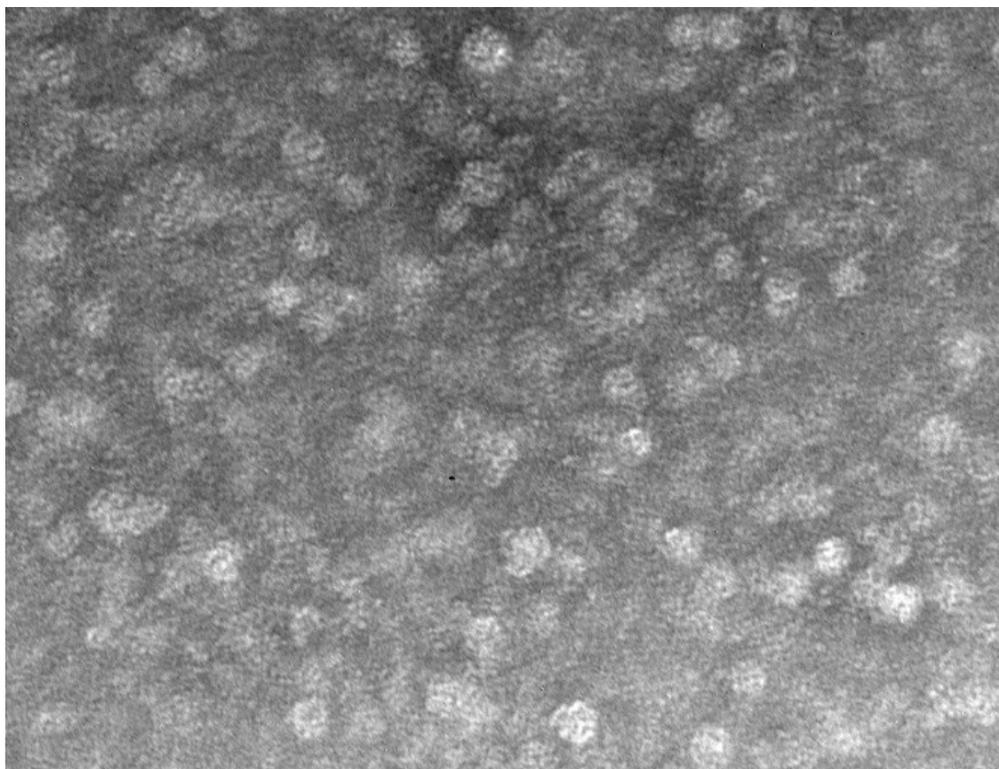


Figura 19. Micrografía de los bionanorretores GALT-BMV purificados, observados bajo microscopio electrónico de transmisión. El tamaño promedio estimado de las partículas virales fue de 28 ± 8.2 .

Capítulo 6. Discusión

Para alcanzar los objetivos de este proyecto, diseñamos un sistema de bionanorretores GALT-BMV con actividad enzimática GALT. Primero analizamos las propiedades electrostáticas que posee la enzima GALT y a partir de de *in silico* de la distribución superficial de carga eléctrica y el potencial Z de la enzima GALT determinamos las condiciones óptimas para la síntesis de los bionanorretores GALT-BMV por el método de autoensamble de la enzima GALT en capsides del virus BMV.

Encontramos *in silico* que la superficie de la enzima GALT posee una alta distribución de cargas negativas en su superficie a pH 7. Estas cargas eléctricas corresponden a los grupos R de los residuos que se encuentra expuestos en la superficie de la proteína en su estructura cuaternaria. Es importante señalar que las cargas eléctricas en la proteína dependen del pH de la solución en la que las proteínas se encuentran disueltas, y como el pH está en función de la concentración de iones hidroxilo (OH^-) o protones (H^+). Entonces en pH alcalinos, cuando hay una mayor concentración de iones OH^- en el medio estos interactúan con las cargas positivas de la superficie de la proteína, contrarrestando las cargas positivas del total de la distribución superficial de cargas, quedando expuestas en mayor proporción las cargas negativas. De manera inversa ocurre cuando las proteínas se encuentran en medios ácidos, lo que implica una mayor concentración de iones H^+ que pueden neutralizar a las cargas negativas de la superficie de las proteínas, aumentando la proporción de cargas positivas sobre el total de la superficie de la proteína.

Por esta razón realizamos un perfil del potencial Z de la enzima GALT, para saber si en el rango de pH donde se realizó el proceso de encapsidación la enzima es eléctricamente negativa en su superficie, lo cual, es necesario para pudiera ocurrir la interacción con los cápsomeros que de las VLP's del BMV. Como los resultados mostraron que en el rango de pH de 6-7.5, el potencial Z es negativo, entonces asumimos que la enzima GALT si podía interactuar con la superficie interior de los cápsomeros para que se formaran por el método de autoensamble descrito por Cadena y col (2012), las nanopartículas de interés.

Por otra parte, también se realizó una estimación del radio hidrodinámico de la enzima GALT para verificar, en función de este parámetro si el volumen estimado de GALT suponiendo una geometría esférica de la enzima, si la enzima podría ser contenido dentro del volumen interior hueco de las VLP's del BMV. Encontramos que aproximadamente 14 enzimas podrían ser contenidas en un 75% de cápside viral de número de triangulación $T=3$ (28 nm de diámetro) (Lucas et al., 2001). No obstante, aparte de que esta aproximación es somera por no considerar los espacios vacíos dentro de la VLP por impedimento del

efecto estérico al asumir una geometría esférica de la enzima GALT, también es importante considerar que en el proceso de autoensamble se pueden formar VLP's con otro número de triangulación, es decir, cápsides con otro tamaño de partícula, y por ende otro volumen interior distinto disponible para el cargo de las enzimas GALT el cual puede ser mayor o menor. Otra consideración es que, dado que la superficie de la enzima GALT es negativa, entonces se podría esperar una repulsión entre las mismas moléculas de GALT y esto disminuiría el número de enzimas que podrían ser contenidas en las VLP's del BMV. Sin embargo, realizar esta estimación nos sirvió como referencia para tener una aproximación de la concentración de enzima GALT con respecto a la concentración de proteína CP a utilizar en la reacción de ensamble.

Considerando la relación molar de 14 enzimas por cápside se decidió realizar ensayos de ensamble en microvolúmenes de reacción, para probar si esta relación GALT:CP era viable para la síntesis de las VLP's GALT-BMV, incluso se probaron dos relaciones más una con mayor y otra con menor proporción de proteína CP. Mediante el ensayo de movilidad electroforética encontramos que la relación en masa de 3µg de enzima GALT y 12 µg de proteína CP por cada 50 µL de reacción óptima para el autoensamble. En el gel de agarosa de la electroforesis los ensambles mostraron una movilidad electroforética similar al virus. El carril de la muestra 3:12µg GALT:CP mostró una banda más intensa en comparación con las otras relaciones de prueba, las cuales mostraron esta misma banda pero menos intensa. Y como la intensidad de la banda está relacionada con la concentración de partículas. Entonces elegimos esta relación como óptima para nuestros ensayos de síntesis de nanopartículas GALT-BMV.

En el proceso de ensamble las muestras de reacción fueron colocadas ante soluciones amortiguadoras con un valor distinto de pH por cada etapa de la reacción. Durante el proceso de ensamble de VLP's, se preparó la reacción de ensamble fue aforada con solución de proteínas la cual tiene una alta fuerza iónica. No obstante, cuando dializamos la reacción en la primera etapa con solución de ensamble, la cual contiene una poca concertación de iones, es decir una baja fuerza iónica, a en comparación con la solución amortiguadora de proteínas. En la solución de ensamble para equilibrar el potencial químico los iones que interaccionaban inicialmente con la proteína CP se difunden por gradiente de concertación, dejando la superficie de las proteínas CP libre para interaccionar con la enzima GALT. Aquí es donde ocurre la primera interacción importante para la formación de las VLP's por autoensamble, las cargas positivas de la superficie interna los capsómeros de las VLP's, comienzan a interaccionar con la superficie de la enzima GALT, generando una especie de nucleación y a continuación se da el ensamble por completo. En la segunda etapa de la reacción de ensamble, esta fue llevada frente a una solución de acidificación, porque

de esta manera buscamos mayor estabilidad a las VLP's ensambladas, ya que el medio ácido promueve la interacción por puentes de hidrógeno entre los grupos carboxilos de los capsómeros entre capsómeros, así mismo la presencia de iones de magnesio en esta solución amortiguadora, le brinda estabilidad a las unidades multiméricas (Bancroft, 1970). Por lo tanto, el resultado es una cápside más estable (Cadena et al., 2012). Finalmente, en la última etapa de la reacción de ensamble, las VLP's fueron llevadas nuevamente a solución de ensamble porque el pH de esta solución es más aproximado al pH fisiológico y esto es importante para los ensayos de caracterización enzimática y futuras aplicaciones.

El análisis por DLS de las nanopartículas sintetizadas encontramos que el tamaño de partículas GALT-BMV y es muy aproximado al de virus nativo y otro hallazgo importante fue que no encontramos alguna señal en el diagrama de distribución de tamaños de partículas más pequeñas como por ejemplo del tamaño de la enzima GALT (McCorvie, 2016). Por lo tanto, consideramos que el proceso de purificación de nanopartículas sintetizadas GALT-BMV fue efectivo.

La actividad catalítica de las nanopartículas GALT-BMV fue de 16% en comparación con la enzima GALT-libre. Esta pérdida de actividad puede deberse en gran medida por efectos estéricos o por saturación de sustrato o también por saturación del producto dentro de la cápside viral. La enzima pierde actividad en pH ácidos y cuando se realizó la síntesis la enzima estuvo expuesta a pH 6 durante el proceso de acidificación.

Haber encontrado actividad enzimática en las nanopartículas GALT-BMV es importante para futuras aplicaciones. No obstante, se deben hacer consideraciones de los mecanismos y condiciones apropiadas para mejorar y garantizar la eficiencia catalítica de los bionanorreactores que se sintetizaron en este proyecto. También es importante hacer pruebas biológicas para determinar la viabilidad que tienen estas partículas para ser aplicadas en el organismo. Por otra parte, se ha encontrado que las cápsides virales de BMV no son citotóxicas y son poco inmunogénicas (Escobedo, 2018), por lo tanto, se espera una alta biocompatibilidad de las nanopartículas GALT-BMV con el cuerpo humano.

Es importante considerar que para posibles aplicaciones de las partículas GALT-BMV, estas tienen que enfrentar las diferentes barreras del organismo y poder llegar al interior de la célula manteniendo la actividad catalítica y ejercer su efecto de acción.

La enzima GALT es expresada naturalmente en las células de la mayoría de los tejidos y órganos pero es de mayor importancia el intestino delgado y el hígado (NCBI, 2019), lo cual, convierte a estos órganos un

blanco potencial. No obstante, dado que la enzima pierde actividad catalítica a pH bajos la vía de administración por ingesta no es viable ya que por esta vía se tendrían que superar los ácidos gástricos del sistema digestivo. La enzima GALT nativamente es activa dentro en citoplasma (NCBI, 2019), por lo tanto, se espera que las nanopartículas que aquí sintetizamos tengan la capacidad de mantener la actividad catalítica en el interior de la célula puedan. Sin embargo, se ha encontrado (resultados no publicados) que las VLP's pueden ser endocitadas por las células. Esto es evidencia de que las partículas GALT-BMV puede mantenerse estables hasta su sitio de acción. Finalmente, como las condiciones de reacción en las que se realizó la caracterización de actividad enzimática fueron las fisiológicas (pH 7 y 37°C) entonces esperamos que las partículas GALT-BMV tenga actividad dentro de las células en los pacientes con galactosemia clásica.

Capítulo 7. Conclusiones

Concluimos que en este proyecto se logró con éxito la síntesis de bionanorreactores GALT-BMV con actividad enzimática GALT. Las cápsides virales del BMV son un excelente nanovehículo para el acarreo de actividad enzimática. Los resultados encontrados en el desarrollo experimental muestran una gran evidencia de que el método de síntesis de bionanorreactores con actividad enzimática mediante la encapsidación por autoensamble de cápside virales es altamente efectivo.

Se encontraron resultados interesantes de las propiedades catalíticas de las nanopartículas GALT-BMV que pueden ser aprovechadas para la implementación de una terapia de remplazo enzimático en el tratamiento de la galactosemia clásica.

Este trabajo abre el panorama para generar propuestas alternativas que en conjunto con el tratamiento convencional puedan optimizar las complicaciones de la galactosemia clásica.

Literatura citada

- Anderson, S. (2018). GALT Deficiency Galactosemia. *The American Journal of Maternal/Child Nursing*, 43(1), 44–51. <https://doi.org/10.1097/NMC.0000000000000388>
- Arikan-Ayyıldız, Z., Yuce, A., Uslu-Kızıllkan, N., & All., E. (2011). Immunoglobulin Abnormalities and Effects of Enzyme Replacement Therapy in Children with Gaucher Disease. *Pediatric Blood and Cancer*, 56(December 2010), 664–666. <https://doi.org/10.1002/pbc>
- ARUP, L. (n.d.). The University of Utah Department of Pathology, GALT Database.
- Bancroft, J. B. (1970). THE SELF-ASSEMBLY OF SPHERICAL PLANT VIRUSES. *Advances in Virus Research*, 16, 99–134.
- Berry, G. T. (2000). Classic Galactosemia and Clinical Variant Galactosemia. Retrieved August 27, 2019, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301691>
- Berry, G. T. (2018). Classic Galactosemia and Clinical Variant Galactosemia. *GeneReviews(R)*.
- Berry, G. T., Nissim, I., Lin, Z., Mazur, A. T., Gibson, J. B., & Stanton, S. (1995). Endogenous synthesis of galactose in normal men and patients with hereditary galactosaemia. *Circulation*, 439(8992), 1073–1074. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.19.1.97>
- Berry, G. T., Palmieri, M., Gross, K. C., Acosta, P. B., Henstenburg, J. A., Mazur, A., ... Segal, S. (1993). The effect of dietary fruits and vegetables on urinary galactitol excretion in galactose-1-phosphate uridyltransferase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 16(1), 91–100. <https://doi.org/10.1007/BF00711320>
- Broomfield, A. A., Brain, C., & Grunewald, S. (2011). Galactosaemia an update. *Paediatrics and Child Health*, 21(2), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.paed.2010.10.003>

- Cadena-Nava, R. D., Comas-Garcia, M., Garmann, R. F., Rao, A. L. N., Knobler, C. M., & Gelbart, W. M. (2012). Self-Assembly of Viral Capsid Protein and RNA Molecules of Different Sizes: Requirement for a Specific High Protein/RNA Mass Ratio. *Journal of Virology*, 86(6), 3318–3326. <https://doi.org/10.1128/JVI.06566-11>
- Cech, T. R., & Bass, B. L. (1986). Biological catalysis by RNA. *Ann. Rev. Biochem.*, 55, 599–629. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.003123>
- Comellas-Aragonès, M., Engelkamp, H., Claessen, V. I., Sommerdijk, N. A. J. M., Rowan, A. E., Christianen, P. C. M., ... Nolte, R. J. M. (2007). A virus-based single-enzyme nanoreactor. *Nature Nanotechnology*, 2(10), 635–639. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.299>
- Demirbas, D., Coelho, A. I., Rubio-Gozalbo, M. E., & Berry, G. T. (2018). Hereditary galactosemia. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 83, 188–196. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.01.025>
- Ding, X., Liu, D., Booth, G., Gao, W., & Lu, Y. (2018). Virus-Like Particle Engineering : From Rational Design to Versatile Applications, 1700324, 1–7. <https://doi.org/10.1002/biot.201700324>
- Douglas, T., & Young, M. (2006). Viruses: Making friends with old foes. *Science*, 312(5775), 873–875. <https://doi.org/10.1126/science.1123223>
- Escobedo Rodríguez, D. A. (2018). *Nanovehículos para insulina*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., ... Uhlen, M. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular and Cellular Proteomics*, 13(2), 397–406. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>
- Fiedler, J. D., Brown, S. D., Lau, J. L., & Finn, M. G. (2010). RNA-directed packaging of enzymes within virus-like particles. *Angewandte Chemie - International Edition*, 49(50), 9648–9651. <https://doi.org/10.1002/anie.201005243>

- Germain, D. (2017). Fabry disease. *Journal of Echocardiography*, 15(4), 151–157. <https://doi.org/10.1007/s12574-017-0340-x>
- Gitzelmann, R. (1995). in the Pathophysiology of Galactosemia. *European Journal of Pediatrics*, 154(S), 45–49.
- Hernández Meza, J. M. (2017). *Estudio de la purificación y estabilidad de partículas pseudovirales derivadas del bacteriófago P22 con actividad peroxigenasa de citocromo P450*. Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Nanociencias y Nanotecnología.
- Holden, H. M., Rayment, I., & Thoden, J. B. (2003). Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway for Galactose Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 43885–43888. <https://doi.org/10.1074/jbc.R300025200>
- Hooker, J. M., Datta, A., Botta, M., Raymond, K. N., & Francis, M. B. (2007). Magnetic resonance contrast agents from viral capsid shells: A comparison of exterior and interior cargo strategies. *Nano Letters*, 7(8), 2207–2210. <https://doi.org/10.1021/nl070512c>
- Inoue, T., Kawano, M. aki, Takahashi, R. u., Tsukamoto, H., Enomoto, T., Imai, T., ... Handa, H. (2008). Engineering of SV40-based nano-capsules for delivery of heterologous proteins as fusions with the minor capsid proteins VP2/3. *Journal of Biotechnology*, 134(1–2), 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.12.006>
- Instituto Mexicano del Seguro Social. (2017). *GALACTOSEMIA Tamizaje, diagnóstico, tratamiento médico de las complicaciones e intervención nutricional*. (Coordinación Técnica de Excelencia Clínica & Coordinación de Unidades Médicas de Alta Especialidad, Eds.). México: 29/06/2017.
- Jordan, P. C., Patterson, D. P., Saboda, K. N., Edwards, E. J., Miettinen, H. M., Basu, G., ... Douglas, T. (2016). Self-assembling biomolecular catalysts for hydrogen production. *Nature Chemistry*, 8(2), 179–185. <https://doi.org/10.1038/nchem.2416>

- Kotb, M. A., Mansour, L., William Shaker Basanti, C., El Garf, W., Ali, G. I. Z., Mostafa El Sorogy, S. T., ... Kamal, N. M. (2018). Pilot study of classic galactosemia: Neurodevelopmental impact and other complications urge neonatal screening in Egypt. *Journal of Advanced Research*, *12*, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.02.001>
- Lee, B. Y., Zhang, J., Zueger, C., Chung, W.-J., Yoo, S. Y., Wang, E., ... Lee, S.-W. (2012). Virus-based piezoelectric energy generation. *Nature Nanotechnology*, *7*(6), 351–356. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.69>
- Lipin, D. I., Chuan, Y. P., Lua, L. H. L., & Middelberg, A. P. J. (2008). Encapsulation of DNA and non-viral protein changes the structure of murine polyomavirus virus-like particles. *Archives of Virology*, *153*(11), 2027–2039. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0220-9>
- Lucas, R. W., Kuznetsov, Y. G., Larson, S. B., & McPherson, A. (2001). Crystallization of brome mosaic virus and T = 1 brome mosaic virus particles following a structural transition. *Virology*, *286*(2), 290–303. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0897>
- Lucas, R. W., Larson, S. B., & McPherson, A. (2002). The crystallographic structure of brome mosaic virus. *Journal of Molecular Biology*, *317*(1), 95–108. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5389>
- Mayatepek, E., Hoffmann, B., & Meissner, T. (2010). Inborn errors of carbohydrate metabolism. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, *24*(5), 607–618. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2010.07.012>
- McCorvie, T. J., Kopec, J., Pey, A. L., Fitzpatrick, F., Patel, D., Chalk, R., ... Yue, W. W. (2016). Molecular basis of classic galactosemia from the structure of human galactose 1-phosphate uridylyltransferase. *Human Molecular Genetics*, *25*(11), 2234–2244. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw091>
- Mornet, E. (2018). Hypophosphatasia. *Metabolism*, *82*, 142–155. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-03694-2>
- NCBI. (2019). GALT galactose-1-phosphate uridylyltransferase [Homo sapiens (human)].

- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger principles of biochemistry*. (Séptima ed). New York: W. H. Freeman and Company.
- NIH. (2019). ENZYME REPLACEMENT THERAPY. Retrieved August 27, 2019, from <https://livertox.nih.gov/EnzymeReplacementTherapy.htm#top>
- O'Neil, A., Prevelige, P. E., & Douglas, T. (2013). Stabilizing viral nano-reactors for nerve-agent degradation. *Biomaterials Science*, 1(8), 881–886. <https://doi.org/10.1039/c3bm60063g>
- Panis, B., Gerver, W. J. M., & Rubio-Gozalbo, M. E. (2007). Growth in treated classical galactosemia patients. *European Journal of Pediatrics*, 166(5), 443–446. <https://doi.org/10.1007/s00431-006-0255-4>
- Ren, Y., Sek, M. W., & Lim, L. Y. (2007). Folic acid-conjugated protein cages of a plant virus: A novel delivery platform for doxorubicin. *Bioconjugate Chemistry*, 18(3), 836–843. <https://doi.org/10.1021/bc060361p>
- Rubio-Agusti, I., Carecchio, M., Bhatia, K. P., Kojovic, M., Parees, I., Chandrashekar, H. S., ... Murphy, E. (2013). Movement disorders in adult patients with classical galactosemia. *Movement Disorders*, 28(6), 804–810. <https://doi.org/10.1002/mds.25348>
- Sánchez, L. S., Moreno, A. T., Moreno, K. J., Patterson, D. P., Nava, R. D. C., Douglas, T., & Duhalt, R. V. (2015). Design of a VLP - nanovehicle for CYP450 enzymatic activity delivery. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(66), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0127-z>
- Sánchez Sánchez, L. P. (2014). *Diseño y caracterización de partículas pseudovirales biocatalíticas*. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología.
- Sanders, R. D., Spencer, J. B., Epstein, M. P., Pollak, S. V., Vardhana, P. A., Lustbader, J. W., & Fridovich-Keil, J. L. (2009). Biomarkers of ovarian function in girls and women with classic galactosemia. *Fertility and Sterility*, 92(1), 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.04.060>

- Schoonen, L., & Van Hest, J. C. M. (2014). Functionalization of protein-based nanocages for drug delivery applications. *Nanoscale*, *6*(13), 7124–7141. <https://doi.org/10.1039/c4nr00915k>
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, *6*(2). <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>
- Tang, M., Odejinmi, S. I., Vankayalapati, H., Wierenga, K. J., & Lai, K. (2012). Innovative therapy for Classic Galactosemia - Tale of two HTS. *Molecular Genetics and Metabolism*, *105*(1), 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.09.028>
- Tapia Moreno, M. A. (2015). *Funcionalización y direccionamiento de partículas tipo virus del bacteriófago P22 con actividad citocromo P450*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Uniprot. (2019). P07902 (GALT_HUMAN).
- Varela-Lema, L., Paz-Valinas, L., Atienza-Merino, G., Zubizarreta-Alberdi, R., Villares, R. V., & López-García, M. (2016). Appropriateness of newborn screening for classic galactosaemia: a systematic review. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *39*(5), 633–649. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9936-y>
- Verma, I. M., & Weitzman, M. D. (2005). GENE THERAPY: Twenty-First Century Medicine. *Annual Review of Biochemistry*, *74*(1), 711–738. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.050304.091637>
- Waisbren, S. E., Potter, N. L., Gordon, C. M., Green, R. C., Greenstein, P., Gubbels, C. S., ... Berry, G. T. (2012). The adult galactosemic phenotype. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *35*(2), 279–286. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9372-y>
- Welling, L., Bernstein, L. E., Berry, G. T., Burlina, A. B., Eyskens, F., Gautschi, M., ... Lee, J. H. Van Der. (2016). International clinical guideline for the management of classical galactosemia : diagnosis , treatment , and follow-up. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *40*(2), 171–176. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-9990-5>
- Zdanowicz, M., & Chroboczek, J. (2016). Virus-like particles as drug delivery vectors. *Acta Biochimica Polonica*, *63*(3), 469–473. https://doi.org/10.18388/abp.2016_1275