

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



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida con orientación
en Biomedicina y Bionanotecnología**

**Cápsides del BMV como nanovehículos de fármacos
hidrofóbicos**

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

Presenta:

Juan Eduardo Pérez Sánchez

Ensenada, Baja California, México
2019

Tesis defendida por

Juan Eduardo Pérez Sánchez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Director de tesis

Miembros del comité

Dra. Jimena Carrillo Tripp

Dr. Israel Rocha Mendoza



Dra. Patricia Juárez Camacho
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Juan Eduardo Pérez Sánchez © 2019

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Juan Eduardo Pérez Sánchez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en biomedicina y bionanotecnología

Cápsides del BMV como nanovehículos de fármacos hidrofóbicos

Resumen aprobado por:

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Director de tesis

El desafío principal en la entrega de fármacos es lograr que éstos se localicen en el sitio u órgano específico que se requiere, evitando de esta manera los efectos secundarios adversos a otros órganos. Sin embargo, la falta de control sobre la localización específica y, por lo tanto, la biodisponibilidad deseada sigue siendo uno de los retos más importantes en el área de la nanomedicina. En particular, la solubilidad del fármaco es un problema relevante, puesto que casi la mitad de los productos farmacéuticos actuales son poco solubles en agua. Esta falta de solubilidad disminuye considerablemente su rendimiento, ya que solamente una fracción del fármaco se acumula en la región deseada. Por lo cual, existe una necesidad urgente de desarrollar un nanovehículo que presente un potencial para mejorar el envío, entrega y eficiencia de medicamentos hidrofóbicos. En este trabajo de investigación se propone el uso de cápsides virales como nanovehículos de fármacos hidrofóbicos. Para llevar a cabo esta propuesta se estudió la adhesión de tamoxifeno y camptotecina en la cápside del BMV. Los resultados obtenidos demuestran que se logró adherir tamoxifeno y camptotecina en el interior de la cápside viral. Para 200 µg de BMV y concentraciones de tamoxifeno de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/ml se obtuvo un atrapamiento de 0.52, 1.43, 3.59, 7.59, 22.39 y 61.46 µg/ml respectivamente. Para concentraciones de camptotecina de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/ml se obtuvo un atrapamiento de 2.81, 8.79, 16.84, 39.86, 84.09 y 160.89 µg/ml respectivamente. El diámetro de los nanovehículos fue directamente proporcional en relación a la concentración de fármaco utilizado, obteniendo diámetros entre 28 a 33 nm para tamoxifeno y de 28 a 36 nm para camptotecina. El número de moléculas por cápside viral para la concentración más alta de tamoxifeno y de camptotecina fueron 3,805 y 10,622 respectivamente. Se realizaron ensayos de viabilidad celular para demostrar el potencial de las cápsides virales como nanovehículos de moléculas hidrofóbicas, y su posible uso en terapias contra cáncer de mama. El BMV nativo aumento la tasa de proliferación de las células MCF-7 y MDA-MB-231. BMV-tamoxifeno y BMV-camptotecina presentaron efectos citotóxicos similares en comparación al fármaco libre en células MCF-7 y MDA-MB-231. A partir de citometría de flujo se determinó el mecanismo de muerte celular del BMV-tamoxifeno. La concentración BMV-tamoxifeno 7.59 µg/ml promueve la muerte celular por apoptosis temprana. La concentración BMV-tamoxifeno 22.39 µg/ml genera un aumento en la apoptosis tardía. La concentración BMV-tamoxifeno 61.46 µg/ml genera un aumento en la muerte celular por necrosis. Los tratamientos con BMV-tamoxifeno disminuyeron la complejidad de la membrana plasmática de las células MDA-MB-231 en comparación a las que fueron traídas con tamoxifeno libre. Los tratamientos con fármacos libres generaron cristales en todos los cultivos celulares, mientras que en los tratamientos realizados a partir de cápsides virales del BMV, no se observaron cristales. Con base en lo anterior, se demuestra que la cápside del BMV es un excelente candidato para ser usado como nanovehículo de moléculas hidrofóbicas para aplicaciones en bionanotecnología y nanomedicina.

Palabras clave: BMV, motivos hidrofóbicos, tamoxifeno, camptotecina, nanovehículo.

Abstract of the thesis presented by **Juan Eduardo Pérez Sánchez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in biomedicine and bionanotechnology

BMV capsids as hydrophobic drug nanovehicle

Abstract approved by:

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Thesis Director

Correct and efficient delivery of drugs to a specific organ or site where it is required, reducing potential harmful effects to other organs, is one of the main difficulties drug-delivery technologies face currently. However, achieving specific control over drug localization and desired bioavailability keeps on being one of the most relevant challenges in nanomedicine. Particularly, drug solubility is a well-known problem given that almost half of the available pharmaceutical products are barely soluble in water. This lack of solubility reduces drug efficacy by preventing its accumulation on the desired site; thus, there is a great need to develop a nanovehicle capable of increasing hydrophobic drug-delivery efficacy. In this research project, we propose the use of virus capsids as an hydrophobic drug nanocarrier. In order to achieve our proposal, we studied the adhesion potential of tamoxifen and camptothecin to BMV capsids. The obtained results show that it is possible to attach both drugs to the interior of the viral capsid. For 200 µg of BMV and increasing concentrations of tamoxifen at 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/ml, a respective rate of adhesion of 0.52, 1.43, 3.59, 7.59, 22.39 y 61.46 µg/ml was achieved. For the same concentrations of camptothecin, the ratio of adhesion achieved was 2.81, 8.79, 16.84, 39.86, 84.09 y 160.89 µg/ml respectively. We also observed a proportional relation between the nanovehicle diameter and drug concentration. For tamoxifen, our nanovehicles presented a diameter range of 28 to 33 nm, while camptothecin adhesion produced nanovehicles with a diameter range of 28 to 36 nm. Tamoxifen and camptothecin adhesion achieved a maximum attachment of 3,805 and 10,622 molecules per capsid respectively. Furthermore, cell viability assays demonstrated the nanovehicles potential as a possible hydrophobic-drug delivery system for breast cell cancer patients. Wild-type BMV increased the proliferation rate of MCF-7 and MDA-MB-231 cells. BMV-tamoxifen and BMV-camptothecin nanovehicles presented similar cytotoxic effects compared to the free drugs. Flow cytometry assays allowed the establishment of a cell death mechanism produced by BMV-tamoxifen particles. A BMV-tamoxifen concentration of 7.59 µg/ml promotes cell death by early apoptosis. A BMV-tamoxifen concentration of 22.39 µg/ml produces an increase of late apoptosis. A BMV-tamoxifen concentration of 61.46 µg/ml increases cell death by necrosis. BMV-tamoxifen administration reduced the complexity of MDA-MB-231 cell membranes compared to treatments performed with free tamoxifen. Additionally, all free drug treatments produced crystals on all of the cell cultures, while no crystal formation was observed in BMV-drug treatments. Therefore, the results shown in this project demonstrate that BMV is an excellent candidate as an hydrophobic drug nanovehicle for bionanotechnology and nanomedicine applications.

Keywords: BMV, tamoxifen, camptothecin, nanovehicle

Dedicatoria

La concepción de este proyecto está dedicado a Dios y a mi familia. A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar. A mi familia, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento, depositando su entra confianza en cada reto que se me presentaba sin dudad ni un solo momento en mí. Sin ellos, jamás hubiera sido lo que soy ahora.

Los amo con mi vida.

Agradecimientos

- Al **Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología** por el apoyo económico brindando durante estos dos años a través del programa de becas nacionales.
- Al **Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California** por sus programas educativos de calidad y por haberme aceptado como estudiante en su institución.
- Al **Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM**, por facilitarme sus instalaciones durante la realización de este proyecto de tesis.
- A mi director de tesis, el **Dr. Rubén Cadena**, quien a lo largo todo el tiempo de conocernos ha puesto a prueba mis capacidades y conocimientos. Muchas gracias.
- A mis sinodales, la **Dra. Jimena Carrillo Tripp** y el **Dr. Israel Rocha Mendoza**, por su tiempo y disposición. De igual manera agradezco sus valiosos comentarios en la escritura de esta tesis.
- A los proyectos CONACyT: **CB-239878 y PN-247474**.
- Al **Departamento de Bionanotecnología** del CNYN, por la calidez de sus integrantes. Cada uno de ustedes me enseñó algo diferente que llevaré conmigo durante toda mi vida.
- A la **Dra. Katrin Quester** e **Ita Betanzo**, por su apoyo como técnicos de laboratorio.
- A la **Dr. Karla Oyuky, Dra. Ana Rodríguez y María Rivera** por todo su apoyo brindado al momento de realizar mis ensayos de cultivo celular.
- Al **M.C. Alfredo Nuñez** por la ayuda brindada a lo largo de este proyecto.
- Al **MC. Juan Manuel Martienez Andrade** del LNMA-CICESE UNAM por su apoyo en el TEM
- A mi buen amigo y chacal **Iván Rosales**, gracias por soportarme y estar ahí para mí incondicionalmente.
- A mi mejor amiga del posgrado **Alison Domínguez**, gracias por todas esas noches de perreo y pláticas interminables, esta maestría no hubiera sido lo mismo sin ti, sabes que te llevaré en mi corazón toda la vida.
- A mi amiga **Kendra Ramírez**. Gracias por toda la ayuda brinda en laboratorio, sabes que te admiro.
- A mi comadre **Carlos Medrano** y **Doña Karla**. A Carlos por todas las pláticas y chismes que compartimos. A Doña Karla por haberme alimentado con esos deliciosos platillos que solo ella sabe hacer.
- A mis amigos de laboratorio de los cuales no mencionare nombres, para asegurarme de no olvidar a nadie. Ustedes hicieron que el ambiente en el laboratorio fuera familiar.
- A mis compañeros de generación, por su amistad.
- A mis padres y familiares quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica, creyendo en mí en todo momento.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi

Capítulo 1. Introducción

1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Estadísticas mundiales del cáncer.....	3
1.1.2 Estadísticas del cáncer en México.....	3
1.1.3 Cáncer de mama.....	4
1.1.4 Tratamientos convencionales contra el cáncer.....	4
1.1.5 Fármacos hidrofóbicos para combatir el cáncer de mama.....	5
1.1.6 Nanovehículos de fármacos hidrofóbicos.....	7
1.1.7 Bromovirus.....	8
1.2 Justificación.....	11
1.3 Hipótesis.....	11
1.4 Objetivos.....	12
1.4.1 Objetivo general	12
1.4.2 Objetivos específico.....	12

Capítulo 2. Metodología

2.1 Producción de BMV.....	13
2.1.1 Inoculación de plantas con BMV.....	13
2.1.2 Cosecha de hojas infectadas.....	13
2.2 Purificación de BMV.....	13
2.2.1 Molienda de hojas.....	14
2.2.2 Separación de componentes celulares.....	14
2.2.3 Colchón de sacarosa.....	14

2.2.4 Gradiente de sacarosa.....	15
2.2.5 Eliminación de sacarosa.....	15
2.3 Determinación de concentración óptima de tamoxifeno por cápside viral.....	16
2.4 Inserción de tamoxifeno a cápsides virales de BMV.....	16
2.5 Cuantificación de cápsides virales con tamoxifeno.....	17
2.6 Determinación de concentración óptima de camptotecina por cápside viral.....	17
2.7 Inserción de camptotecina a cápsides virales de BMV.....	17
2.8 Cuantificación de cápsides virales con camptotecina	18
2.9 Microscopía electrónica de transmisión.....	18
2.10 Líneas celulares y condiciones de cultivo celular	19
2.10.1 Descripción de las líneas celulares.....	19
2.10.2 Mantenimiento de línea celular.....	19
2.10.2.1 Subcultivo de células MDA-MB-231 y MCF-7.....	20
2.11 Internalización del virus BMV en MCF-7 y MDA-MB-231.....	20
2.12 Ensayos de viabilidad celular.....	21
2.12.1 Ensayo MTT.....	21
2.12.2 Citometría de flujo.....	22

Capítulo 3. Resultados

3.1 Producción y purificación de BMV.....	24
3.2 Caracterización de BMV nativo.....	25
3.2.1 Dispersión dinámica de luz.....	25
3.3 Concentración óptima teórica de tamoxifeno por cápside viral.....	26
3.4 Inserción de tamoxifeno a cápsides virales.....	27
3.4.1 pH de DMSO a diferentes concentraciones.....	27
3.4.2 pH de etanol a diferentes concentraciones.....	28
3.4.3 Estabilidad del BMV a diferentes concentraciones de etanol y DMSO (Mg^{+2}).....	28
3.4.3.1 Dispersión dinámica de luz.....	29
3.4.4 Cuantificación de tamoxifeno a diferentes concentraciones.....	30
3.4.4.1 Espectrofluorimetría.....	30
3.4.5 Cuantificación de BMV a diferentes concentraciones de tamoxifeno.....	31
3.4.5.1 Espectrofluorimetría.....	32
3.4.5.2 Dispersión dinámica de luz.....	33
3.4.6 Cantidad de tamoxifeno atrapado en la cápside viral.....	34

3.4.7 Número de moléculas de tamoxifeno adheridos a la cápside de BMV.....	35
3.4.8 Microscopía electrónica de transmisión.....	36
3.5 Concentración optima teórica de camptotecina por cápside viral.....	37
3.6 Inserción de camptotecina a cápsides virales.....	38
3.6.1 Cuantificación de camptotecina a diferentes concentraciones.....	38
3.6.1.1 Espectrofluorimetría.....	39
3.6.2 Cuantificación de BMV a diferentes concentraciones de camptotecina.....	39
3.6.2.1 Espectrofluorimetría.....	40
3.6.2.2 Dispersión dinámica de luz.....	42
3.6.3 Cantidad de camptotecina atrapada en la cápside viral.....	43
3.6.4 Número de moléculas de camptotecina adheridas a la cápside de BMV.....	44
3.6.5 Microscopía electrónica de transmisión.....	45
3.7 Internalización del virus BMV en MCF-7 y MDA-MB-231.....	46
3.8 Ensayos de viabilidad celular.....	48
3.8.1 Determinación de la capacidad del BMV de inhibir la proliferación en líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.....	48
3.8.2 Determinación de la capacidad del nanovehículo BMV-TAM de inhibir la proliferación en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.....	49
3.8.3 Determinación de la capacidad del nanovehículo BMV-TAM de inhibir la proliferación en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 a diferentes tiempos....	51
3.8.4 Determinación de la capacidad del nanovehículo BMV-CPT de inhibir la proliferación en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.....	53
3.8.5 Análisis de la muerte celular por apoptosis y necrosis.....	54
3.8.6 Análisis morfológico de las líneas celulares.....	56
Capítulo 4. Discusión	
4.1 Discusión.....	60
Capítulo 5. Conclusiones	
5.1 Conclusiones.....	68
Literatura citada	69
Anexos	74

Lista de figuras

Figura		Página
1	Estructura química de análogos de camptotecina.....	6
2	Espectro de emisión de fluorescencia de sistemas fármaco-quitosano.....	8
3	Estructura de la cápside viral del CCMV.....	9
4	Estructura de la cápside del BMV.....	10
5	Producción y purificación de BMV.....	24
6	Distribución de tamaño por volumen para BMV nativo.....	25
7	Gráfica de pH contra diferentes concentraciones de DMSO.....	27
8	Gráfica de pH contra diferentes concentraciones de etanol.....	28
9	Gráfica de tamaño contra diferentes concentraciones de solventes para BMV.....	29
10	Gráficas de emisión de fluorescencia del tamoxifeno.....	31
11	Gráficas de emisión de fluorescencia de tamoxifeno y BMV-tamoxifeno.....	32
12	Gráfica de tamaño contra diferentes concentraciones de BMV-tamoxifeno.....	33
13	Concentración de tamoxifeno atrapado en la cápside de BMV.....	34
14	Graficas de número de moléculas de tamoxifeno adheridos en la cápside del BMV a diferentes concentraciones.....	36
15	Micrografías electrónicas de transmisión de BMV-tamoxifeno.....	37
16	Graficas de emisión de fluorescencia de camptotecina.....	39
17	Graficas de emisión de fluorescencia de camptotecina y BMV-camptotecina.....	41
18	Gráfica de tamaño contra diferentes concentraciones de camptotecina.....	42
19	Concentración de camptotecina atrapada en la cápside de BMV.....	43
20	Graficas de número de moléculas de camptotecina adheridos en la cápside del BMV a diferentes concentraciones.....	44
21	Micrografías electrónicas de transmisión de BMV-camptotecina.....	45
22	Microfotografías de microscopia confocal de células MCF-7.....	46

23	Microfotografías de microscopia confocal de células MDA-MB-231.....	47
24	Citotoxicidad de BMV nativo en MCF-7 y MDA-MB-231.....	48
25	Citotoxicidad de BMV-tamoxifeno en MCF-7 y MDA-MB-231.....	50
26	Citotoxicidad de BMV tamoxifeno en MCF-7 y MDA-MB-231 a diferentes horas.....	52
27	Citotoxicidad de BMV-camptotecina en MCF-7 y MDA-MB-231.....	54
28	Gráficas de muerte celular obtenidas por citometría de flujo para MDA-MB-231.....	55
29	Cambios en la morfología celular en MCF-7 después de 24 horas de tratamientos.....	58
30	Cambios en la morfología celular en MDA-MB-231 después de 24 horas de tratamientos.....	59
31	Predicción de las estructuras secundarias presentes en la proteína de cápside del CCMV.....	78
32	Predicción de las estructuras secundarias presentes en la proteína de cápside del BMV.....	79
33	Diagrama de puntos.....	80
34	Overton.....	81

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Valores de las concentraciones de tamoxifeno y BMV-tamoxifeno que inhiben el crecimiento celular un 50% o un 75% en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.....	49
2	Valores de las concentraciones de camptotecina y BMV-CPT que inhiben el crecimiento celular un 50% o un 75% en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.....	53
3	Concentración de los tratamientos añadidos a MCF-7 y MDA-MB-231. Ensayo MTT...	74
4	Concentración de los tratamientos añadidos a MDA-MB-231. Citometría de flujo.....	75
5	Cantidad de fluoróforo añadido en la línea celular MDA-MB-231.....	76
6	Cantidad y tipo de estructuras secundarias presentes en la cápside viral del CCMV.....	76
7	Cantidad y tipo de estructuras secundarias presentes en la cápside viral del BMV.....	77

Capítulo 1. Introducción

La nanotecnología se define como el estudio y la aplicación de materiales a escala nanométrica (Pájaro Castro, Olivero Verbel, & Redondo Padilla, 2013). Existe un creciente optimismo de que la nanotecnología, aplicada a la biotecnología, implicará avances significativos en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades (Saini & Sharma, 2010). Las aplicaciones anticipadas de la nanotecnología incluyen la administración dirigida de fármacos (Duncan, 2003).

El desafío principal en la entrega de fármacos es lograr que éstos se localicen en el sitio u órgano específico que se requiere, evitando de esta manera los efectos secundarios adversos a otros órganos (Tomellini, 2005). La capacidad de controlar y dirigir la administración de fármacos es crítica para un tratamiento eficaz. Sin embargo, la falta de control sobre la localización específica y, por lo tanto, la biodisponibilidad deseada sigue siendo uno de los retos más importantes en el área biotecnológica (De Jong & Borm, 2008). En particular, la solubilidad del fármaco es un problema relevante, puesto que casi la mitad de los productos farmacéuticos actuales son poco solubles en agua. Esta falta de solubilidad disminuye considerablemente su rendimiento, ya que solamente una fracción del fármaco se acumula en la región deseada (Allen & Cullis, 2004).

En la actualidad existen nuevas plataformas de nanovehículos que presentan un gran potencial para mejorar el envío, entrega y eficiencia de diversos medicamentos. Estos sistemas además previenen la degradación prematura del fármaco y mejoran su absorción en tejidos deseados (Peer, 2007). Las plataformas de nanovehículos que han sido ampliamente estudiados son: dendrímeros, liposomas, micelas y virus (Ma, Nolte, & Cornelissen, 2012). Mientras que los portadores semisintéticos (dendrímeros, liposomas y micelas) ofrecen ciertas ventajas y desventajas, en términos de biocompatibilidad, farmacocinética, toxicidad e inmunogenicidad, los virus se destacan como sistemas transportadores moleculares ideales (Steinmetz, 2010; Wen, Rambhia, French, & Steinmetz, 2013).

Los virus son entidades submicroscópicas infecciosas que en el caso más sencillo constan solamente de material genético protegido por una capa de proteínas llamada cápside viral. Los virus que infectan plantas son particularmente útiles ya que son de naturaleza ubicua, biodegradables, biocompatibles y no peligrosos en humanos. Las cápsides de este tipo de virus presentan una morfología icosaédrica y filamentosa. Las partículas icosaédricas varían en tamaño desde 18 a 500 nanómetros, mientras que las filamentosas pueden alcanzar hasta 2 μm de longitud (Kaiser, 2007; Singh, 2007).

Hace aproximadamente 20 años, los virus se definieron por primera vez como nanopartículas virales (VNP). Los VNP son plataformas altamente prometedoras para el diseño de nanovehículos de entrega seguros, ya que permiten que componentes funcionales como fármacos, moléculas y nanomateriales sintéticos se adhieran a la cápside viral, lo que permite el desarrollo de dispositivos para aplicaciones médicas como la administración de medicamentos dirigidos. Desde el punto de vista de la ciencia de materiales, las nanopartículas virales son interesantes ya que se pueden producir fácilmente en el laboratorio. Las partículas resultantes son de tamaño nanométrico y generalmente son simétricas, polivalentes y monodispersas (van Kan-Davelaar, van Hest, Cornelissen, & Koay, 2014).

La función principal de la cápside es encerrar y proteger los ácidos nucleicos, aumentando su resistencia a temperaturas y pH extremos. Debido a que la cápside de las nanopartículas virales está compuesta principalmente de proteínas, sus superficies pueden funcionalizarse con moléculas o ligandos apropiados para dirigirlos a tejidos y células específicas dentro del cuerpo (Lockney et al., 2011). Los poros en la estructura de la cápside permiten que pequeñas moléculas se difundan entre el medio externo y el interior de la cápside. La adhesión de las moléculas dentro y fuera de la cápside se puede lograr mediante unión covalente, interacción hidrofóbica, interacciones electrostáticas e interacción con los ácidos nucleicos encapsidados. Todos estos nuevos desarrollos están dirigidos a mejorar el rendimiento de diversas moléculas, entre ellas las de naturaleza hidrofóbica, haciéndolas más biocompatibles, solubles en agua, mostrando una toxicidad reducida y eficiencias de absorción elevadas (Pokorski & Steinmetz, 2011).

Este trabajo de investigación tiene como principal propósito utilizar la cápside viral del BMV (*Brome mosaic virus*, por sus siglas en inglés) como nanovehículo de fármacos hidrofóbicos, en específico, se usaran como modelo los fármacos hidrofóbicos tamoxifeno y camptotecina. De igual manera se analizará la actividad antiproliferativa de estos nanovehículos funcionalizados sobre las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7.

1.1 Antecedentes

El cáncer es un término que agrupa varias enfermedades similares. En cualquier tipo de cáncer se observa un proceso descontrolado en la división de las células de un tejido inicial. La producción excesiva de células promueve la generación de tumores que pueden invadir otros tejidos y órganos si no son tratados a tiempo. El proceso de transformación de una célula normal a una tumoral se produce a través

de mutaciones en el ADN de una célula, que a su vez transmite esas alteraciones a sus descendientes. Estas modificaciones se producen en varias fases, y consisten en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno debido a la desactivación de los mecanismos de control celular (Hassanpour & Dehghani, 2017).

1.1.1 Estadísticas mundiales del cáncer

Actualmente el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial. Este padecimiento se encuentra por detrás de las enfermedades cardiovasculares en países desarrollados, y de las enfermedades infecciosas en países en vías de desarrollo. Las estadísticas sugieren que el número de casos reportados ha aumentado debido al envejecimiento de la población, estilo de vida sedentaria y hábitos alimenticios pocos saludables. Los tipos de cáncer más frecuentes son el cáncer de pulmón, hígado, estomago, colon y mama (OMS, 2016a).

La organización mundial de la salud (OMS), indico que en el año 2015 fallecieron aproximadamente 8.8 millones de personas debido a algún tipo de cáncer, lo cual representó el 15.6% del total de muertes en ese año. Debido a que se estima que para el año 2035 los casos nuevos de cáncer aumenten un 70%, las acciones para su prevención y tratamiento han cobrado especial relevancia en el sector salud (OMS, 2016b).

1.1.2 Estadísticas del cáncer en México

En México, el cáncer se encuentra en tercer lugar como causa de muerte. La Secretaria de Salud en 2016, registro más de 128,000 casos nuevos en todo el país y el 60% se detectó en etapas avanzadas de la enfermedad. En la población adulta los tipos más frecuentes de cáncer son el de próstata, mama, cervicouterino, pulmón, hígado y estómago. Por sexo, el cáncer de próstata es el más común en varones, mientras que en mujeres el cáncer de mama predomina. Aunque las instituciones de salud pública se esfuerzan por diagnosticar y atender a las personas con cáncer, muchos mexicanos mueren anualmente a causa de esta enfermedad (INEGI, 2017).

1.1.3 Cáncer de mama

En México, el cáncer de mama ocupa en la actualidad el primer lugar en incidencia de las neoplasias malignas en las mujeres, representa 11.34% de todos los casos de cáncer. Constituye una entidad muy heterogénea que se puede clasificar según los tipos histológicos, características biológicas o a partir de su perfil genético (Claudia Arce, 2011).

La glándula mamaria es un tejido que consiste en un arreglo de 15 a 18 lóbulos y una red de ductos ramificados que terminan en el pezón. Cada lóbulo posee entre 20 y 40 lobulillos, los cuales se concentran en un ducto terminal, siendo el conjunto de estos la unidad funcional de la glándula mamaria (Smalley & Ashworth, 2003). El cáncer que se origina y progresa estimulado por la acción de hormonas se le denomina hormono-dependiente. Tal es el caso de algunos cánceres de mama que responden a la acción de los estrógenos. El estradiol (E2) es uno de los principales estrógenos implicados en la carcinogénesis. El receptor de estrógenos (ER) está implicado en la proliferación del cáncer de mama, debido a que el 70% de este tipo de cánceres son hormono-dependiente. El cáncer de mama se ha clasificado en dos grupos principales dependiendo de la expresión del receptor de estrógenos (RE+) o su ausencia (RE-), estando el estado del RE relacionado con vías de expresión genética diferentes (Valadares et al., 2012).

1.1.4 Tratamientos convencionales contra el cáncer

Durante la primera mitad del siglo XX, la tasa de supervivencia de personas con cáncer no fue alta. La implementación de la quimioterapia y radioterapia fue un gran avance para su tratamiento, ya que creó nuevas posibilidades para atacar los tumores más eficientemente en conjunto con la cirugía (Strebhardt & Ullrich, 2008). Algunos tratamientos convencionales para el cáncer son cirugía, quimioterapia y radioterapia. A pesar de que estos tratamientos han salvado miles de vidas alrededor del mundo, se sabe que éstos tienen varios efectos secundarios adversos que reducen la calidad de vida de los pacientes, debido a que afectan no solo a las células cancerosas sino también al tejido sano (Cravo & Mrsny, 2013). Es por este motivo que desde hace años la investigación contra el cáncer ha empleado nuevas tecnologías y métodos para encontrar un enfoque que permita mejorar la calidad de vida del paciente.

1.1.5 Fármacos hidrofóbicos para combatir el cáncer de mama

Hoy en día existe una gran gama de medicamentos que pueden ser empleados para el tratamiento y prevención de diferentes tipos de cáncer. Entre estos fármacos resaltan los utilizados en quimioterapias y terapias hormonales, los cuales pueden ser empleados para combatir el cáncer de mama. La terapia hormonal es un tratamiento eficaz para la mayoría de los tumores que dan resultado positivo para los receptores de estrógeno o progesterona (American Cancer Society, 2017). El tamoxifeno es el fármaco que se emplea usualmente en este tipo de terapias.

El tamoxifeno es un profármaco empleado en todo el mundo para el tratamiento del cáncer de mama con receptores de estrógenos (ER) positivos. Este se ha utilizado tanto en el contexto metastásico como en el adyuvante, ayudando de esta manera a reducir la tasa de mortalidad por cáncer de mama en un tercio. Las principales desventajas del tamoxifeno son su baja solubilidad y selectividad y, por ende, el uso a largo plazo de este medicamento provoca efectos secundarios adversos (Sanyakamdhorn, Agudelo, Bekale, & Tajmir-Riahi, 2016).

El tamoxifeno actúa antagonizando la acción del estradiol, por su unión al dominio de unión al ligando de ER, provocando un estado conformacional de la proteína que es incapaz de unirse al elemento de respuesta de estrógenos (ERE). Este fármaco es ampliamente metabolizado, y se han detectado varios metabolitos en el suero humano. Se metaboliza en 4-hidroxitamoxifeno (antiestrógeno más potente) y N-desmetiltamoxifeno. Estos dos metabolitos se convierten adicionalmente en endoxifeno (Castro, Arias, & Barrón, 2001). La eficacia terapéutica del tamoxifeno se determina por la distribución del fármaco en los tejidos y la disponibilidad del fármaco precursor y sus metabolitos activos en los tejidos diana. Sin embargo, el transporte efectivo de tamoxifeno y sus metabolitos a las moléculas diana tiene que ser mejorado. Por lo cual el uso de plataformas nanoestructuradas podría ayudar a resolver el problema de solubilidad de este fármaco.

La terapia más utilizada para combatir el cáncer de mama es la quimioterapia. Este tratamiento se basa en el uso de fármacos para interrumpir la formación células cancerosas, ya sea mediante su destrucción o al impedir su multiplicación (American Cancer Society, 2017). Los medicamentos frecuentes en este tipo de terapias incluyen paclitaxel, docetaxel y camptotecina (Venditto & Simanek, 2010). La camptotecina es un fármaco citotóxico que posee propiedades antiproliferativas sobre varios tumores malignos, incluyendo el cáncer de mama. Fue aislado por primera vez de la corteza de *Camptotheca acuminata* en 1958 por M.E. Wall y M.C. Wani. El mecanismo de acción de este medicamento se debe a la

inhibición del ADN topoisomerasa I. Esta es una enzima que relaja el ADN superenrollado antes de la transcripción a través de la formación de roturas de cadena simple y religación. Al unirse el fármaco a esta enzima evita la religación y causa apoptosis (Jones, Clements, Wasi, & Daoud, 1997).

La camptotecina es un alcaloide caracterizado por el sistema de anillo pentacíclico planar. Se sabe que el anillo de lactona (Figura 1-a) es el más importante de este fármaco, debido al sitio de unión que se encuentra en la topoisomerasa I. La hidrólisis o la eliminación del anillo E de lactona conduce a la pérdida de toda actividad de la molécula. Originalmente, este fármaco se entregó como sal de sodio de carboxilato (Figura 1-b) para ayudar a superar los problemas de solubilidad y estabilidad, sin embargo, la baja eficacia creó la necesidad de nuevas alternativas. Para superar los problemas de solubilidad y estabilidad asociados con la camptotecina, se han desarrollado varios derivados, entre los que destacan irinotecan y topotecan. Estos derivados emplean cationes de amina terciaria para mejorar la solubilidad y estabilidad de lactona (Li, Jiang, Li, & Ling, 2017).

Alternativamente, el uso de plataformas nanoestructuradas puede utilizarse para proporcionar que estos fármacos sean solubles en agua. La incorporación de estos fármacos en cualquier plataforma se lleva a cabo con la intención de superar las limitaciones que impiden una aplicación clínica amplia, que incluye una baja solubilidad, rápida eliminación, alta toxicidad sistémica y escasa selectividad hacia las células cancerosas.

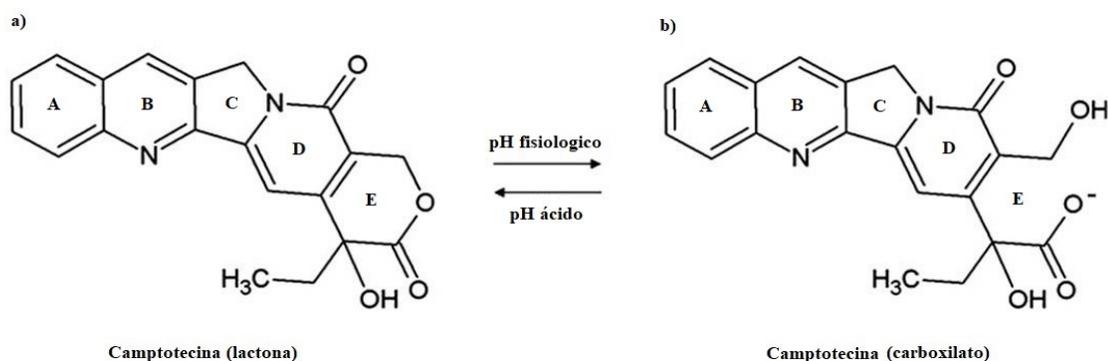


Figura 1. Estructura química de análogos de camptotecina. a) Camptotecina en su forma lactona (activa). b) Camptotecina en su forma carboxilato (inactiva). Imagen modificada de (Li et al., 2017).

1.1.6 Nanovehículos de fármacos hidrofóbicos

Existe un sinnúmero de estudios sobre el uso de distintas plataformas de nanovehículos para mejorar la eficiencia de diferentes fármacos solubles. Sin embargo, la información reportada sobre plataformas para transportar fármacos hidrofóbicos es escasa. Las plataformas de nanovehículos que han sido ampliamente estudiados para transportar fármacos hidrofóbicos son liposomas, micelas y nanopartículas (Ma, 2012). Entre estos se destaca el uso de nanopartículas de quitosano y nanolipoesferas para la encapsidación de fármacos hidrofóbicos utilizados en la prevención y tratamiento de cáncer de mama.

El quitosano es un polímero natural obtenido por la desacetilación de la quitina. Las nanopartículas de quitosano han ganado más atención como plataformas de administración de fármacos debido a su baja toxicidad y mejor estabilidad. La investigación de las propiedades fisicoquímicas y biológicas del quitosano ha llevado al reconocimiento de este polisacárido catiónico, como un polímero natural para la entrega de fármacos (Agudelo, Sanyakamdhorn, Nafisi, & Tajmir-Riahi, 2013).

En 2013 Daniel Agudelo, *et al.* estudiaron la encapsulación de tamoxifeno y sus metabolitos en nanopartículas de quitosano, con el fin de evaluar la eficacia de estos en la administración de fármacos hidrofóbicos. Utilizaron fotoblanqueado de fluorescencia para caracterizar la naturaleza de la interacción entre el tamoxifeno y la nanopartícula de quitosano. Encontraron que la intensidad de la fluorescencia disminuía al aumentar la concentración de quitosano en la solución (Figura 2). Esto es debido a que cuando el fármaco interactúa con el quitosano, la fluorescencia del fármaco puede cambiar dependiendo del impacto de tal interacción en la conformación del fármaco, o mediante el efecto de fotoblanqueado directo. La investigación de Agudelo será fundamental para llevar a cabo tanto la inserción como la cuantificación de tamoxifeno en cápsides virales.

Por otra parte, las nanolipoesferas encapsuladas son nanovehículos que presentan un tamaño y forma controlados y están hechos de componentes intrínsecamente biocompatibles. La composición de estos vehículos se basa en lipoproteínas, partículas endógenas que transportan grasas y lípidos a través de la sangre a las células. La estructura básica de las lipoproteínas consiste en una monocapa exterior de fosfolípidos mezclada con apolipoproteínas, con una superficie externa hidrófila y un comportamiento hidrofóbico interior el cual permite la estabilización y encapsidación de fármacos hidrofóbicos, como la camptotecina (Loredo-Tovias et al., 2017).

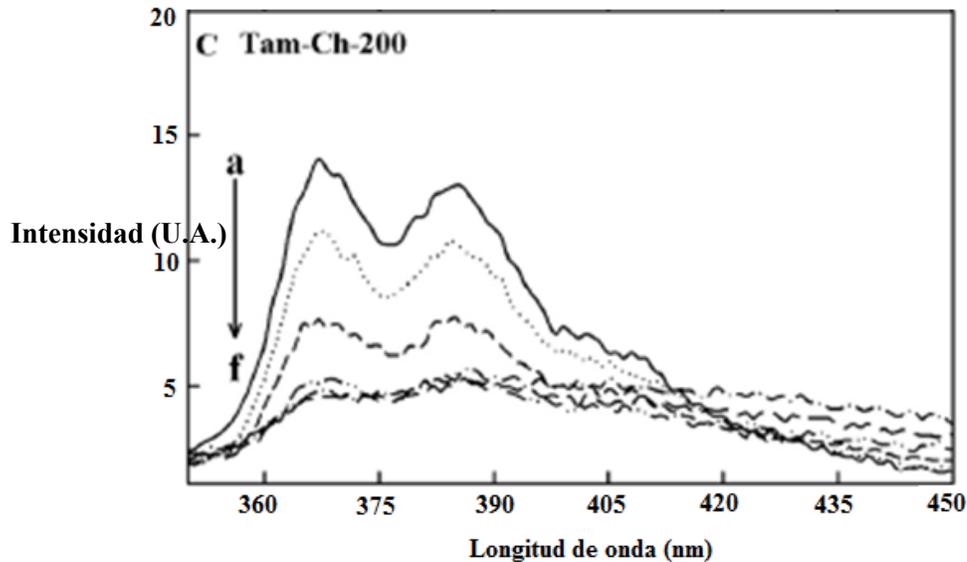


Figura 2. Espectro de emisión de fluorescencia de sistemas fármaco-quitosano. C) tamoxifeno-quitosano 200 nm: (a) tamoxifeno libre (30 mM), (b-f) con quitosano a 3, 5, 7, 20 y 30 mM. Imagen modificada de (Agudelo et al., 2013).

En 2017 Loredó-Tovias, *et al.* reportaron la encapsulación de camptotecina en nanolipoesferas para su uso como nanovehículo. Durante el proceso de síntesis de sus nanolipoesferas utilizaron microfluidización para tener un buen control del tamaño y polidispersidad de sus nanovehículos, y así imitar las propiedades físicas de las lipoproteínas de baja densidad naturales de una mejor manera. Las nanolipoesferas que obtuvieron presentaron una carga superficial negativa y un núcleo hidrofóbico que permitió la encapsulación y estabilización de la camptotecina. En los resultados reportados encontraron que las nanolipoesferas cargadas son inestables por sí solas ya que su tamaño aumenta con el tiempo, por lo cual estas se encapsidaron utilizando la proteína de la cápside del virus CCMV (*Cowpea chlorotic mottle virus*, por sus siglas en inglés). La encapsidación de estas nanolipoesferas cargadas en la cápside viral del CCMV les brindó una buena estabilidad con el paso del tiempo. La investigación de Loredó-Tovias será fundamental para llevar a cabo la cuantificación de camptotecina en cápsides virales.

1.1.7 Bromovirus

En la actualidad, los virus que infectan plantas se han destacado como sistemas portadores moleculares ideales, ya que son de naturaleza ubicua, biodegradables, biocompatibles y no infecciosos en humanos. Entre este tipo de virus se encuentra el género bromovirus. Bromovirus es un género

perteneciente a la familia *Bromoviridae* en el cual las plantas sirven como huéspedes naturales. Hay actualmente seis especies en este género. Las dos especies más estudiadas y relacionadas filogenéticamente de este género son el BMV y CCMV. Estos son virus icosaédricos pequeños con un diámetro externo de 28 nanómetros. El contenido de ARN de ambos es aproximadamente el 22%, y el resto de la masa del virión es proteína. El N-terminal de la proteína de ambos virus está acetilado mientras que en el C-terminal hay una arginina en el BMV y una tirosina en el CCMV, brindándoles diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas (Speir, Munshi, Wang, Baker, & Johnson, 1995).

El CCMV es un virus que infecta el caupí, fue el primer virus icosaédrico en ser reensamblado *in vitro* desde la proteína de la cápside purificada y el ARN aislado para crear un virión biológicamente activo. La estructura de la cápside icosaédrica del CCMV está formada por 180 proteínas de cubierta idénticas agrupadas en 20 y 12 unidades hexaméricas y pentaméricas respectivamente, produciendo un diámetro de la cápside de aproximadamente 28 nanómetros, tal y como se muestra en la Figura 3. La proteína de cubierta tiene un peso molecular de 19.8 kDa. El interior de la cápside tiene un diámetro aproximado de 21 nanómetros y tiene un potencial electrostático fuertemente positivo, mientras que el exterior de la superficie de la cápside tiene un ligero potencial electrostático negativo (Lavelle, Michel, & Gingery, 2007).

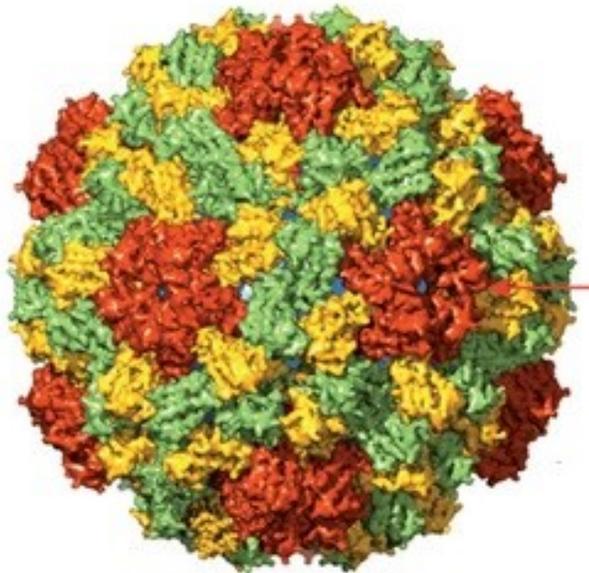


Figura 3. Estructura de la cápside viral del CCMV. Las unidades pentaméricas están representadas en naranja mientras que los hexámeros en verde y amarillo. Modificado de (Maye, 2013)

El CCMV es estable a valores de pH entre 3 y 6, donde este virus existe en su estado nativo. Mientras que a pH 7 y fuerza iónica baja (0.1 M), la cápside se hincha cerca del 10%, y se recupera el estado nativo del virus cuando se reduce el pH a 5 (Speir et al., 1995). El ensamblaje de la cápside no es dependiente de una secuencia específica de ARN, y es posible reensamblar las proteínas de cubierta para formar VLPs vacías *in vitro*. Aunque las VLPs se pueden formar *in vitro*, éstas son menos estables que sus contrapartes que contienen ARN y no exhiben el mismo comportamiento de expansión (Lavelle et al., 2007).

Por otra parte, el BMV es un virus que infecta a muchas especies de gramíneas y puede transferirse fácilmente de manera mecánica. Al igual que el virus CCMV, este se compone de 180 subunidades protéicas idénticas dispuestas sobre una red icosaédrica. Tiene un diámetro aproximado de 28 nanómetros en su estado nativo a pH bajo (<6.0) y en presencia de acetato de magnesio (Figura 4). Estas subunidades están compuestas de 189 residuos de aminoácidos, con un segmento N-terminal positivo (Lucas, Larson, & McPherson, 2002).

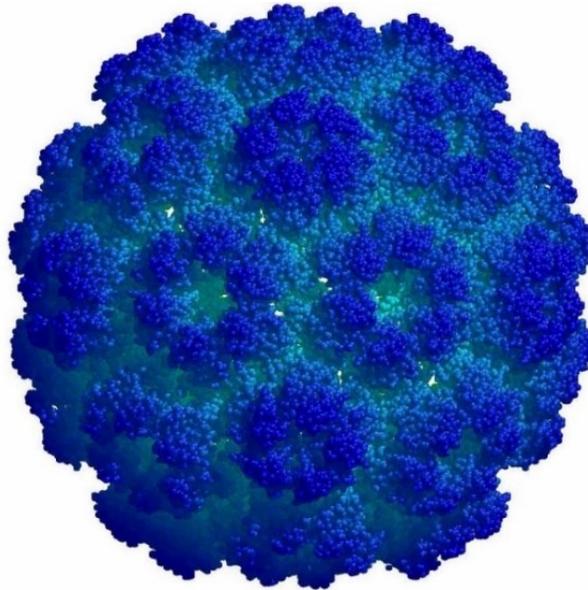


Figura 4. Estructura de la cápside del BMV. Las unidades pentaméricas y hexaméricas están representadas por el mismo color azulado. Imagen tomada de (Lucas et al., 2002)

Los viriones del BMV experimentan transiciones estructurales en función del pH, la fuerza iónica y la temperatura. Los cambios en la temperatura o el pH pueden inducir una hinchazón en la estructura del virus, que es parcialmente irreversible en ausencia de cationes divalentes. Las interacciones proteína-ARN son de vital importancia para el ensamblaje del BMV (Sgro, Jacrot, & Chroboczek, 1986).

A pesar de que ambas cápsides virales se han utilizado para encapsidar material exógeno, el virus BMV se ha destacado como nanovehículo de fármacos hidrofóbicos. En un estudio previo *in silico* se determinó que la cápside viral del CCMV presentaba 1260 motivos hidrofóbicos mientras que la del BMV 1620. La cápside viral del BMV presenta 360 motivos hidrofóbicos más en comparación con la del CCMV, lo cual permitirá que este virus sea una mejor plataforma para ser utilizada como nanovehículo de moléculas hidrofóbicas (Pérez-Sánchez, 2017).

1.2 Justificación

La incidencia de cáncer en la población mundial aumenta dramáticamente; la mortalidad a causa de esta enfermedad es muy alta y se estima que anualmente hay más de 6 millones de muertes causadas por algún tipo de cáncer en el mundo. Entre estas patologías, el cáncer de mama es uno de los más frecuentes entre la población femenina. Una de las principales formas de tratamiento del cáncer de mama es por medio de la quimioterapia. Sin embargo, estos tratamientos resultan ser muy tóxicos para el individuo bajo tratamiento. La mayoría de los fármacos utilizados para tratar este tipo de cáncer es de naturaleza hidrofóbica, esta falta de solubilidad disminuye considerablemente su rendimiento. Considerando lo anterior, en este trabajo se pretende desarrollar un nanoacarreador de fármacos hidrofóbicos basado en cápsides virales. Permitiendo de esta manera contrarrestar la falta de solubilidad de estos fármacos y, por ende, aumentar el rendimiento de estos medicamentos.

1.3 Hipótesis

Las cápsides virales del BMV pueden ser utilizadas como nanovehículos de fármacos anticancerígenos hidrofóbicos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Diseñar un nanovehículo de fármacos hidrofóbicos a partir de la cápside de un bromovirus, usando como modelo el BMV.

1.4.2. Objetivos específicos

- Producir y purificar BMV.
- Desarrollar un protocolo para cargar con tamoxifeno las cápsides virales de BMV.
- Desarrollar un protocolo para cargar con camptotecina las cápsides virales de BMV.
- Evaluar la actividad antiproliferativa de las cápsides cargadas con tamoxifeno en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.
- Evaluar la actividad antiproliferativa de las cápsides cargadas con camptotecina en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Producción de BMV

2.1.1 Inoculación de plantas con BMV

Los viriones fueron amplificados en plantas de cebada (*Hordeum vulgare*), el cual funge como huésped natural del BMV. La siembra se realizó en un invernadero, utilizando tierra enriquecida con fertilizantes. Se sembraron 10 semillas de cebada por maceta, las cuales fueron regadas cada tercer día.

Una vez transcurridas dos semanas posteriores a la germinación, se procedió a realizar la inoculación mecánica. Se provocó daño sobre las hojas de la planta mediante raspado con fibra de lana de acero superfina, para posteriormente aplicar 20 μl de virus BMV a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, el cual se esparció en el área de la herida.

2.1.2 Cosecha de hojas infectadas

Dos semanas después de realizar la inoculación, se cosecharon las hojas que presentaban síntomas típicos de infección, particularmente clorosis en forma de franjas lineales a lo largo de las hojas. Las hojas fueron cortadas sin afectar el tallo, y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, documentando el peso total de cada cosecha.

2.2 Purificación de BMV

La metodología de extracción utilizada en este proyecto consiste en una modificación del protocolo desarrollado por Cadena-Nava y Comas-García (2009) para la purificación de CCMV.

2.2.1 Molienda de hojas

En una licuadora marca Oster, se molieron hojas infectadas con solución amortiguadora de extracción (acetato de sodio 0.5 M, acetato de magnesio 0.08 M, pH 4.5) y 1% (v/v) de β -mercaptoetanol, permitiendo liberar el virus mediante lisis celular. El extracto homogéneo obtenido fue posteriormente filtrado empleando una gasa fina con el fin de remover los restos sólidos de la mezcla. El material sólido fue devuelto a la licuadora para repetir la molienda, para de esta manera maximizar la cantidad de virus recuperado.

2.2.2 Separación de componentes celulares

Se adicionó un volumen igual de cloroformo al filtrado obtenido, y la solución se vació en tubos de teflón. Las muestras fueron balanceadas y se centrifugaron en el rotor JA-14 a 8,000 rpm durante 40 minutos a 4°C en una centrifugadora marca Beckman, modelo JXN-26. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones durante 25 minutos, recuperando el sobrenadante y colocándolo en un vaso de precipitado en agitación constante durante 60 minutos a 4 °C para evaporar el excedente de cloroformo.

2.2.3 Colchón de sacarosa

Se colocaron 10 ml de la solución anterior en tubos para ultracentrífuga de 38.5 ml Beckman Coulter y se colocó un volumen de 5 ml de sacarosa 10% (w/v) en el fondo de cada tubo utilizando una pipeta Pasteur de 20 cm de largo, formando dos fases. Se balancearon los tubos y se centrifugaron en el rotor de ángulo variable SW-32 Ti a 30,000 rpm durante dos horas a 4 °C en una ultracentrífuga Beckman modelo Optima XPN-100. Se recuperó el pellet, e inmediatamente se resuspendió con 100 μ L de solución amortiguadora de suspensión de virus (acetato de sodio 50 mM, acetato de magnesio 8 mM, pH 4.5).

2.2.4 Gradiente de sacarosa

En tubos para rotor SW-32 Ti, se colocaron 25 ml de solución de sacarosa 25% (w/v) y se congelaron a -80 °C durante una hora y después se descongelaron a 4 °C. El proceso se repitió dos veces adicionales hasta generar un gradiente continuo de sacarosa del 5% al 40%.

Con una micropipeta, se colocó el virus recuperado en el paso anterior en la parte superior del gradiente, repartiendo un volumen equivalente por tubo. Los tubos fueron centrifugados en el rotor SW-32 Ti a 30,000 rpm durante 120 minutos a 4 °C. Se trasladaron los tubos a un cuarto oscuro y, utilizando una linterna, se observaron las bandas de color azul correspondientes al virus y se extrajeron evitando perturbar el gradiente con una pipeta Pasteur de 20 cm de largo.

2.2.5 Eliminación de sacarosa

La solución recolectada fue diluida en una razón 1:4 con solución amortiguadora de suspensión, y se vació en tubos para rotor SW-32 Ti para centrifugarlos a 32,000 rpm durante 180 minutos. Una vez finalizada la centrifugación, se descartó el sobrenadante inmediatamente y se recuperó el pellet. Posteriormente, se realizó una dilución 1:20 con solución amortiguadora de suspensión y se determinó la concentración y pureza del virus utilizando un espectrofotómetro UV-Vis modelo Nanodrop 200c, de la marca Thermo Scientific. Se trabajó con los valores de absorbancia en las longitudes de onda de A_{280} y A_{260} . Se consideraron como óptimas aquellas muestras cuyo valor de absorbancia $A_{260/280}$ fuera mayor a 1.5, y cuya concentración fuera mayor a 1 mg/ml. Finalmente, se prepararon alícuotas de 2 mg/ml en tubos eppendorf de 1.5 ml y se almacenaron a -80 °C.

Para determinar la concentración del virión, se utilizó el método reportado por Warburg y Christian en 1983. El cual consiste en obtener el espectro UV del virión, y usar las absorbancias A_{260} y A_{280} . El pico principal de absorbancia para un virus, debe encontrarse a una longitud de onda de 260 nm, debido a los ácidos nucleicos, en este caso ARN para el BMV, y este tiene una contribución mayor que la de la proteína (en relación a su peso). El coeficiente de extinción molar (ϵ) es $27,013,000 M^{-1} cm^{-1}$ y $b = 1 cm$ (longitud del camino óptico a través de la solución) (Brumfield et al., 2004). Utilizando la ley de Lambert-Beer podemos obtener la concentración en mol/L, como se describe en la ecuación (1).

$$c = \frac{A_{260}}{b \text{ (cm)} \cdot \epsilon \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1})} [\text{=}] \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

Para obtener la concentración del virión en mg/ml, el resultado de la ecuación (1) se multiplica por el peso molecular del virión, $4.6 \times 10^6 \text{ g/mol}$, obteniendo la ecuación (2) que nos determina la concentración del virus en mg/ml.

$$C = \frac{A_{260}}{5.8} \quad (2)$$

La pureza del virus BMV, está relacionada con la proporción de ácidos nucleicos y de proteína en la muestra, es decir $A_{260/280}$ debe estar en un rango de 1.5 a 1.7 para ser considerada como pura.

2.3 Determinación de concentración óptima de tamoxifeno por cápside viral.

La concentración óptima de tamoxifeno por cápside viral se determinó teóricamente a partir del número de motivos hidrofóbicos que contiene la cápside viral del BMV, el peso molecular del tamoxifeno y la cantidad de virus a utilizar.

2.4 Inserción de tamoxifeno a cápsides virales de BMV

Para llevar a cabo la inserción del tamoxifeno a la cápside viral del BMV se utilizaron 37.15 mg del profármaco, el cual fue diluido en 10 ml de DMSO, para obtener una solución (1) 10 mM (3.715 mg/ml). Una vez obtenido el tamoxifeno en dilución se procedió a la inserción de este en el virus BMV. Se colocaron en seis tubos eppendorf de 1.5 ml concentraciones de la solución de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Posteriormente, se agregaron 200 μg de virus BMV a cada uno de los tubos y se recubrieron completamente con aluminio. Después se dejaron en agitación suave por 2 horas en el LabRoller en total oscuridad, para permitir que el tamoxifeno se adhiriera a los sitios hidrofóbicos de la cápside viral del BMV. Para retirar las moléculas de tamoxifeno que no se habían adherido a la cápside viral las muestras fueron ultrafiltradas utilizando filtros Amicon® de 100 kDa. Las condiciones de la centrifuga Heraeus multifuge X1R fueron las siguientes: 14,000 g por 20 minutos para quitar el exceso de

tamoxifeno de las muestras, y 1,000 g por 5 minutos al momento de voltear el filtro para recuperar las cápsides virales funcionalizadas con tamoxifeno.

2.5 Cuantificación de cápsides virales con tamoxifeno

La cuantificación de las cápsides virales del BMV marcadas con el profármaco tamoxifeno se realizó por medio de espectrofluorimetría. Las condiciones del espectrofluorímetro Cary Eclipse de Agilent para realizar la cuantificación del profármaco fueron las siguientes: longitud de onda de excitación 270 nm, apertura 5 nm, fotomultiplicador y barrido medio, filtro de excitación auto y filtro de emisión abierto.

El tamaño de las cápsides virales funcionalizadas con tamoxifeno se determinó por dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés). Se agregaron 50 μ L de las partículas funcionalizadas en celdas UV-Cuvette micro, y se utilizaron los parámetros de medición para proteínas.

2.6 Determinación de concentración óptima de camptotecina por cápside viral.

La concentración óptima de camptotecina por cápside viral se determinó teóricamente a partir del número de motivos hidrofóbicos que contiene la cápside viral del BMV, el peso molecular de la camptotecina y la cantidad de virus a utilizar.

2.7 Inserción de camptotecina a cápsides virales de BMV

Para llevar a cabo la inserción de camptotecina a la cápside viral del BMV se utilizaron 15 mg del fármaco, el cual fue diluido en 5 ml de DMSO, para obtener una solución (1) 8.61 mM (3 mg/ml). Una vez obtenida la camptotecina en dilución se procedió a la inserción de este en el virus BMV. Se colocaron en seis tubos eppendorf de 1.5 ml concentraciones de la solución de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 μ g/ml respectivamente. Posteriormente, se agregaron 200 μ g de virus BMV a cada uno de los tubos y se recubrieron completamente con aluminio. Después se dejaron en agitación suave por 2 horas en el

LabRoller en total oscuridad, para permitir que la camptotecina se adhiriera a los sitios hidrofóbicos de la cápside viral del BMV. Para retirar las moléculas de camptotecina que no se habían adherido a la cápside viral las muestras fueron ultrafiltradas utilizando filtros Amicon® de 100 kDa. Las condiciones de la centrifuga fueron las siguientes: 14,000 g por 20 minutos para quitar el exceso de camptotecina de las muestras, y 1,000 g por 5 minutos al momento de voltear el filtro para recuperar las cápsides virales funcionalizadas con camptotecina.

2.8 Cuantificación de cápsides virales con camptotecina

La cuantificación de las cápsides virales del BMV marcadas con camptotecina se realizó por medio de espectrofluorimetría. Las condiciones del espectrofluorímetro Cary Eclipse de Agilent para realizar la cuantificación del fármaco serán las siguientes: longitud de onda de excitación 370 nm, apertura 5 nm, fotomultiplicador y barrido medio, filtro de excitación auto y filtro de emisión abierto.

El tamaño de las cápsides virales funcionalizadas con camptotecina se determinó por DLS. Se agregaron 50 μL de las partículas funcionalizadas en celdas UV-Cuvette micro, y se utilizaron los parámetros de medición para proteínas.

2.9 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las cápsides virales del BMV funcionalizadas con camptotecina y tamoxifeno fueron analizadas por microscopia electrónica de transmisión respectivamente. Las muestras se prepararon de acuerdo al protocolo descrito por (Cadena-Nava et al., 2012). Primeramente, las muestras fueron depositadas en una rejilla de cobre de 400 con película de soporte de carbón tipo B de la marca TED PELLA (6 μL a una concentración entre 0.2-0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Las muestras se mantuvieron en la rejilla 2 minutos y después se retiró el exceso de muestra con papel filtro Whatman grado 4. Posteriormente, se agregó a las rejillas 6 μL de acetato de uranilo al 4% y a los 2 minutos se retiró de igual manera el exceso de acetato con papel filtro. Finalmente, las rejillas fueron almacenadas en un desecador hasta que fueron analizadas por TEM. La caracterización de las muestras se realizó en un microscopio de transmisión (TEM) Hitachi HF-3300 de la Unidad de Microscopia Avanzada del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de

Ensenada (CICESE). El análisis de las micrografías electrónicas se realizó a través del programa ImageJ de NIH.

2.10 Líneas celulares y condiciones de cultivo celular

2.10.1 Descripción de las líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas fueron MDA-MB-231 y MCF-7, las cuales corresponden a tumores de glándula mamaria. La línea celular MCF-7 es una de las más utilizadas en el estudio de cáncer de mama hormono-dependiente, debido a que expresa receptores de estrógenos, andrógenos, progestágenos y glucocorticoides (Holliday & Speirs, 2011). Por otra parte, la línea celular MDA-MB-231 es una de las más utilizadas en el estudio de cáncer de mama hormono-independiente, ya que no expresa los receptores de estrógeno, progesterona y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (Liu et al., 2014). El uso de estas líneas celulares nos permitirá explorar si nuestros nanovehículos son capaces de ejercer un efecto antitumoral diferente en comparación al fármaco.

2.10.2 Mantenimiento de línea celular

Para el mantenimiento de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 se utilizó el medio de cultivo Dubecco's Modified Eagle's Medium- high glucose (DMEM-D7777) de Sigma Aldrich que contiene sales inorgánicas, aminoácidos esenciales, vitaminas, glucosa y rojo fenol. El medio se preparó al disolver 13.5 g de DMEM-D7777 en polvo en 1 L de agua desionizada previamente esterilizada. Seguidamente, se le agregaron 3.7 g de bicarbonato de sodio, 10 ml de solución antibiótica/antimicótica de Sigma Aldrich y 100 ml de suero fetal bovino inactivado de Bench-Mark Gemini. Los componentes adicionales se agregaron para enriquecer el medio de cultivo y evitar la contaminación por microorganismos. Finalmente, el medio se filtró utilizando un filtro de 0.22 μm de polietersulfona (PES) de la marca Autofil.

Los cultivos celulares se realizaron en placas de cultivo celular de 6 cm, debido a que las líneas celulares utilizadas son del tipo adherente. Las líneas celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de dióxido de carbono. Cada tercer día el medio de cultivo fue reemplazado por medio

nuevo. Cuando las células alcanzaban entre un 70 y 90% de confluencia, se procedió a subcultivar para asegurar el crecimiento exponencial de las células. El subcultivo celular permite controlar la densidad del inóculo inicial que nos asegure que trabajamos en condiciones de crecimiento óptimas. Este procedimiento involucra el desprendimiento de la monocapa en la superficie de la caja, así como la ruptura de las uniones intercelulares y extracelulares. Para lograr dicho desprendimiento se utilizó tripsina/EDTA de Sigma Aldrich que es una enzima proteolítica que rompe los enlaces de unión de las células.

2.10.2.1 Subcultivo de células MDA-MB-231 y MCF-7

Primeramente, se retiró el medio de cultivo de las cajas Petri con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío. Seguidamente se lavaron las células dos veces con buffer de fosfatos salino 1x (PBS). Posteriormente se realizó la tripsinización de las células añadiendo 0.5 ml de tripsina/EDTA y se incubaron las cajas durante 3 minutos a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo se verificó que las células se despegaran por completo de la superficie de la caja al verla a contraluz. Después la tripsina se inactivó agregando 10 volúmenes de medio de cultivo en un tubo falcón de 15 ml, y este se centrifugó a 1250 rpm por 5 min a 25°C. El sobrenadante se decantó y el pellet obtenido (células) se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo. Se tomaron 250 µL de la solución anterior y se colocaron en una caja de cultivo de 6 cm nueva con 5 ml de medio de cultivo. Por último, se colocaron las cajas en la incubadora a 37°C con 5% de CO₂. Todo el procedimiento se realizó bajo condiciones estériles, en una campa de flujo laminar.

2.11 Internalización del virus BMV en MCF-7 y MDA-MB-231

Para visualizar la internalización celular, el virus BMV se volvió fluorescente mediante la conjugación covalente de los grupos amino libres de proteínas con fluoresceína-5-isotiocianato (FITC). La conjugación de FITC se realizó siguiendo el protocolo de *Douglas, et al.* Primeramente, se marcaron 400 µg de cápside viral BMV en una solución FITC (10 µg/ml) en PBS, bajo agitación constante durante 2 horas a temperatura ambiente. El exceso de fluoróforo se eliminó mediante ultrafiltración con filtros Amicon de 100 kDa (Millipore).

De manera previa se sembró una suspensión que contenía 100,000 células MCF-7 o MDA-MB-231 en placas de 12 pozos. Después de 12 horas, el medio se eliminó por completo y las células se incubaron durante otras 12 horas en medio de cultivo sin suero fetal bovino. Las cápsides de BMV marcadas con FITC (ThermoFisher Scientific) se agregaron al cultivo celular (2 μg por pozo) y se incubaron a 37°C durante 60 minutos. Las células se lavaron utilizando PBS. La tinción de la membrana se realizó con una solución 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de FM4-64 (ThermoFisher Scientific) durante 5 minutos. La fijación celular se realizó usando paraformaldehído, seguido de 3 lavados con PBS. El núcleo se tiñó a partir de una solución 8.115 nM de HOECHST 33242 (Invitrogen) durante 10 minutos. Las células se visualizaron con un microscopio confocal FV1000 FluoView (Olympus). Las longitudes de onda utilizadas para HOECHST 33242, FM4-64 y FITC fueron 350, 515 y 490 nm respectivamente. Se capturaron células con núcleos fluorescentes (teñidas de azul), membranas fluorescentes (teñidas de rojo) y regiones invadidas por cápsides virales marcadas con FITC (teñidas de verde) con un aumento de 10x y una magnificación 3x.

2.12 Ensayos de viabilidad celular

2.12.1 Ensayo MTT

El ensayo MTT, también llamado ensayo de inhibición de la succinato deshidrogenasa es un ensayo colorimétrico que mide la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa. Está basado en la rotura del anillo de tetrazolio del MTT por diferentes deshidrogenasas mitocondriales, formándose cristales de formazán. Los cristales de formazán son insolubles en agua, pero pueden solubilizarse con disolventes orgánicos, siendo la cantidad de formazán formado proporcional al número de células proliferantes. Este ensayo se utilizó para determinar las curvas de crecimiento y la capacidad de nuestros nanovehículos de inhibir el crecimiento celular en las diferentes líneas.

Para el ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT, se colocaron 10,000 células (MCF-7 y MDA-MB-231, según sea el caso) en cada pozo de una placa de 96 pozos y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Posteriormente se agregaron a cada pozo 100 μl de las concentraciones respectivas de cápsides virales de BMV funcionalizadas con tamoxifeno y camptotecina respectivamente (tabla 3, anexos). Después, se colocaron las placas en la incubadora durante 24 horas a 37°C con 5% de CO₂. Se utilizó medio de cultivo como control positivo y DMSO como control negativo.

Una vez transcurrido el tiempo del tratamiento se descartó el medio de cultivo y se lavaron las células tres veces con solución PBS. Después se agregaron 10 μL de solución MTT (Sigma-Aldrich, Cat. M-1940) y 90 μL de medio de cultivo por pozo. Se incubaron las placas durante 3 horas a 37°C con 5% de CO_2 , protegiendo la placa de la luz. Después se solubilizaron los cristales de formazán producidos en la placa con 100 μL de isopropanol absoluto y se agitó la placa por 30 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz. Finalmente, se cuantificó el color de las muestras a 570 nm en un lector ELISA, tomando como referencia una longitud de onda de 690 nm. Se utilizó un espectrofotómetro multiskan go de ThermoFisher.

2.12.2 Citometría de flujo

La tinción con yoduro de propidio y calceína-AM permite cuantificar las células viables, apoptóticas y necróticas mediante citometría de flujo. Calceína-AM es un colorante hidrofóbico no fluorescente que es absorbido por las células vivas, siendo transportado a través de la membrana celular. Una vez dentro de la célula la actividad de las enzimas esterases transforma la calceína-AM en calceína que si es fluorescente. La calceína se retiene bien dentro de las células vivas ya que es una molécula hidrofílica, y produce una intensa fluorescencia verde. Por otra parte, la integridad de la membrana plasmática se ve comprometida en las células necróticas, de manera que al teñirlas con yoduro de propidio, este puede acceder al núcleo celular y unirse al ADN. La tinción simultánea con yoduro de propidio y calceína-AM permite discriminar las células apoptóticas de las necróticas, y de las células viables. Las células viables no presentan rotura de la membrana plasmática y es positiva para calceína-AM y negativa para yoduro de propidio. Las células en apoptosis son doble positivas para la tinción. Las células necróticas presentan pérdida de la membrana y, por lo tanto, son positivas para yoduro de propidio y negativas para calceína-AM.

Para llevar a cabo este ensayo, primero se colocaron 80,000 células de la línea celular MDA-MB-231 en cada pozo de una placa de 12 pozos, y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO_2 . Posteriormente se retiró el medio y se colocaron los controles y tratamientos de tamoxifeno adherido a las cápsidas virales (tabla 4, anexos) sobre las células, y se incubaron 24 horas a 37°C con 5% de CO_2 . Después se retiraron los tratamientos, se realizaron tres lavados con PBS, se tripsinizaron las células, se centrifugaron a 1,250 rpm durante 5 min a 25°C y se decantó el sobrenadante. Seguidamente se resuspendieron las células en PBS y se añadió calceína-AM y yoduro de propidio respectivamente (tabla 5,

anexos). Se incubaron las células a 37°C durante 30 minutos, se realizó un lavado con PBS, se centrifugaron a 1250 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron las células en 1 ml de PBS. Finalmente, se midió la intensidad del fluorocromo en el citómetro de flujo Attune NxT de Invitrogen. Para cada muestra, se recogieron al menos 7,500 eventos correspondientes a celular individuales y se utilizó el programa de citometría Attune (v2.1) para analizar los resultados.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Producción y purificación de BMV

Dos semanas posteriores a la inoculación con el virus, se cortaron las hojas *Hordeum vulgare* (cebada) que presentaron síntomas de clorosis (Figura 5-a). Se colectaron un total de 324 gramos de hojas de cebada, de los cuales 100 gramos fueron ocupados para realizar la purificación del virus BMV.

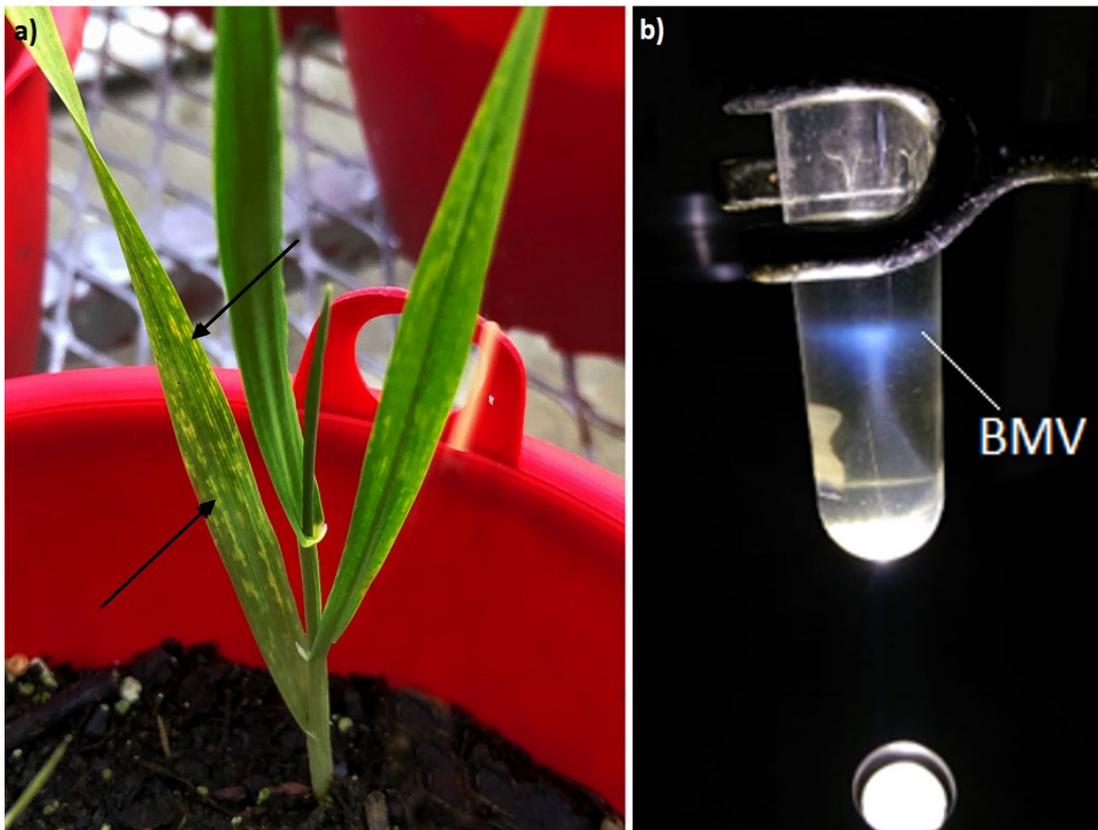


Figura 5. Producción y purificación de BMV. a) Síntomas de infección de BMV en *Hordeum vulgare* (patrón de clorosis en forma de franjas lineales amarillas). b) Gradiente de sacarosa después de ultracentrifugación, la banda de color azul contiene al virus BMV.

En la Figura 5-b se puede observar la banda de color azul correspondiente al virus BMV después de la ultracentrifugación en un gradiente continuo de sacarosa. Los resultados de la extracción y purificación del BMV, fueron caracterizados mediante un espectrofotómetro UV-vis para determinar su

pureza y concentración, obteniendo un rendimiento total de 52 mg por 100 g de hojas infectadas con una pureza de 1.6.

3.2 Caracterización de BMV nativo

3.2.1 Dispersión dinámica de luz

Se realizaron mediciones de tamaño por dispersión de luz dinámica (DLS) en el equipo Zetasizer Nano-ZS. Para esto se tomaron 50 μ l de BMV nativo (2 mg/ml) y se colocaron en una celda UV-Cuvette. En la Figura 6 se puede observar la distribución de tamaño por volumen obtenido para BMV nativo.

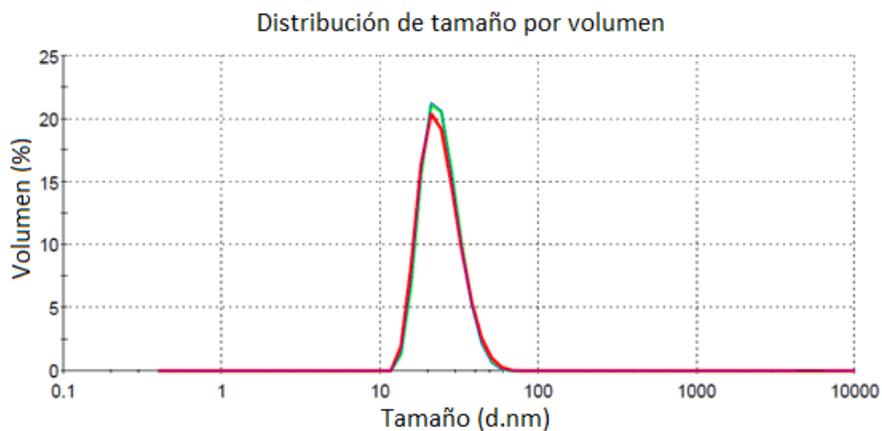


Figura 6. Distribución de tamaño por volumen para BMV nativo. El histograma se obtuvo por dispersión dinámica de luz en el equipo Zetasizer Nano-ZS. Se obtuvo un diámetro de 24.64 nm.

Las mediciones realizadas por DLS para las partículas de BMV nativo arrojaron que el 99.9% de la distribución por volumen posee un diámetro hidrodinámico de 24.64 nm \pm 1.43 nm, concordando con el reportado en la literatura (Chen, Kao, & Dragnea, 2008).

3.3 Concentración óptima teórica de tamoxifeno por cápside viral

La concentración óptima de tamoxifeno a utilizar se estimó teóricamente empleando el número de motivos hidrofóbicos presentes en la cápside viral del BMV, la cantidad de virus a utilizar (200 µg) y el peso molecular del tamoxifeno (371.515 g/mol). El cálculo se dio de la siguiente manera:

Primeramente, se dividió la concentración de virus a utilizar, en este caso 200 µg, entre el peso molecular de la cápside viral del BMV (4.6 MDa= 7.638x10⁻¹⁸ g) para determinar el número de partículas presentes.

$$\frac{200 \times 10^{-6} \text{ g}}{7.638 \times 10^{-18} \text{ g}} \approx 2.62 \times 10^{13}$$

Posteriormente, se multiplico el valor obtenido del número de partículas presentes en 200 µg de virus por los motivos hidrofóbicos de la cápside viral del BMV, y se dividió por el número de Avogadro (6.022 x 10²³ mol⁻¹) para determinar la molalidad.

$$1620 \text{ motivos } (2.62 \times 10^{13}) \approx 4.24 \times 10^{16}$$

$$\frac{4.24 \times 10^{16}}{6.022 \times 10^{23}} = 7.04 \times 10^{-8} \text{ moles}$$

El resultado anterior nos indica que se pueden adherir aproximadamente 7.04 x 10⁻⁸ moléculas en 200 µg de BMV. Finalmente, se multiplico el valor obtenido por el peso molecular del tamoxifeno.

$$7.04 \times 10^{-8} \text{ moles} \left(371.515 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) = 26.18 \text{ µg}$$

Por lo tanto, la concentración óptima teórica para que todos los sitios hidrofóbicos en 200 µg de virus BMV se encuentren ocupados por moléculas de tamoxifeno es de 26.18 µg. Esta carga equivale a 13.1% en peso.

3.4 Inserción de tamoxifeno a cápsides virales

Antes de realizar los diferentes nanovehículos de fármacos hidrofóbicos se analizó el pH de diferentes concentraciones de solventes (DMSO y etanol). Esto nos permitió determinar la concentración del solvente a la cual el pH se encontraba entre un rango de 3-6, lo cual proporciona estabilidad al BMV nativo (Pfeiffer, Herzog, & Hirth, 1976).

3.4.1 pH de DMSO a diferentes concentraciones

Se realizaron mediciones de pH a diferentes concentraciones de DMSO (1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 50% y 100%). En la gráfica de la Figura 7 podemos observar que la concentración a la que se presentó el menor pH fue con 20% de DMSO, siendo 5.46. Mientras que el pH más alto reportado fue con 100% de DMSO, siendo 9.2.

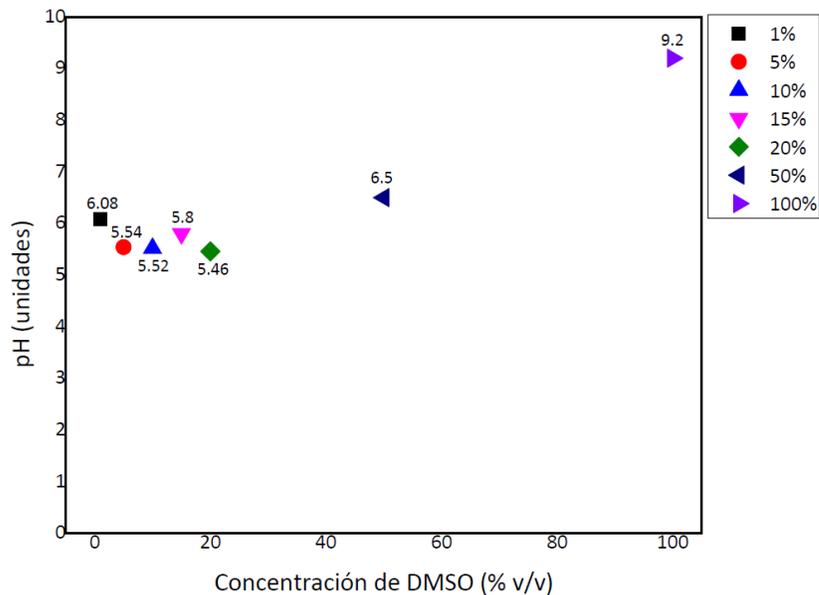


Figura 7. Gráfica de pH contra diferentes concentraciones de DMSO. El rango en el que el pH es menor a 6, es cuando se emplea una concentración entre 1-20% de DMSO.

3.4.2 pH del etanol a diferentes concentraciones

Se realizaron mediciones de pH a diferentes concentraciones de etanol (1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 50% y 100%). En la gráfica de la Figura 8 podemos observar que la concentración a la que se presentó el menor pH fue con 100% de etanol, siendo 6.2. Mientras que el pH más alto reportado fue con 1% de etanol, siendo 8.

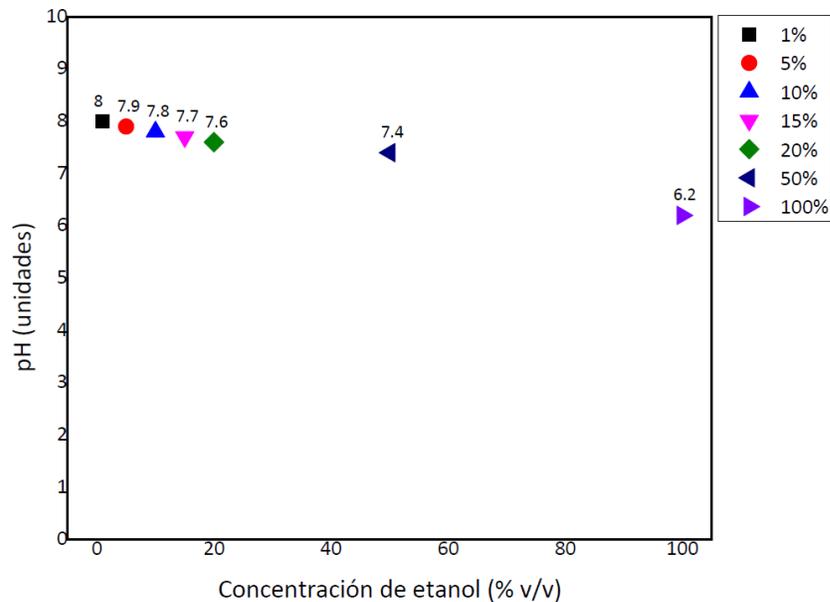


Figura 8. Grafica de pH contra diferentes concentraciones de etanol. El rango en el que el pH es aproximadamente 6, cuando se emplea una concentración de etanol cercana al 100%.

3.4.3 Estabilidad del BMV a diferentes concentraciones de etanol y DMSO (Mg^{+2})

Se realizaron ensayos de estabilidad del BMV a diferentes concentraciones de etanol y DMSO (con y sin Mg^{+2}), dado que este virus es sensible al pH. Se ha reportado que la forma compacta nativa se encuentra entre valores de pH de 3 a 6 (Bockstahler y Kaesberg 1962).

3.4.3.1. Dispersión dinámica de luz

En la Figura 9 se resumen los diámetros hidrodinámicos obtenidos de las mediciones realizadas por DLS para las partículas de BMV expuestas a diferentes concentraciones de DMSO y etanol respectivamente. Los valores fueron graficados utilizando el programa Origin9 de OriginLab.

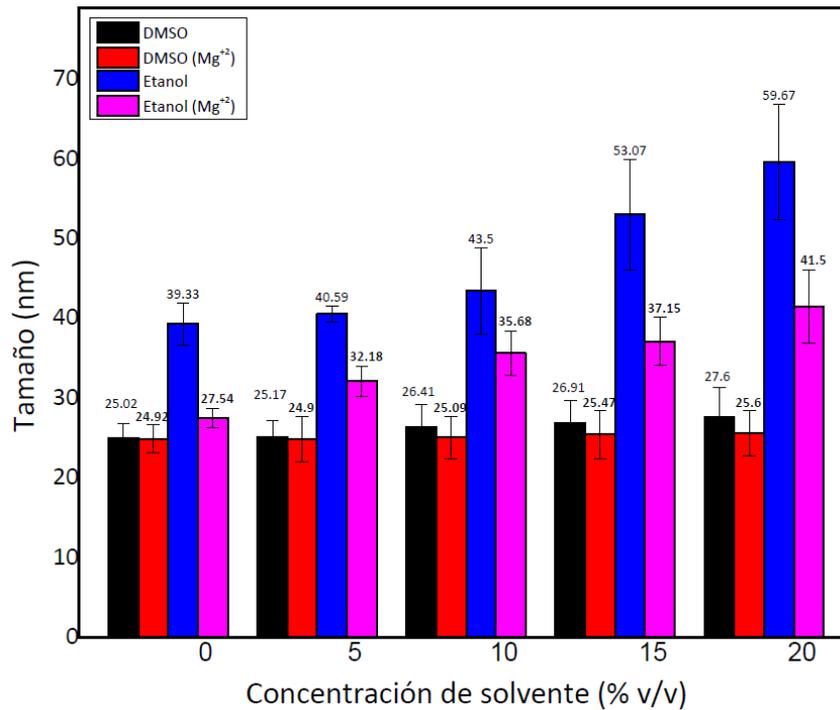


Figura 9. Grafica de tamaño contra diferentes concentraciones de solventes para BMV nativo. Las gráficas de barra color negro representan el tamaño de BMV nativo a diferentes concentraciones de DMSO sin Mg²⁺ como estabilizante. En rojo se representa las que fueron expuestas a diferentes concentraciones de DMSO con Mg²⁺. En azul las que fueron expuestas con etanol sin Mg²⁺. En rosa las que fueron expuestas a diferentes concentraciones de etanol con Mg²⁺.

La distribución de tamaño por volumen muestra que las cápsidas que fueron expuestas a concentraciones entre 1 y 20 por ciento de DMSO sin Mg²⁺ como estabilizante, se obtuvo un tamaño entre 25.02 a 27.6 nm. Para las que fueron expuestas a las mismas concentraciones de DMSO, pero con 10 mM de Mg²⁺ como estabilizante, se obtuvo un tamaño de 24.92 a 25.6 nm.

Las partículas de BMV expuestas a diferentes concentraciones de etanol presentaron diámetros mayores en comparación las de DMSO, lo cual es debido a que las diferentes concentraciones de etanol presentan un pH mayor a 6. Para los virus que fueron incubados a concentraciones entre 1 y 20 por ciento

de etanol sin Mg^{+2} como estabilizante, se obtuvo un tamaño de 39.33 a 59.67 nm, mientras que para las que fueron estabilizadas con Mg^{+2} presentaron un tamaño entre 27.54 y 41.5 nm.

Concentraciones mayores a 50% de DMSO produjeron tamaños mayores a 50 nm. Esto es debido a que el pH de estas concentraciones es mayor a 6, lo cual podría estar produciendo un hinchamiento considerable del virus o hasta posiblemente el desensamble de este.

A partir de los resultados obtenidos, se concluyó que la concentración del solvente que se utilizaría para realizar la adhesión de los fármacos a la cápside viral del BMV sería 20% de DMSO. Esto se debe a que a esta concentración el solvente presento un pH de 5.46, lo cual permitió que el virus BMV nativo permaneciera estable. Es una concentración que permite solubilizar los fármacos hidrofóbicos de manera sencilla, y además no se ven afectadas las interacciones hidrofóbicas que se generan entre los motivos hidrofóbicos de la cápside viral y el fármaco.

3.4.4 Cuantificación de tamoxifeno a diferentes concentraciones

Para realizar la inserción del profármaco a las cápsides virales del BMV se empleó una solución 10 mM (3.715 mg/ml) de tamoxifeno-DMSO. Primeramente, se cuantifico por espectrofluorimetría la solución tamoxifeno-DMSO a diferentes concentraciones. Se emplearon 6 concentraciones diferentes (6.25, 12.5, 25, 50 ,100 y 200 μ g/ml). Los valores fueron graficados utilizando el programa Origin9 de OriginLab.

3.4.4.1 Espectrofluorimetría

En la Figura 10-a podemos observar los espectros de emisión de fluorescencia de tamoxifeno a diferentes concentraciones. Es importante mencionar que antes de realizar las medidas de intensidad de fluorescencia del tamoxifeno en el espectrofluorímetro este se debe dejar en el transiluminador aproximadamente 15 minutos. Esto es debido a que el tamoxifeno por si solo es un fluoróforo débil y al estar expuesto a la luz ultravioleta se transforma en 4-hidroxitamoxifeno y endoxifeno, los cuales proporcionan una mejor fluorescencia. La excitación utilizada para realizar los espectros fue de 270 nm.

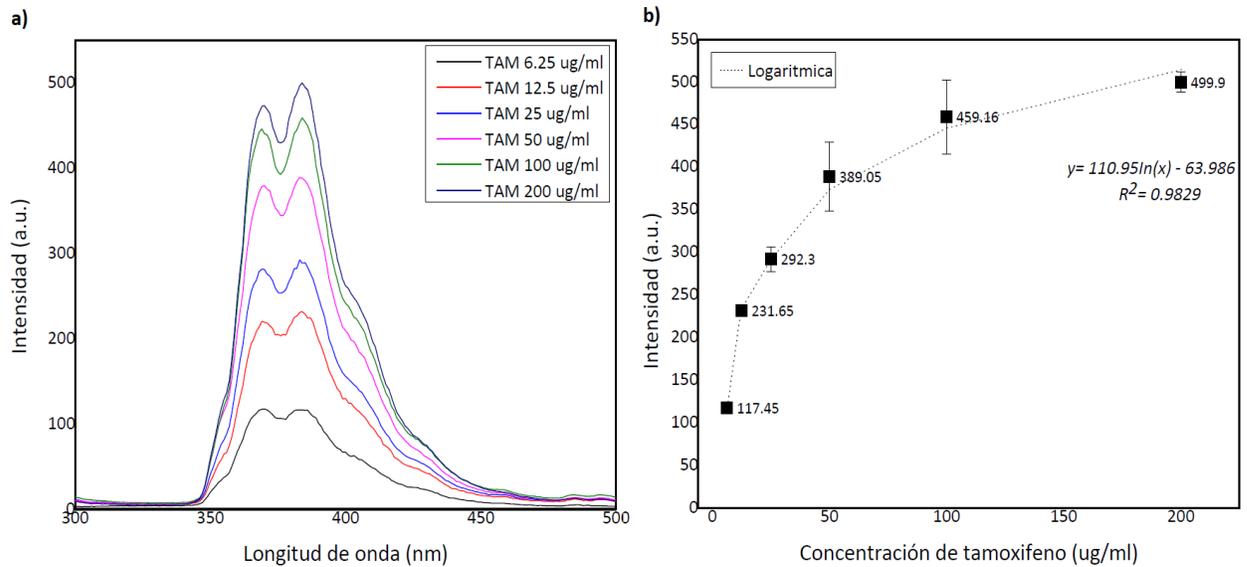


Figura 10. Gráficas de emisión de fluorescencia del tamoxifeno. a) Espectros de emisión de fluorescencia a diferentes concentraciones de tamoxifeno. b) Curva del valor del pico máximo de emisión de fluorescencia a diferentes concentraciones de tamoxifeno. Se utilizaron 6 concentraciones diferentes de tamoxifeno (6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/ml). La excitación utilizada fue de 270 nm. La intensidad de fluorescencia es el valor promedio medido en tres mediciones independientes para cada caso.

En la Figura 10-b se observa la curva de intensidad promedio del valor del pico máximo de emisión de fluorescencia del tamoxifeno a diferentes concentraciones. Al trazar los valores de intensidad contra las diferentes concentraciones de tamoxifeno se puede aplicar una función logarítmica que represente el comportamiento del cambio en función a la concentración del fármaco. Se observó un incremento logarítmico en la intensidad del espectro de emisión al aumentar la concentración de fármaco.

3.4.5 Caracterización y cuantificación de BMV a diferentes concentraciones de tamoxifeno.

Una vez realizada la metodología de inserción del tamoxifeno en la cápside viral del BMV de la sección 2.4, se procedió a realizar la caracterización y cuantificación del BMV marcado con el profármaco utilizando la técnica de espectrofluorimetría, dispersión dinámica de luz y microscopía electrónica de transmisión.

3.4.5.1 Espectrofluorimetría

En la Figura 11-a podemos observar los espectros de emisión de fluorescencia de tamoxifeno y BMV-tamoxifeno a diferentes concentraciones. En la Figura 11-b se observa la curva de intensidad promedio del valor del pico máximo de emisión de fluorescencia del tamoxifeno a diferentes concentraciones. En la Figura 11-c se observa la curva de intensidad promedio del valor del pico máximo de emisión de fluorescencia de BMV-tamoxifeno a diferentes concentraciones.

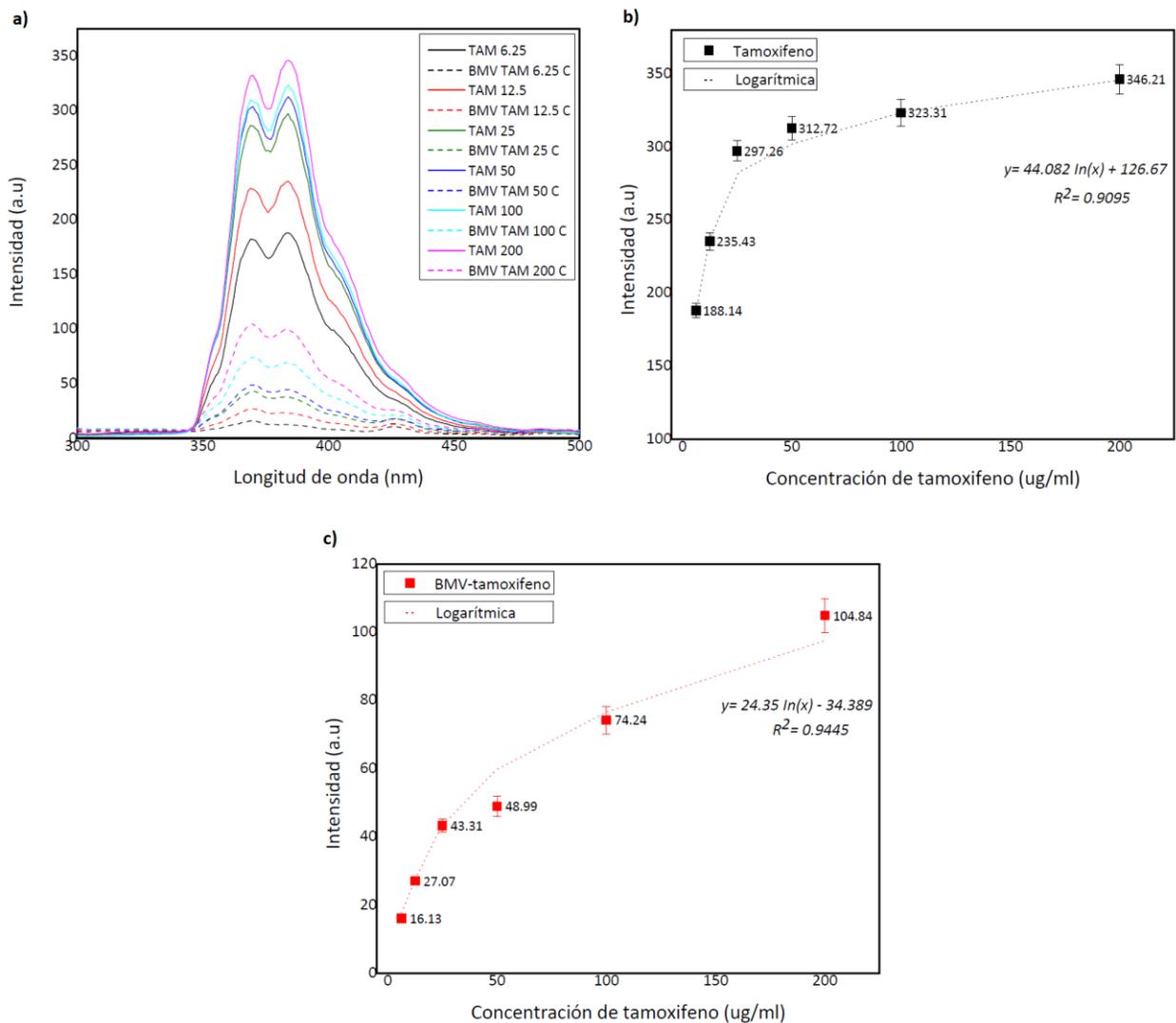


Figura 11. Gráficas de emisión de fluorescencia de tamoxifeno y BMV-tamoxifeno. a) Espectros de emisión de fluorescencia a diferentes concentraciones de tamoxifeno y BMV-tamoxifeno. b) Curva del valor del pico máximo de emisión de fluorescencia a diferentes concentraciones de tamoxifeno. c) Curva del valor del pico máximo de emisión de fluorescencia a diferentes concentraciones de BMV-tamoxifeno. Se utilizaron 6 concentraciones diferentes de tamoxifeno (6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$). La excitación utilizada fue de 270 nm. La intensidad de fluorescencia es el valor promedio medido en tres mediciones independientes para cada caso.

Al trazar los valores de intensidad contra las diferentes concentraciones de tamoxifeno se puede aplicar una función logarítmica que represente el comportamiento del cambio en función a la concentración del fármaco. Se observó de igual manera un incremento logarítmico en la intensidad del espectro de emisión al aumentar la concentración de tamoxifeno. A partir de la ecuación de la función logarítmica obtenida en las curvas de emisión se dedujo la cantidad de fármaco atrapado en la cápside viral del BMV.

3.4.5.2. Dispersión dinámica de luz

En la Figura 12 se observan los diámetros hidrodinámicos obtenidos de las mediciones realizadas por DLS para las partículas de BMV expuestas a diferentes concentraciones de tamoxifeno. Se utilizaron 6 concentraciones diferentes (6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$). Los valores fueron graficados utilizando el programa Origin9 de OriginLab.

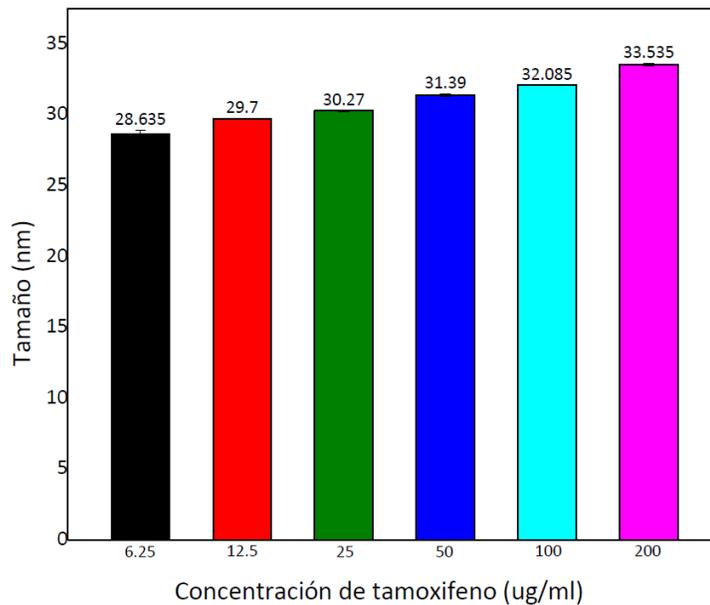


Figura 12. Gráfica de tamaño contra diferentes concentraciones de tamoxifeno en BMV. La gráfica de barra color negro representa una concentración inicial de 6.25 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifeno, la roja 12.5 $\mu\text{g/ml}$, la verde 25 $\mu\text{g/ml}$, la azul 50 $\mu\text{g/ml}$, la cian 100 $\mu\text{g/ml}$ y la rosa 200 $\mu\text{g/ml}$.

La distribución de tamaño por volumen muestra que las cápsides virales expuestas a diferentes concentraciones de tamoxifeno presentaron un incremento significativo en el radio hidrodinámico en

comparación al virus BMV nativo, por lo cual se infiere que la adhesión del fármaco a la cápside fue un éxito. Para las cápsides que fueron expuestas a una concentración inicial de 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tamoxifeno, se obtuvo un diámetro de 28.6 nm \pm 0.3 nm. Para las que fueron expuestas a 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se obtuvo un tamaño de 29.7 nm. Para una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, el diámetro fue de 30.3 nm. Para una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, el diámetro hidrodinámico fue de 31.4 nm \pm 0.1 nm. Las que tenían una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se obtuvo un tamaño de 32.1 nm \pm 0.1 nm. Finalmente, las cápsides que fueron expuestas a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, obtuvieron un diámetro de 33.5 nm \pm 0.1 nm.

3.4.6 Cantidad de tamoxifeno atrapado en la cápside viral

En la Figura 13 se observa la cantidad de tamoxifeno atrapado en la cápside viral de BMV. Estos valores se obtuvieron a partir de la ecuación de la función logarítmica de las curvas de emisión de la Figura 11. Los valores fueron graficados utilizando el programa Origin9 de OriginLab.

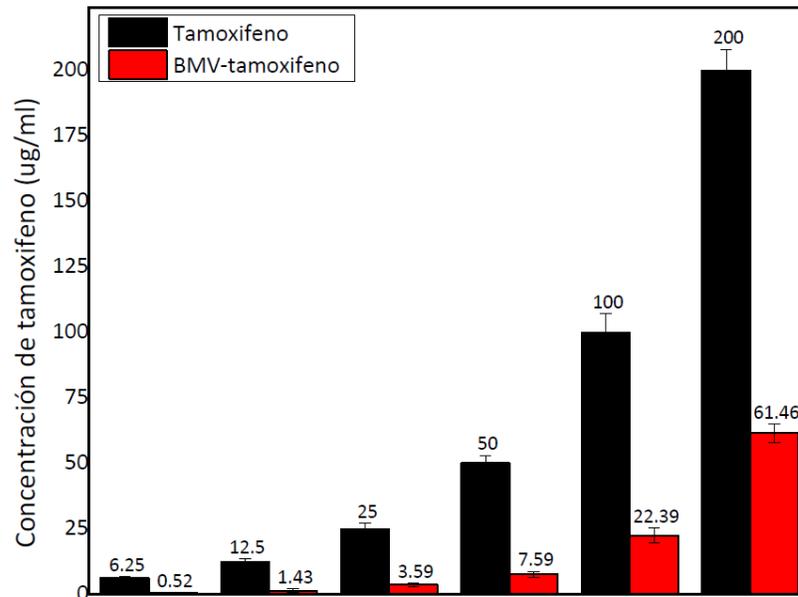


Figura 13. Concentración de tamoxifeno atrapado en la cápside de BMV. Las gráficas de barra color negro representa la concentración de tamoxifeno inicial. La grafica de barra color roja representa la cantidad de tamoxifeno atrapado en la cápside viral una vez realizado el protocolo de inserción de la sección 2.4.

Para una concentración inicial de 6.25 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifeno se obtuvo una concentración final de tamoxifeno adherido en la cápside viral del BMV de 0.52 $\mu\text{g/ml}$. Para una concentración de 12.5 $\mu\text{g/ml}$ se obtuvo una concentración de 1.43 $\mu\text{g/ml}$. Para 25 $\mu\text{g/ml}$ de fármaco se obtuvo 3.59 $\mu\text{g/ml}$. Para 50 $\mu\text{g/ml}$ se obtuvo 7.59 $\mu\text{g/ml}$. Para 100 $\mu\text{g/ml}$ se obtuvo 22.39 $\mu\text{g/ml}$. Finalmente para 200 $\mu\text{g/ml}$ se obtuvo 61.46 $\mu\text{g/ml}$. Se puede observar que la cantidad de fármaco adherido a la cápside viral es proporcional a la concentración inicial de tamoxifeno utilizado. Por lo cual, los nanovehículos desarrollados podrían considerarse como una opción ideal para cargar fármacos de naturaleza hidrofóbica.

3.4.7 Número de moléculas de tamoxifeno adheridos en la cápside de BMV

En la Figura 14 se muestra el número de moléculas de tamoxifeno adheridos en la cápside de BMV a diferentes concentraciones. Las concentraciones de fármaco utilizadas fueron las reportadas en la sección 3.4.6. Es importante mencionar que para determinar el número de moléculas adheridas es necesario tener la concentración en molaridad. La concentración en molaridad de la cantidad de tamoxifeno atrapado en la cápside BMV fue de 1.4, 3.85, 9.66, 20.43, 60.27 y 165.43 μM respectivamente.

El número de moléculas de tamoxifeno adheridos en la cápside de BMV se estimó de la siguiente manera. Primeramente, la concentración del virus utilizada (0.2 mg/ml) se dividió entre el peso molecular de la cápside del BMV (4.6 MDa= 4.6×10^6 g/mol) para determinar su molaridad, obteniendo 43.48 nM. Posteriormente, las concentraciones de tamoxifeno atrapados en la cápside BMV (1.4, 3.85, 9.66, 20.43, 60.27 y 165.43 μM) se dividieron entre la molaridad de la concentración del virus (43.48 nM), para determinar el número de moléculas adheridas por cápside. Los valores obtenidos se graficaron utilizando el programa Origin9 de OriginLab.

En la Figura 14-a podemos observar los valores obtenidos para el número de moléculas de tamoxifeno por cápside viral, mientras que en la Figura 14-b se muestran el número de moléculas de fármaco por motivo hidrofóbico de la cápside del BMV. Se debe tener en cuenta que el número de motivos hidrofóbicos por cápside es de 1620 para el BMV (Pérez-Sánchez, 2017).

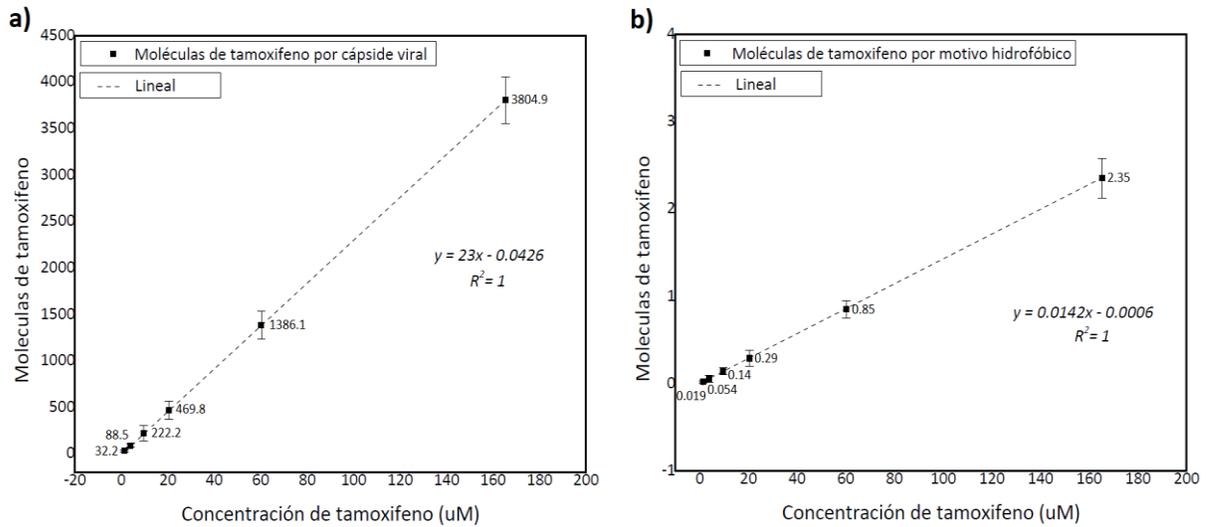


Figura 14. Graficas de número de moléculas de tamoxifeno adheridos en la cápside del BMV a diferentes concentraciones. a) Moléculas de tamoxifeno por cápside viral. b) Moléculas de tamoxifeno por motivo hidrofóbico del BMV. Las concentraciones de fármaco utilizadas fueron 1.4, 3.85, 9.66, 20.43, 60.27 y 165.43 μM .

Para una concentración de 1.4 μM de tamoxifeno (0.52 $\mu\text{g/ml}$) se obtuvieron 32.2 moléculas de tamoxifeno por cápside viral y 0.019 moléculas por motivo hidrofóbico. Para concentraciones de 3.85 μM (1.43 $\mu\text{g/ml}$), 9.66 μM (3.59 $\mu\text{g/ml}$), 20.43 μM (7.59 $\mu\text{g/ml}$), 60.27 μM (22.39 $\mu\text{g/ml}$) y 165.43 μM (61.46 $\mu\text{g/ml}$) de tamoxifeno, se obtuvieron 88.5, 222.2, 469.8, 1386.1 y 3804.9 moléculas de tamoxifeno por cápside de BMV. En las gráficas de la Figura 14 se puede observar que el número de moléculas de fármaco que se adhieren a la cápside del BMV es directamente proporcional a la concentración de tamoxifeno que se utiliza.

3.4.8 Microscopio electrónico de transmisión

Para obtener información acerca de la morfología de los nanovehículos BMV-tamoxifeno, estos se analizaron por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en ingles). Las micrografías obtenidas se muestran en la Figura 15.

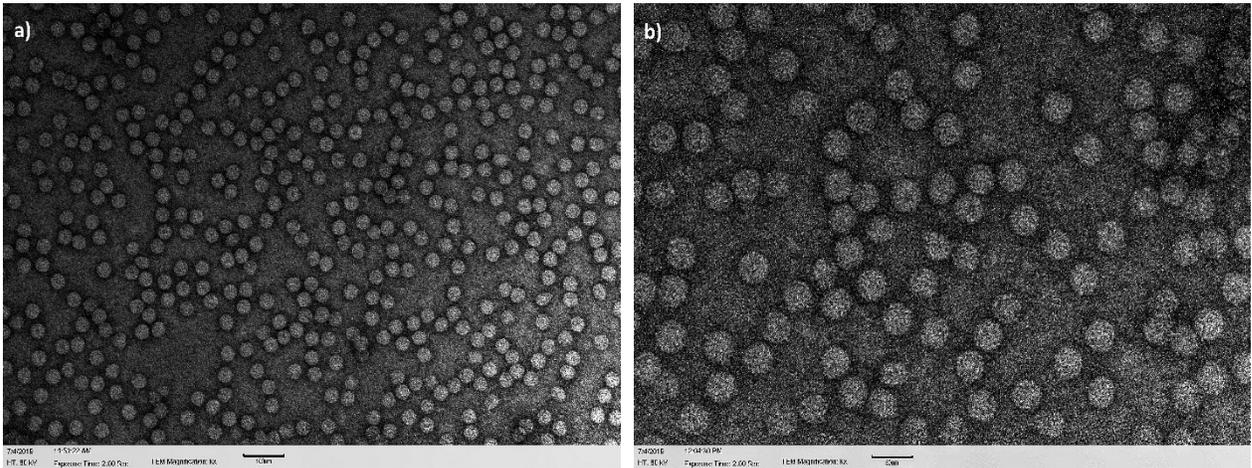


Figura 15. Micrografías electrónicas de transmisión de BMV-tamoxifeno -80 kV-. a) magnificación a 60 kx (escala 100 nm). b) magnificación a 120 kx (escala 50 nm). La muestra analizada fue BMV-tamoxifeno a una concentración final de 61.46 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

En la Figura 15 se puede observar que los sistemas desarrollados BMV-tamoxifeno presentaron una forma esférica, monodispersidad y no había evidencia de aglomeración. La micrografía de la Figura 15-b fue analizada a través del programa ImageJ para determinar el diámetro de las partículas, obteniendo un tamaño promedio de $34.2 \text{ nm} \pm 1.4 \text{ nm}$, aproximándose al tamaño obtenido a través de DLS el cual fue de 33.5 nm .

3.5 Concentración óptima teórica de camptotecina por cápside viral.

De igual manera, la concentración óptima de camptotecina a utilizar se estimó teóricamente empleando el número de motivos hidrofóbicos presentes en la cápside viral del BMV, la cantidad de virus a utilizar ($200 \mu\text{g}$) y el peso molecular de la camptotecina ($348.352 \text{ g}/\text{mol}$). El cálculo se dio de la siguiente manera:

Primeramente, se dividió la concentración de virus a utilizar, en este caso $200 \mu\text{g}$, entre el peso molecular de la cápside viral del BMV ($4.6 \text{ MDa} = 7.638 \times 10^{-18} \text{ g}$) para determinar el número de partículas presentes.

$$\frac{200 \times 10^{-6} \text{ g}}{7.638 \times 10^{-18} \text{ g}} \approx 2.62 \times 10^{13}$$

Posteriormente, se multiplico el valor obtenido del número de partículas presentes en 200 µg de virus por los motivos hidrofóbicos de la cápside viral del BMV, y se dividió por el número de Avogadro ($6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) para determinar la molalidad.

$$1620 \text{ motivos } (2.62 \times 10^{13}) \approx 4.24 \times 10^{16}$$

$$\frac{4.24 \times 10^{16}}{6.022 \times 10^{23}} = 7.04 \times 10^{-8} \text{ moles}$$

El resultado anterior nos indica que se pueden adherir aproximadamente 7.04×10^{-8} moléculas en 200 µg de BMV. Finalmente, se multiplico el valor obtenido por el peso molecular de la camptotecina.

$$7.04 \times 10^{-8} \text{ moles } \left(348.352 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) = 24.54 \text{ µg}$$

Por lo tanto, la concentración optima teórica para que todos los sitios hidrofóbicos en 200 µg de virus BMV se encuentren ocupados por moléculas de camptotecina es de 24.54 µg. Esta carga equivale a 12.27% en peso.

3.6 Inserción de camptotecina a cápsides virales

3.6.1 Cuantificación de camptotecina a diferentes concentraciones

Para realizar la inserción del fármaco a las cápsides virales del BMV se empleó una solución 8.62 mM (3 mg/ml) de camptotecina-DMSO. Primeramente, se cuantifico por espectrofluorimetría la solución camptotecina-DMSO a diferentes concentraciones. Se emplearon 6 concentraciones diferentes (6.25, 12.5, 25, 50 ,100 y 200 µg/ml). Los valores fueron graficados utilizando el programa Origin9 de OriginLab.

3.6.1.1 Espectrofluorimetría

En la Figura 16-a podemos observar los espectros de emisión de fluorescencia de camptotecina a diferentes concentraciones. La excitación utilizada para realizar los espectros fue de 370 nm. En la Figura 16-b se observa la curva de intensidad promedio del valor del pico máximo de emisión de fluorescencia (439 nm) de la camptotecina a diferentes concentraciones. Al graficar los valores de intensidad contra las diferentes concentraciones de camptotecina, los datos se pueden ajustar por medio de una función logarítmica que represente el comportamiento del cambio en función a la concentración del fármaco. Se observó de igual manera que en el tamoxifeno un incremento logarítmico en la intensidad del espectro de emisión al aumentar la concentración de camptotecina.

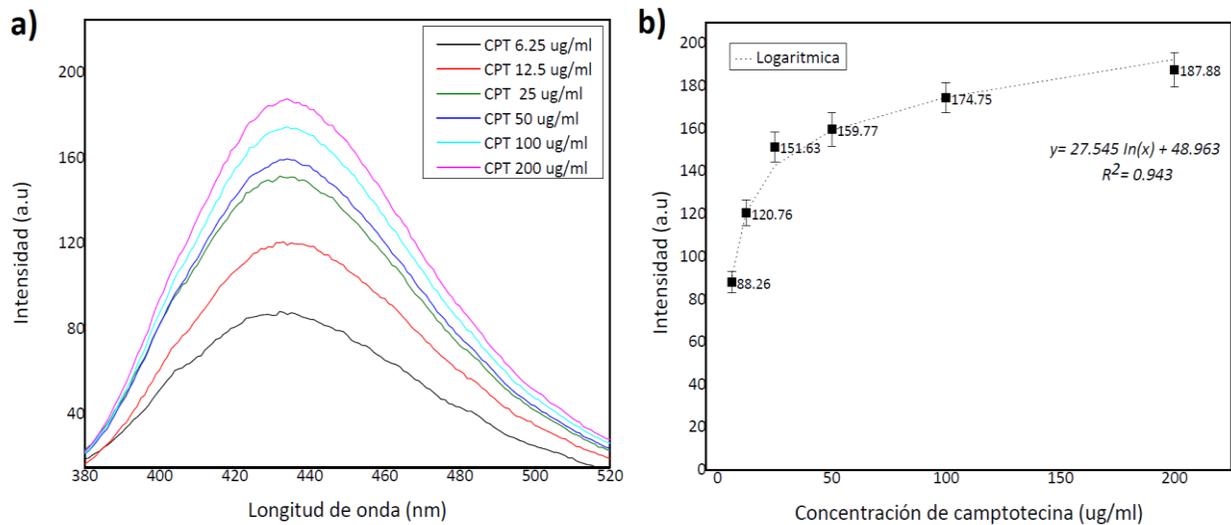


Figura 16. Gráficas de emisión de fluorescencia de camptotecina. a) Espectros de emisión de fluorescencia a diferentes concentraciones de camptotecina. b) Curva del valor del pico máximo de emisión de fluorescencia a diferentes concentraciones de camptotecina. Se utilizaron 6 concentraciones diferentes de camptotecina (6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 µg/ml). La excitación utilizada fue de 370 nm. La intensidad de fluorescencia es el valor promedio medido en tres mediciones independientes para cada caso.

3.6.2 Caracterización y cuantificación de BMV a diferentes concentraciones de camptotecina

Una vez realizada la metodología de inserción de camptotecina en la cápside viral del BMV de la sección 2.7, se procedió a realizar la caracterización y cuantificación del BMV marcado con el fármaco utilizando la técnica de espectrofluorimetría, dispersión dinámica de luz y microscopía electrónica de transmisión.

3.6.2.1 Espectrofluorimetría

La carga del fármaco en la cápside viral del BMV se corroboró mediante espectrofluorimetría aprovechando las propiedades de fluorescencia de la camptotecina (Ziomkowska, Cyrankiewicz, Wybranowski, & Kruszewski, 2014). De la Figura 17-a a 17-f podemos observar los espectros de emisión de fluorescencia de camptotecina y BMV-camptotecina a diferentes concentraciones. En la Figura 17-g se observa la curva de intensidad promedio del valor del pico máximo de emisión de fluorescencia de camptotecina a diferentes concentraciones. En la Figura 17-h se observa la curva de intensidad promedio del valor del pico máximo de emisión de fluorescencia de BMV-camptotecina a diferentes concentraciones.

De la Figura 17-a a 17-f se muestran espectros de emisión de fluorescencia de soluciones de 6.25, 12.5, 25, 5, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ de concentración inicial de camptotecina libre dispersada en tampón de suspensión de virus respectivamente. Estos espectros se comparan con el espectro de emisión análogo de los nanovehículos BMV-camptotecina. La intensidad de fluorescencia máxima se observó a 439 nm en todos los casos, mostrando claramente la presencia de camptotecina en nuestros nanovehículos.

En las curvas de la Figura 17-g y 17-h se aplicó una función logarítmica que representó el comportamiento del cambio en función a la concentración de camptotecina. Se observó un incremento logarítmico en la intensidad del espectro de emisión al aumentar la concentración de camptotecina. A partir de la ecuación de la función logarítmica obtenida se dedujo la cantidad de fármaco atrapado en la cápside viral del BMV.

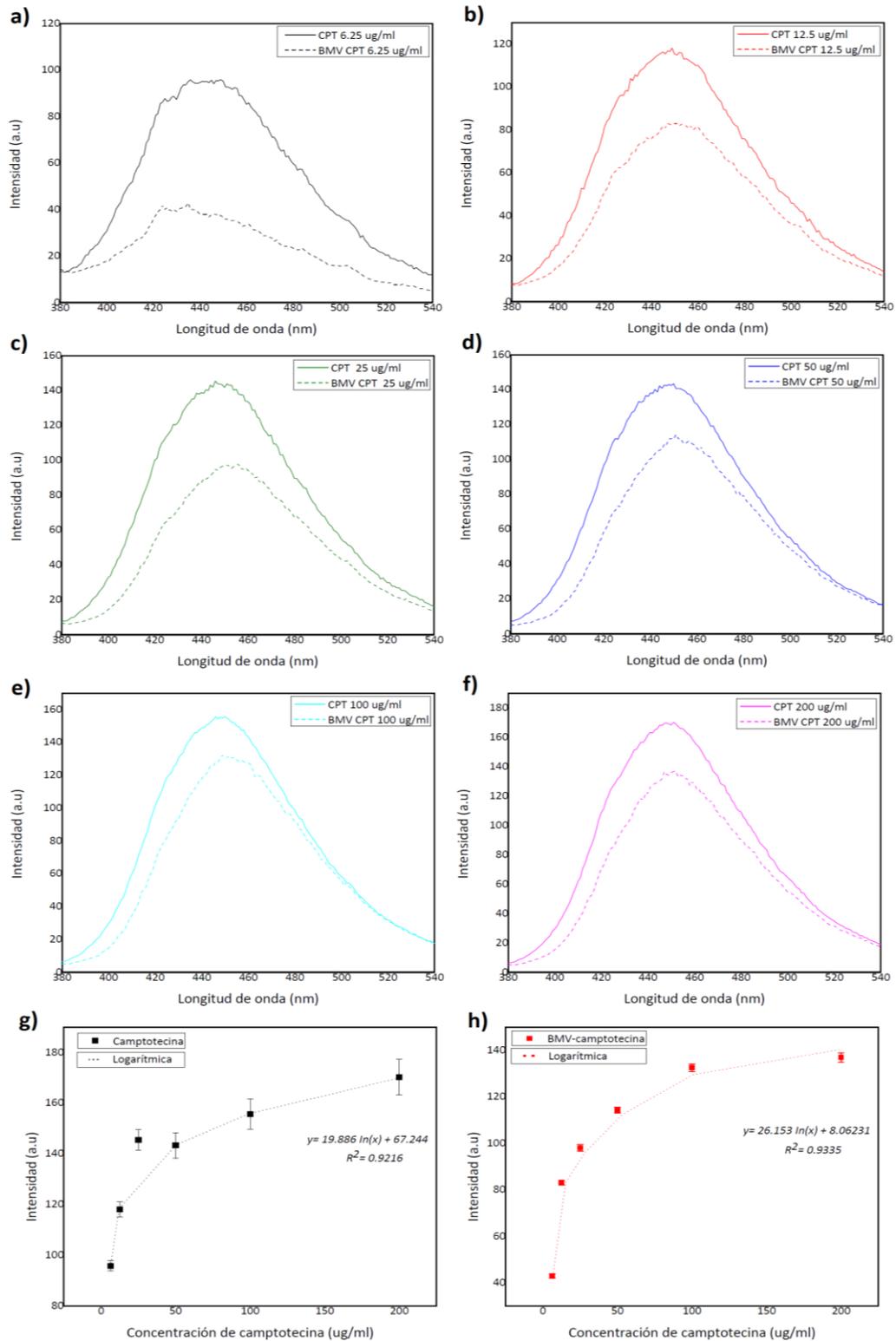


Figura 17. Gráficas de emisión de fluorescencia de camptotecina y BMV-camptotecina. a-h) Espectros de emisión de fluorescencia a diferentes concentraciones de camptotecina y BMV-camptotecina. Se utilizaron 6 diferentes concentraciones de camptotecina (6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$). g) Curva del valor del pico máximo de emisión de fluorescencia a diferentes concentraciones de camptotecina. h) Curva del valor del pico máximo de emisión de fluorescencia a diferentes concentraciones de BMV-camptotecina. La excitación utilizada fue de 370 nm. La intensidad de fluorescencia es el valor promedio medido en tres mediciones independientes para cada caso.

3.6.2.2 Dispersión dinámica de luz

En la Figura 18 se observan los diámetros hidrodinámicos obtenidos de las mediciones realizadas por DLS para las partículas de BMV expuestas a diferentes concentraciones de camptotecina. Se utilizaron 6 concentraciones diferentes (6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$). Los valores fueron graficados utilizando el programa Origin9 de OriginLab.

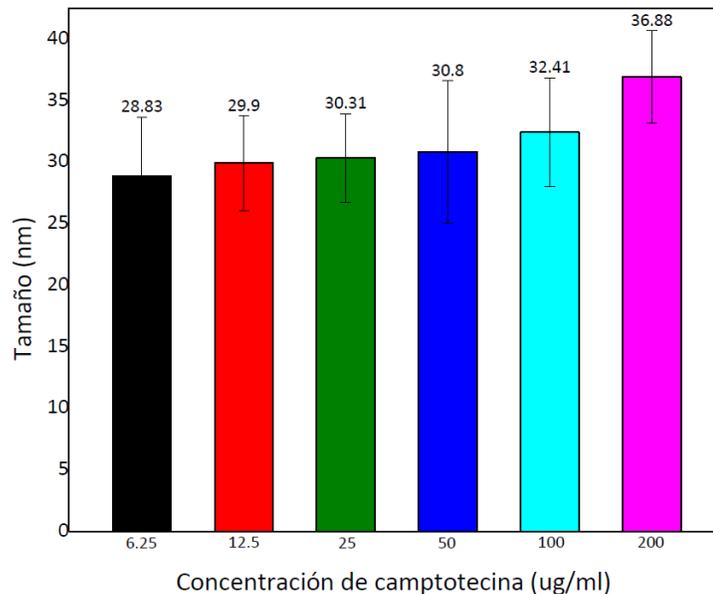


Figura 18. Gráfica de tamaño contra diferentes concentraciones de camptotecina en BMV. La gráfica de barra color negro representa una concentración inicial de 6.25 $\mu\text{g/ml}$ de camptotecina, la roja 12.5 $\mu\text{g/ml}$, la verde 25 $\mu\text{g/ml}$, la azul 50 $\mu\text{g/ml}$, la cian 100 $\mu\text{g/ml}$ y la rosa 200 $\mu\text{g/ml}$. Las barras de error se representan dentro de cada gráfica.

La distribución de tamaño por volumen muestra que las cápsides virales expuestas a diferentes concentraciones de camptotecina presentaron un incremento significativo en el radio hidrodinámico en comparación al virus BMV nativo. Para las cápsides que fueron expuestas a una concentración inicial de 6.25 $\mu\text{g/ml}$ de camptotecina, se obtuvo un diámetro de 28.8 nm \pm 4.8 nm. Para las que fueron expuestas a 12.5 $\mu\text{g/ml}$, se obtuvo un tamaño de 29.9 nm \pm 3.9 nm. Para una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$, el diámetro fue de 30.3 \pm 3.6 nm. Para una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, el diámetro hidrodinámico fue de 30.8 nm \pm 5.8 nm. Las que tenían una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, se obtuvo un tamaño de 32.4 nm \pm 4.4 nm. Finalmente, las cápsides que fueron expuestas a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$, obtuvieron un diámetro de 36.9 nm \pm 3.8 nm.

3.6.3 Cantidad de camptotecina atrapada en la cápside viral

En la Figura 19 se observa la cantidad de camptotecina atrapado en la cápside viral de BMV. Este valor se obtuvo a partir de la ecuación de la función logarítmica de las curvas de emisión de la Figura 17. Los valores fueron graficados utilizando el programa Origin9 de OriginLab.

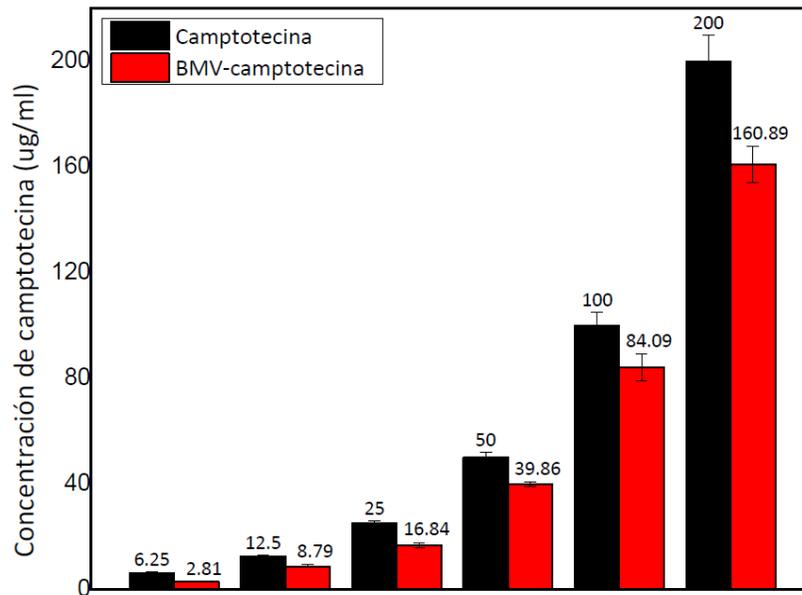


Figura 19. Concentración de camptotecina atrapada en la cápside de BMV. Las gráficas de barra color negro representa la concentración de camptotecina inicial. La grafica de barra color roja representa la cantidad de camptotecina atrapado en la cápside viral una vez realizado el protocolo de inserción de la sección 2.7.

Para una concentración inicial de 6.25 µg/ml de camptotecina se obtuvo una concentración final de camptotecina adherida en la cápside viral del BMV de 2.81 µg/ml. Para una concentración de 12.5 µg/ml se obtuvo una concentración de 8.79 µg/ml. Para 25 µg/ml de fármaco se obtuvo 16.84 µg/ml. Para 50 µg/ml se obtuvo 39.86 µg/ml. Para 100 µg/ml se obtuvo 84.09 µg/ml. Finalmente para 200 µg/ml se obtuvo 160.89 µg/ml.

3.6.4 Número de moléculas de camptotecina adheridas a la cápside de BMV

En la Figura 20 se muestra el número de moléculas de camptotecina adheridos en la cápside de BMV a diferentes concentraciones. Las concentraciones de fármaco utilizadas fueron las reportadas en la sección 3.6.3. La concentración en molaridad de la cantidad de camptotecina atrapado en la cápside BMV fue de 8.06, 25.23, 48.34, 114.42, 241.4 y 461.86 μM respectivamente.

El número de moléculas de camptotecina adherida en la cápside de BMV se estimó de la siguiente manera. Primeramente, la concentración del virus utilizada (0.2 mg/ml) se dividió entre el peso molecular de la cápside del BMV (4.6 MDa= 4.6×10^6 g/mol) para determinar su molaridad, obteniendo 43.48 nM. Posteriormente, las concentraciones de camptotecina atrapadas en la cápside BMV (8.06, 25.23, 48.34, 114.42, 241.4 y 461.86 μM) se dividieron entre la molaridad de la concentración del virus (43.48 nM), para determinar del número de moléculas adheridas por cápside. Los valores obtenidos se graficaron utilizando el programa Origin9 de OriginLab.

En la Figura 20-a podemos observar el número de moléculas de camptotecina por cápside viral, mientras que en la Figura 20-b se muestran el número de moléculas de fármaco por motivo hidrofóbico de la cápside del BMV.

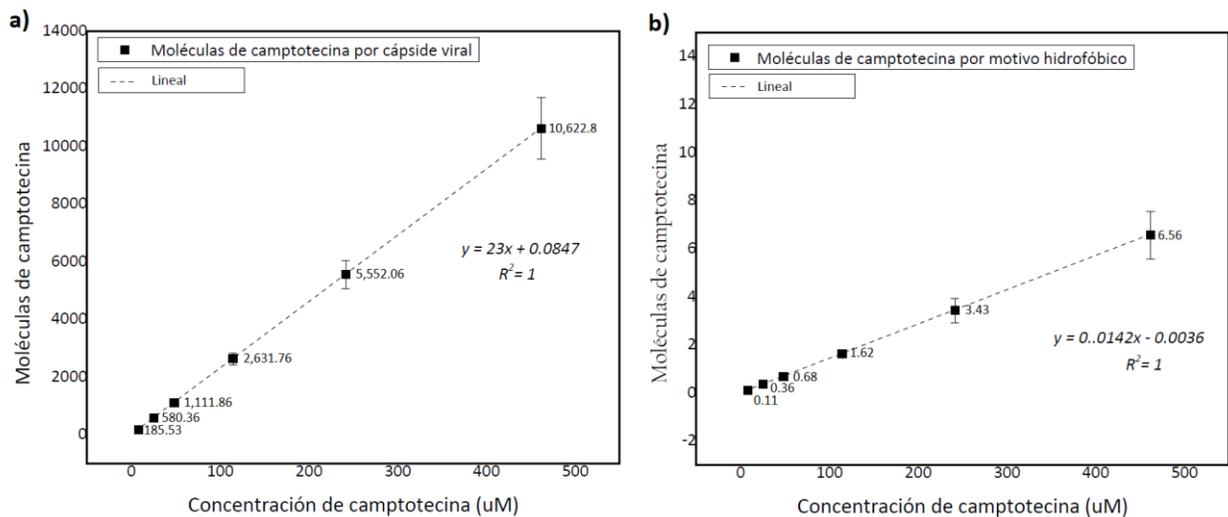


Figura 20. Graficas de número de moléculas de camptotecina adheridos en la cápside del BMV a diferentes concentraciones. a) Moléculas de camptotecina por cápside viral. b) Moléculas de camptotecina por motivo hidrofóbico del BMV. Las concentraciones de fármaco utilizadas fueron 8.06, 25.23, 48.34, 114.42, 241.4 y 461.86 μM .

Para concentraciones de 8.06 μM (2.81 $\mu\text{g/ml}$), 25.23 μM (8.79 $\mu\text{g/ml}$), 48.34 μM (16.84 $\mu\text{g/ml}$), 114.42 μM (39.86 $\mu\text{g/ml}$), 241.4 μM (84.09 $\mu\text{g/ml}$) y 461.6 μM (160.89 $\mu\text{g/ml}$) de camptotecina, se obtuvieron 185.53, 580.36, 1111.86, 2631.76, 5552.06 y 10622.8 moléculas de fármaco por cápside de BMV. Para estas mismas concentraciones se obtuvieron 0.11, 0.36, 0.68, 1.62, 3.43 y 6.56 moléculas de camptotecina por motivo hidrofóbico respectivamente. En estas graficas se observa un crecimiento lineal en el número de moléculas que se adhieren a la cápside viral al aumentar la concentración de camptotecina.

3.6.5 Microscopio electrónico de transmisión

Para obtener información acerca de la morfología de los nanovehículos BMV-camptotecina, estos se analizaron por medio de microscopia electrónica de transmisión. Las micrografías obtenidas se muestran en la Figura 21.

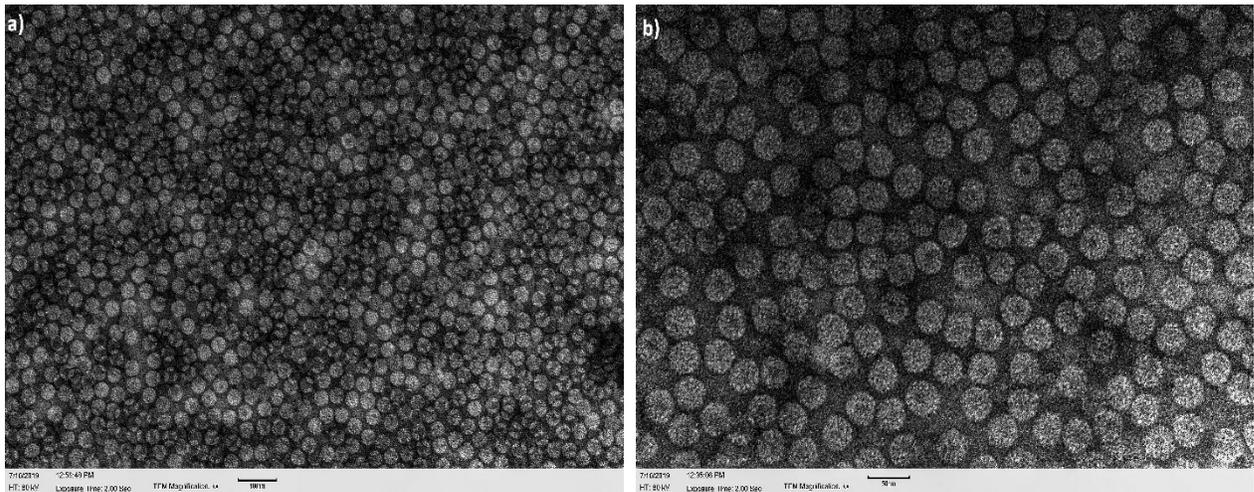


Figura 21. Micrografías electrónicas de transmisión de BMV-camptotecina -80 kV-. a) magnificación a 60 kx (escala 100 nm). **b)** magnificación a 120 kx (escala 50 nm). La muestra analizada fue BMV-camptotecina a una concentración final de 160.89 $\mu\text{g/ml}$.

En la Figura 21 se puede observar que los sistemas desarrollados BMV-camptotecina presentaron una forma esférica, monodispersidad y no había aglomeraciones. Las micrografías de la Figura 21-b fue analizada a través del programa ImageJ para determinar el diámetro de las partículas, obteniendo un

tamaño promedio de $37.5 \text{ nm} \pm 2.1 \text{ nm}$, aproximándose al tamaño obtenido a través de DLS el cual fue de 36.9 nm .

3.7 Internalización del virus BMV en MCF-7 y MDA-MB-231

La Figura 22 muestra las microfotografías obtenidas a través de microscopia confocal para la internalización del virus BMV en células MCF-7. En estas imágenes se capturaron células con núcleos fluorescentes (teñido de azul), membranas fluorescentes (teñidas de rojo) y regiones invadidas por cápsides del BMV marcadas con FITC (teñidas de verde).

En la Figura 22-a se muestran las células cancerígenas MCF-7 con BMV funcionalizado con FITC en campo claro. En la Figura 22-b se muestran las mismas células en campo oscuro. En todas las microfotografías podemos observar puntos verdes, los cuales son generados debido a la fluorescencia emitida (525 nm) por el FITC que se encuentra funcionalizado en el BMV. Al analizar las microfotografías se puede observar que el BMV es capaz de internalizarse dentro de las células MCF-7. Se utilizó un objetivo 10x con magnificación 3x para obtener una mayor resolución, permitiendo apreciar fácilmente la fluorescencia emitida por el virus marcado con FITC. Las longitudes de onda utilizadas para HOECHST 33242 (tinción de núcleo), FM4-64 (tinción de membrana) y FITC fueron 350, 515 y 490 nm respectivamente.

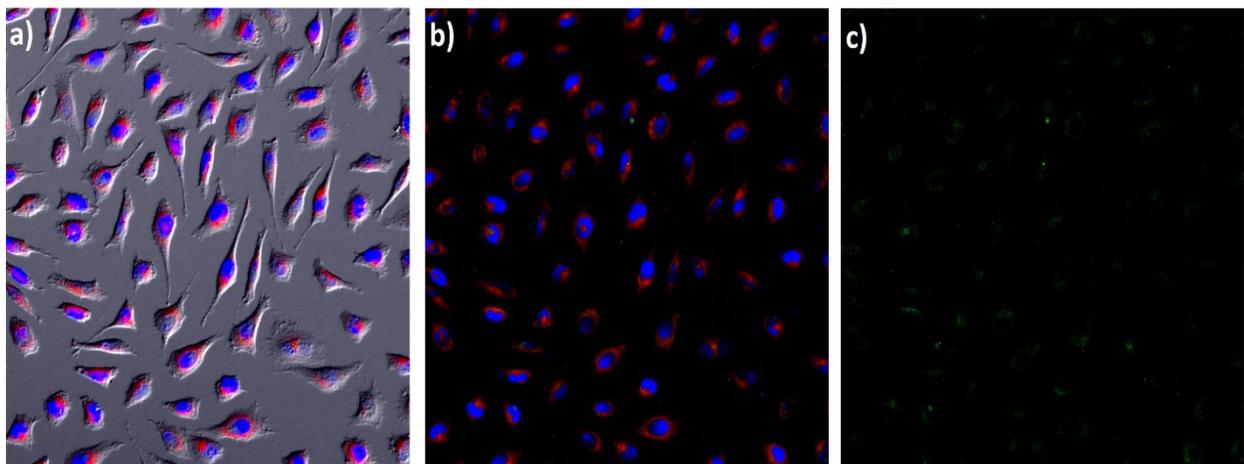


Figura 22. Microfotografías de microscopia confocal de células MCF-7. a) Campo claro. b) Campo oscuro. c) Campo oscuro FITC. HOECHST 33242 (núcleo) en azul; FM4-64 (membrana) en rojo; BMV funcionalizado con FITC en verde. Objetivo 10x y magnificación 3x. Las longitudes de onda utilizadas para HOECHST 33242, FM4-64 y FITC fueron 350, 515 y 490 nm respectivamente.

La Figura 23 muestra las microfotografías obtenidas a través de microscopia confocal para la internalización del virus BMV en células MDA-MB-231. En estas imágenes se capturaron células con núcleos fluorescentes (teñido de azul), membranas fluorescentes (teñidas de rojo) y regiones invadidas por cápsides del BMV marcadas con FITC (teñidas de verde).

En la Figura 23-a se muestran las células cancerígenas MDA-MB-231 con BMV funcionalizado con FITC en campo claro. En la Figura 23-b se muestran las mismas células en campo oscuro. En todas las microfotografías podemos observar puntos verdes, los cuales son generados debido a la fluorescencia emitida (525 nm) por el FITC que se encuentra funcionalizado en el BMV. Al analizar las microfotografías se puede observar que el BMV es capaz de internalizarse dentro de las células MDA-MB-231. Se utilizó un objetivo 10x con magnificación 3x para obtener una mayor resolución, permitiendo apreciar fácilmente la fluorescencia emitida por el virus marcado con FITC. Las longitudes de onda utilizadas para HOECHST 33242 (tinción de núcleo), FM4-64 (tinción de membrana) y FITC fueron 350, 515 y 490 nm respectivamente.

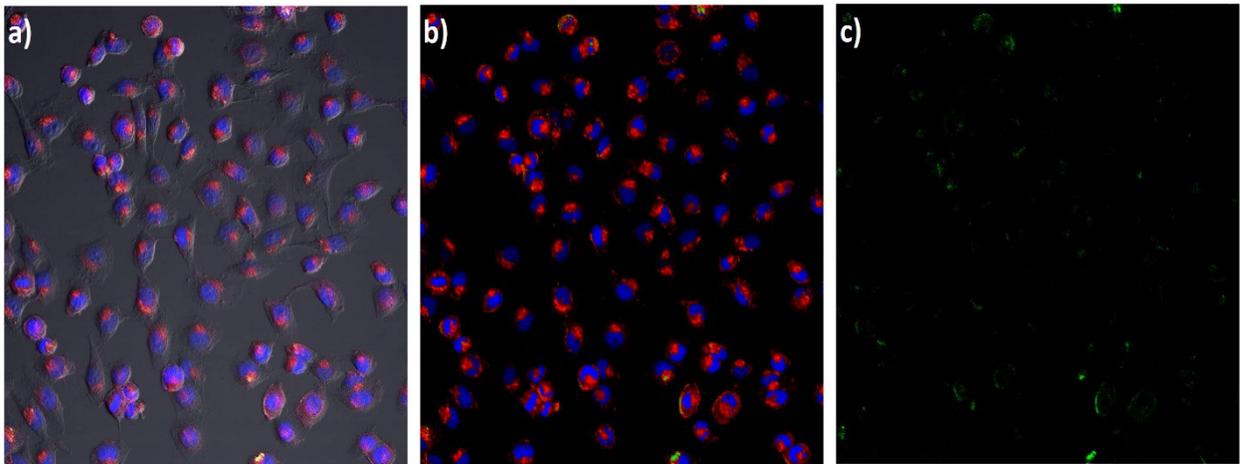


Figura 23. Microfotografías de microscopia confocal de células MDA-MB-231. a) Campo claro. b) Campo oscuro. c) Campo oscuro FITC. HOECHST 33242 (núcleo) en azul; FM4-64 (membrana) en rojo; BMV funcionalizado con FITC en verde. Objetivo 10x y magnificación 3x. Las longitudes de onda utilizadas para HOECHST 33242, FM4-64 y FITC fueron 350, 515 y 490 nm respectivamente.

Estas imágenes brindan un soporte para los resultados de citotoxicidad *in vitro* presentados a continuación, ya que es evidente que el BMV puede internalizarse en estas líneas celulares (MCF-7 y MDA-MB-231).

3.8 Ensayos de viabilidad celular

3.8.1 Determinación de la capacidad del virus BMV de inhibir la proliferación en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231

En primer lugar, se determinó la capacidad del BMV nativo de inhibir la proliferación en las líneas celulares hormono-dependiente y hormono independiente MCF-7 y MDA-MB-231. Para esto, se agregó a cada línea celular tres diferentes concentraciones de BMV (100, 200 y 300 $\mu\text{g/ml}$) y, 24 horas después, se determinó la proliferación de las líneas celulares mediante el ensayo colorimétrico MTT. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 24.

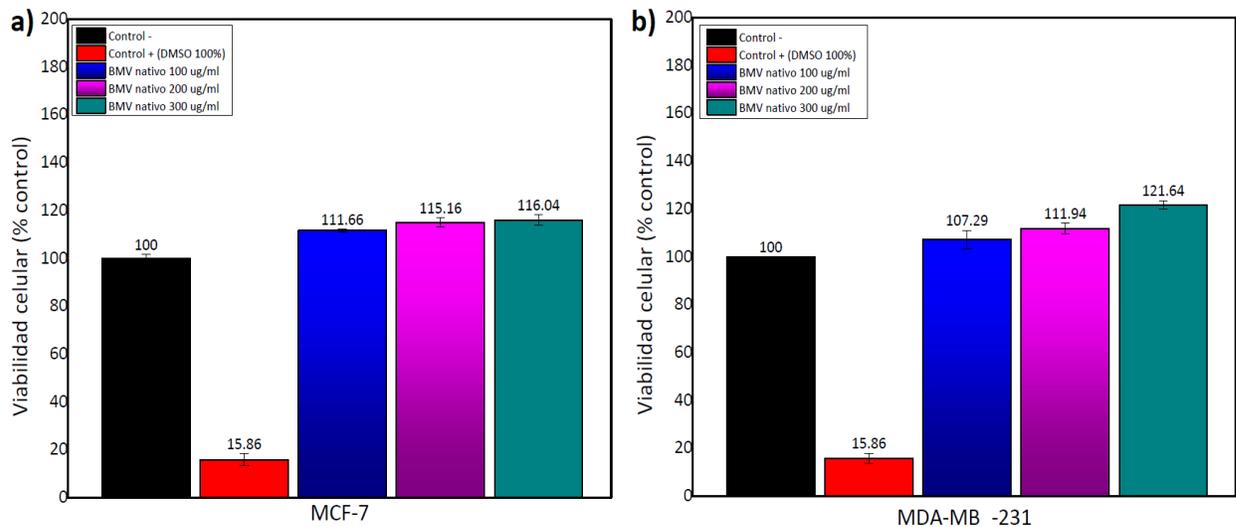


Figura 24. Efecto de BMV nativo en células MCF-7 (a) y MDA-MB-231 (b) mediante el ensayo MTT. La viabilidad celular se determinó mediante el método del MTT en células incubadas con diferentes concentraciones de BMV nativo durante 24 horas. Los resultados se expresan como el porcentaje de supervivencia celular respecto al control sin tratar, que representa el 100%.

En la Figura 24 se puede observar como el tratamiento con BMV nativo, a ninguna de las concentraciones utilizadas, disminuye el porcentaje de viabilidad en ninguna de las dos líneas celulares. Sin embargo, se observa un aumento significativo en la proliferación celular entre el 10 y 20% respecto al control negativo en ambas líneas celulares.

3.8.2 Determinación de la capacidad del nanovehículo BMV-TAM de inhibir la proliferación en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231

La capacidad del nanovehículo BMV-TAM de inhibir el crecimiento celular en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 se determinó mediante el ensayo colorimétrico del MTT. Las células se incubaron con diferentes concentraciones de tamoxifeno y BMV-tamoxifeno durante 24 horas, y se determinó la capacidad de proliferación de las células. A partir de los resultados obtenidos se construyeron las gráficas de supervivencia que se muestran en la Figura 25. A partir de estos resultados se calcularon la dosis IC50 e IC75, respecto a las mismas células sin tratar.

La tabla 1 muestra los valores IC50 e IC75 calculados para las células MCF-7 después de 24 horas de tratamiento continuo con tamoxifeno o BMV-tamoxifeno. Las concentraciones IC50 e IC75 obtenidas para tamoxifeno fueron 22.29 $\mu\text{g/ml}$ y 2.65 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. En el caso del BMV-tamoxifeno el valor obtenido para la IC50 fue de 28.63 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la IC75 tenía un valor de 4.02 $\mu\text{g/ml}$.

La tabla 1 muestra de igual manera los valores IC50 e IC75 calculados para las células MDA-MB-231 después de 24 horas de tratamiento continuo con tamoxifeno o BMV-tamoxifeno. Las concentraciones IC50 e IC75 obtenidas para tamoxifeno fueron 105.15 $\mu\text{g/ml}$ y 10.63 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. En el caso del BMV-tamoxifeno el valor obtenido para la IC50 fue de 58.77 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la IC75 tenía un valor de 6.91 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 1. Valores de las concentraciones de tamoxifeno y BMV-tamoxifeno que inhiben el crecimiento celular un 50% (IC50) o un 75% (IC75) en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231. Los valores se determinaron a partir de los resultados de las gráficas de crecimiento que se muestran en la Figura 25.

Línea celular	Tratamiento	IC75 ($\mu\text{g/ml}$)	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)
MCF-7	Tamoxifeno	2.65 \pm 0.61	22.29 \pm 2.42
	BMV-Tamoxifeno	4.02 \pm 2.04	28.63 \pm 4.89
MDA-MB-231	Tamoxifeno	10.63 \pm 2.52	105.15 \pm 19.84
	BMV-Tamoxifeno	6.91 \pm 1.97	58.77 \pm 8.95

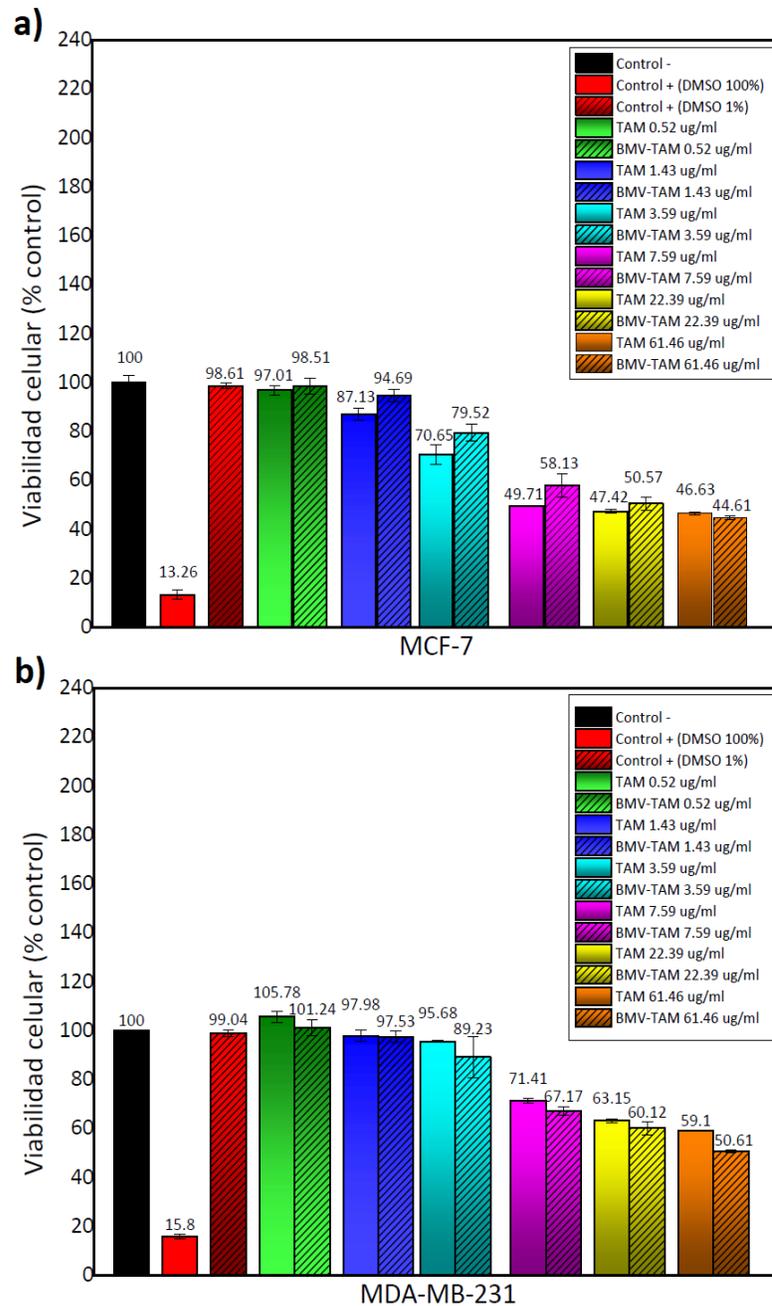


Figura 25. Efecto del tratamiento tamoxifeno y BMV-tamoxifeno en células MCF-7 (a) y MDA-MB-231 (b) mediante el ensayo MTT. La viabilidad celular se determinó mediante el método del MTT en células incubadas con los diferentes tratamientos durante 24 horas. Los resultados se expresan como el porcentaje de supervivencia celular respecto al control sin tratar, que representa el 100%.

3.8.3 Determinación de la capacidad del nanovehículo BMV-TAM de inhibir la proliferación en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 a diferentes tiempos

Se determinó la capacidad de BMV-TAM de inhibir la proliferación en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 durante 3, 6, 12, 18 y 24 horas por el ensayo colorimétrico MTT. Los resultados obtenidos se utilizaron para construir las gráficas de viabilidad celular que se muestran en la Figura 26.

En las gráficas de la Figura 26 se puede observar que tanto en el caso de la línea MCF-7 como en el caso de la línea MDA-MB-231 se obtuvo una disminución exponencial en la viabilidad celular a través del tiempo. La línea celular MCF-7 obtuvo una viabilidad de 67.25% y 66.79% después de 3 horas de tratamiento con tamoxifeno y BMV-tamoxifeno respectivamente. El valor mínimo de viabilidad celular que se consiguió en MCF-7 fue de 48.84% (tamoxifeno) y 47.39% (BMV-tamoxifeno) después de 24 horas de tratamiento.

Para la línea celular MDA-MB-231 se obtuvo una viabilidad celular del 78.15% y 75.51% después de 3 horas de tratamiento con tamoxifeno y BMV-tamoxifeno respectivamente. El valor mínimo de viabilidad celular reportado para esta línea celular fue de 58.77% (tamoxifeno) y 49.51% (BMV-tamoxifeno) después de 24 horas de tratamiento. De estos resultados se deduce que el nanovehículo BMV-tamoxifeno se comportó como un agente antiproliferativo eficaz para la línea MDA-MB-231, disminuyendo su viabilidad celular un 10% más en comparación con el fármaco libre.

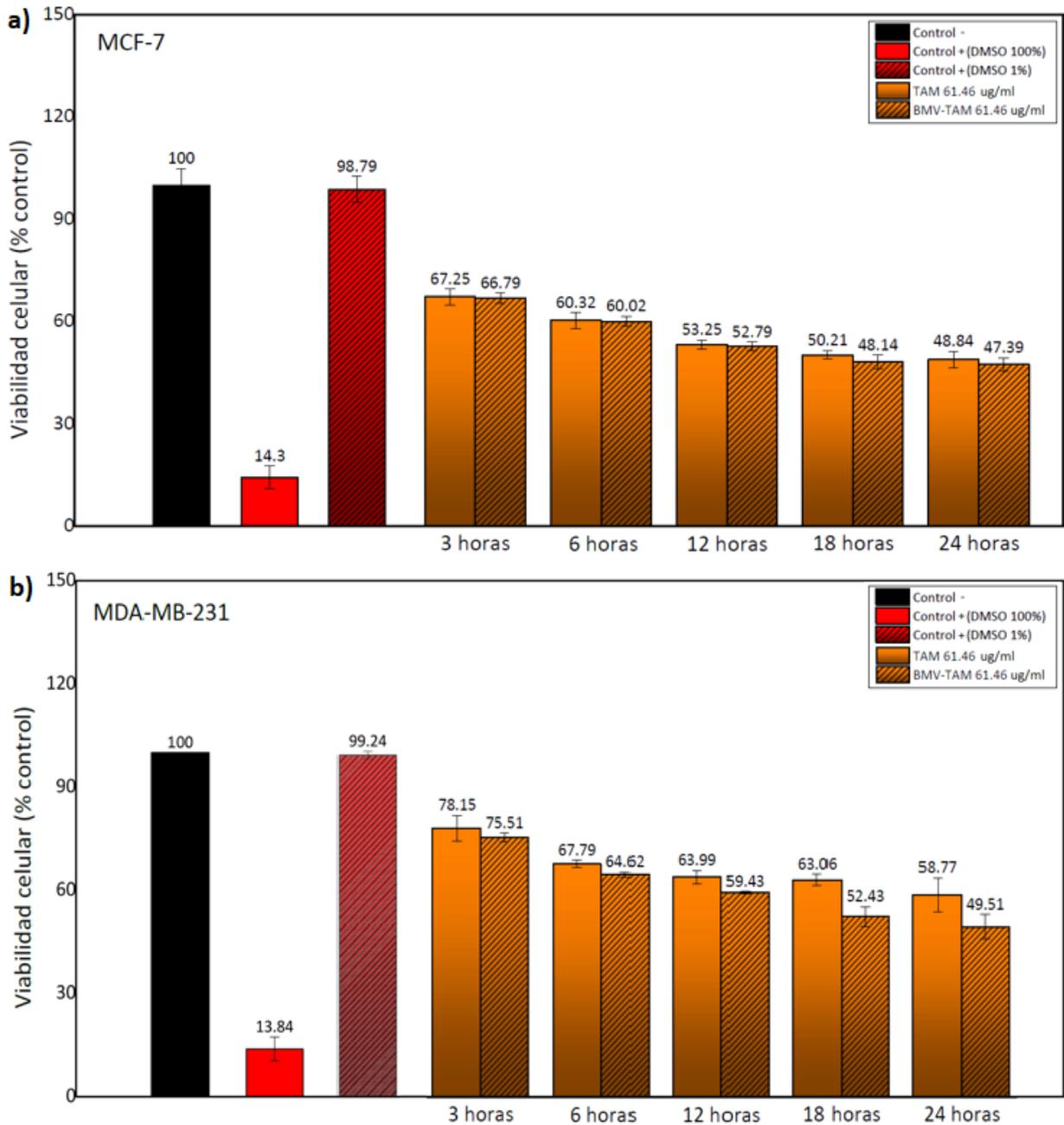


Figura 26. Efecto del tratamiento tamoxifeno y BMV-tamoxifeno a diferentes tiempos en células MCF-7 (a) y MDA-MB-231 (b) mediante el ensayo MTT. La viabilidad celular se determinó mediante el método del MTT en células incubadas a una concentración de fármaco de 61.46 $\mu\text{g/ml}$ durante 3, 6, 12, 18 y 24 horas. Los resultados se expresan como el porcentaje de supervivencia celular respecto al control sin tratar, que representa el 100%.

3.8.4 Determinación de la capacidad del nanovehículo BMV-CPT de inhibir la proliferación en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231

La capacidad del nanovehículo BMV-CPT de inhibir el crecimiento celular se determinó de igual manera mediante el ensayo colorimétrico del MTT. Las células se incubaron con diferentes concentraciones de camptotecina y BMV-CPT durante 24 horas, y se determinó la capacidad de proliferación de las células. A partir de los resultados obtenidos se construyeron las gráficas de supervivencia que se muestran en la Figura 27. A partir de estos resultados se calcularon la dosis IC50 e IC75, respecto a las mismas células sin tratar.

La tabla 2 muestra el valor de IC75 calculado para las células MCF-7 después de 24 horas de tratamiento continuo con camptotecina o BMV-CPT. La concentración IC75 obtenida para camptotecina fue 6.91 $\mu\text{g/ml}$. En el caso del BMV-CPT el valor obtenido para el IC75 fue de 77.02 $\mu\text{g/ml}$.

La tabla 2 muestra de igual manera el valor de IC75 calculado para las células MDA-MB-231 después de 24 horas de tratamiento continuo con camptotecina o BMV-CPT. La concentración IC75 obtenida para camptotecina fue 8.85 $\mu\text{g/ml}$. En el caso del BMV-CPT el valor obtenido para el IC75 fue de 0.06 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 2. Valores de las concentraciones de camptotecina y BMV-CPT que inhiben el crecimiento celular un 75% (IC75) en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231. Los valores se determinaron a partir de los resultados de las gráficas de crecimiento que se muestran en la Figura 27.

Línea celular	Tratamiento	IC75 ($\mu\text{g/ml}$)
MCF-7	Camptotecina	6.91 \pm 1.41
	BMV-CPT	77.02 \pm 5.46
MDA-MB-231	Camptotecina	8.85 \pm 3.24
	BMV-CPT	0.06 \pm 0.016

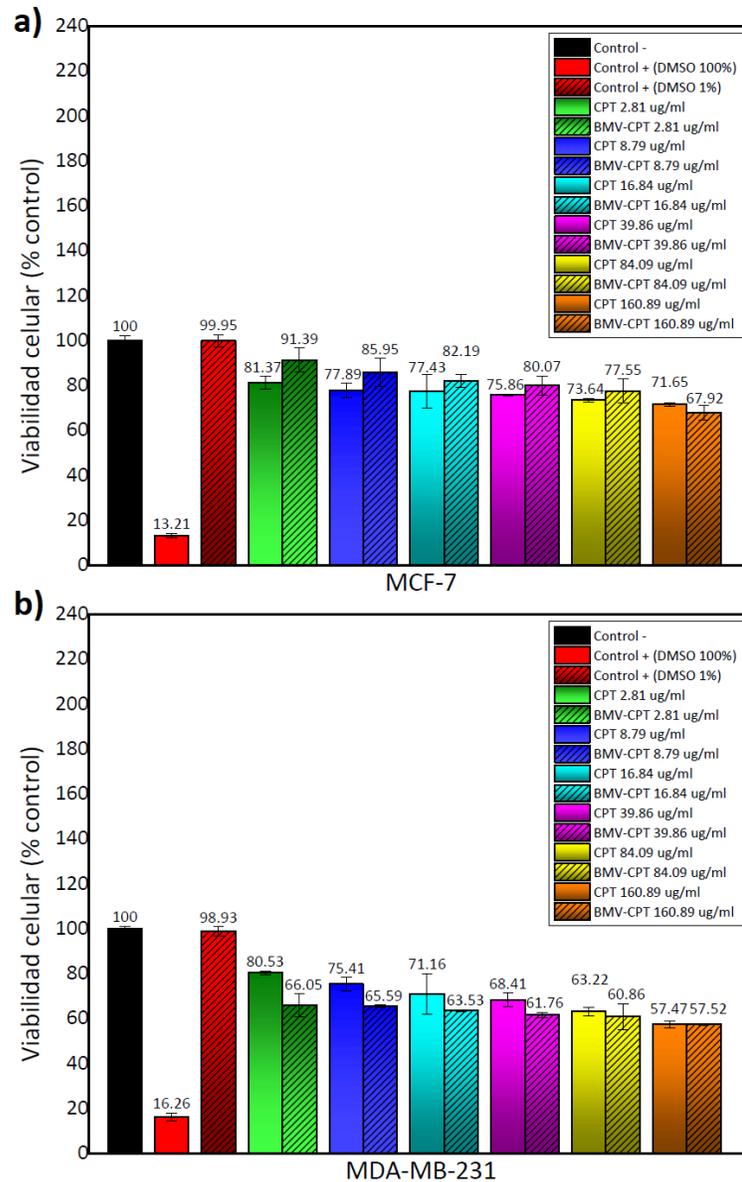


Figura 27. Efecto del tratamiento camptotecina y BMV-CPT en células MCF-7 (a) y MDA-MB-231 (b) mediante el ensayo MTT. La viabilidad celular se determinó mediante el método del MTT en células incubadas con los diferentes tratamientos durante 24 horas. Los resultados se expresan como el porcentaje de supervivencia celular respecto al control sin tratar, que representa el 100%.

3.8.5 Análisis de la muerte celular por apoptosis y necrosis

El ensayo del MTT nos permitió determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento celular inducido por los nanovehículos BMV-tamoxifeno. Sin embargo, este tipo de ensayo no permite analizar si la muerte de las células tiene lugar por apoptosis o por necrosis. Por este motivo, decidimos analizar la distribución celular por medio de citometría de flujo. Se analizaron los patrones de tinción con calceína-AM y yoduro de propidio asociados a cada tratamiento para diferenciar las células viables, apoptóticas y necróticas. Calceína-AM es un agente de tinción celular no fluorescente, la cual es absorbida por las células

vivas siendo transportada a través de la membrana celular. La actividad de las enzimas esterasas que se encuentran dentro de las células transforma la calceína-AM en calceína que es altamente fluorescente (Loyzaaga, Pablo, 2011). El yoduro de propidio es un agente de intercalación fluorescente que se puede usar para teñir las células necróticas y en apoptosis tardía, ya que se une al ADN mediante la intercalación entre las bases nitrogenadas (Lecoœur, 2002).

La Figura 28 muestra las gráficas de muerte celular realizadas a partir de la estadística que se obtuvo de los diagramas de puntos (Figura 29, anexos) para las células MDA-MB-231. Aunque en las células sin tratar (control -) siempre se observó un pequeño porcentaje de muerte celular, la fracción de células viables fue muy elevada durante todos los tiempos analizados.

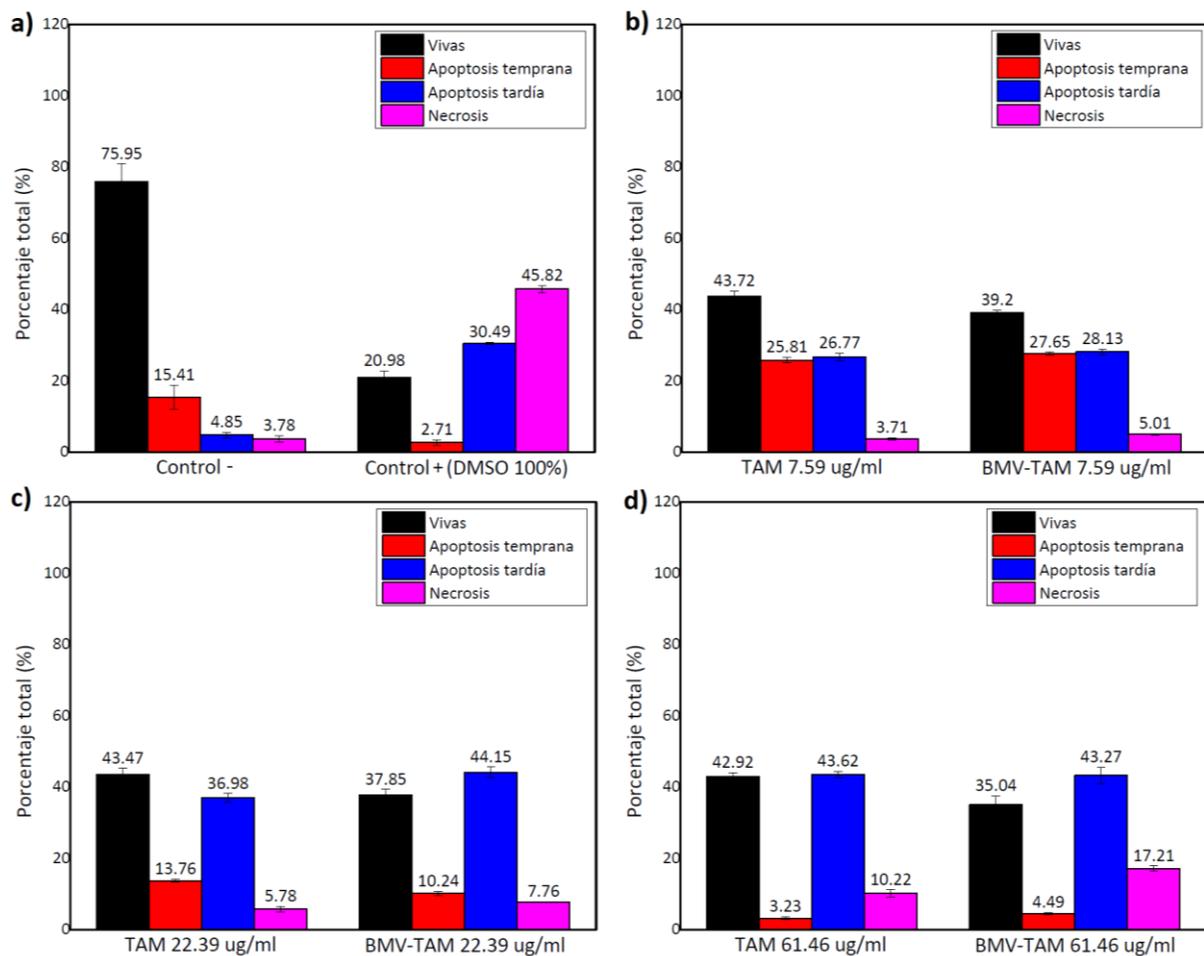


Figura 28. Gráficas de muerte celular obtenidas por citometría de flujo para MDA-MB-231. Se utilizó doble tinción con calceína-AM y yoduro de propidio de células MDA-MB-231 tratadas con diferentes dosis de tamoxifeno o BMV-tamoxifeno. Las células tratadas con los diferentes tratamientos se tiñeron y analizaron por citometría de flujo para determinar la proporción de células viables (graficas color negro), apoptóticas (graficas color rojo y azul), y necróticas (graficas color rosa). a) control negativo (vivas) y control positivo (muertas; DMSO 100%). b) tratamiento de 7.29 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifeno y BMV-tamoxifeno. c) tratamiento de 22.39 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifeno y BMV-tamoxifeno. d) tratamiento de 61.46 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifeno y BMV-tamoxifeno. Los experimentos se realizaron cuatro veces, obteniendo resultados similares.

El tratamiento de las células MBA-MB-231 con 7.29 $\mu\text{g/ml}$ de BMV-tamoxifeno (Figura 28-b) provocó un porcentaje de apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis de 27.65, 28.13 y 5.01 respectivamente. Para el fármaco libre a la misma concentración se obtuvo un porcentaje de 25.81, 26.67 y 3.7. De estos resultados se puede observar que el tratamiento con BMV-tamoxifeno provoca un ligero aumento en el porcentaje de células apoptóticas y necróticas en comparación con el tamoxifeno libre.

El tratamiento con 22.39 $\mu\text{g/ml}$ de BMV-tamoxifeno provocó un aumento en la apoptosis tardía de manera significativa en las células MDA-MB-231 (Figura 28-c). El porcentaje de células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis para este tratamiento fue de 10.24, 44.15 y 7.76 respectivamente. Para el fármaco libre a la misma concentración se obtuvo un porcentaje de 13.76, 36.98 y 5.78. Se puede observar que el tratamiento con BMV-tamoxifeno provocó un aumento de células en apoptosis tardía en comparación al fármaco libre.

Finalmente, el tratamiento con 61.46 $\mu\text{g/ml}$ de BMV-tamoxifeno provocó un aumento significativo en la necrosis en las células MDA-MB-231 (Figura 28-d). El porcentaje de células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis para este tratamiento fue de 4.49, 43.27 y 17.21 respectivamente. Mientras que para el fármaco libre a la misma concentración se obtuvo un porcentaje de 3.23, 43.62 y 10.22. De estos resultados se puede concluir que el tratamiento con BMV-tamoxifeno provoca un aumento en la muerte por necrosis de las células MDA-MB-231 en comparación al fármaco libre.

3.8.6 Análisis morfológico de las líneas celulares

En la Figura 29 podemos observar los cambios en la morfología de la línea celular MCF-7, después de 24 horas de tratamiento con tamoxifeno, camptotecina, BMV-tamoxifeno y BMV-camptotecina respectivamente. Se apreciaron cambios en la morfología de las células MCF-7 en los diferentes tratamientos con respecto a las células parentales (control negativo). MCF-7 presenta una morfología de tipo epitelial. En la Figura 29-b se puede observar cristales de tamoxifeno en los cultivos celulares cuando este es administrado de manera libre. De igual manera lo mismo es observando cuando la camptotecina es administrada libremente, Figura 29-d. Las células que se incubaron con el fármaco adherido a las cápsidas virales no presentaron la cristalización del fármaco, Figura 29-c y 29-e.

En la Figura 30 podemos observar los cambios en la morfología de la línea celular MDA-MB-231, después de 24 horas de tratamiento con tamoxifeno, camptotecina, BMV-tamoxifeno y BMV-camptotecina respectivamente. De igual manera, se apreciaron cambios en la morfología de las células MDA-MB-231 en los diferentes tratamientos con respecto a las células parentales. Normalmente, MDA-MB-231 tiene una morfología tipo fibroblasto. A pesar de tener un origen epitelial, debido al nivel de mutación y agresividad de estas células, la mayoría de las características de unión y adhesión se pierden para ganar aquéllas que les permitan migrar e incrementar el potencial de invasión. En la Figura 30-b se puede observar cristales de tamoxifeno en los cultivos celulares cuando este es administrado de manera libre. Lo mismo es observando cuando la camptotecina es administrada libremente, Figura 30-d. Las células que se incubaron con el fármaco adherido a las cápsides virales no presentaron la cristalización del fármaco, Figura 30-c y 30-e.

En ambas líneas celulares los cristales de tamoxifeno presentaron una morfología en forma de varilla (Figura 30-d). Se observó que el número de cristales estaba correlacionado con la concentración de tamoxifeno, obteniendo un mayor número de estos en donde se utilizó una concentración mayor de fármaco. Por otra parte, los cristales de camptotecina presentaron una morfología en forma de microvarillas (Figura 30-f). De igual manera, se observó que el número de cristales estaba correlacionado con la concentración de camptotecina utilizada.

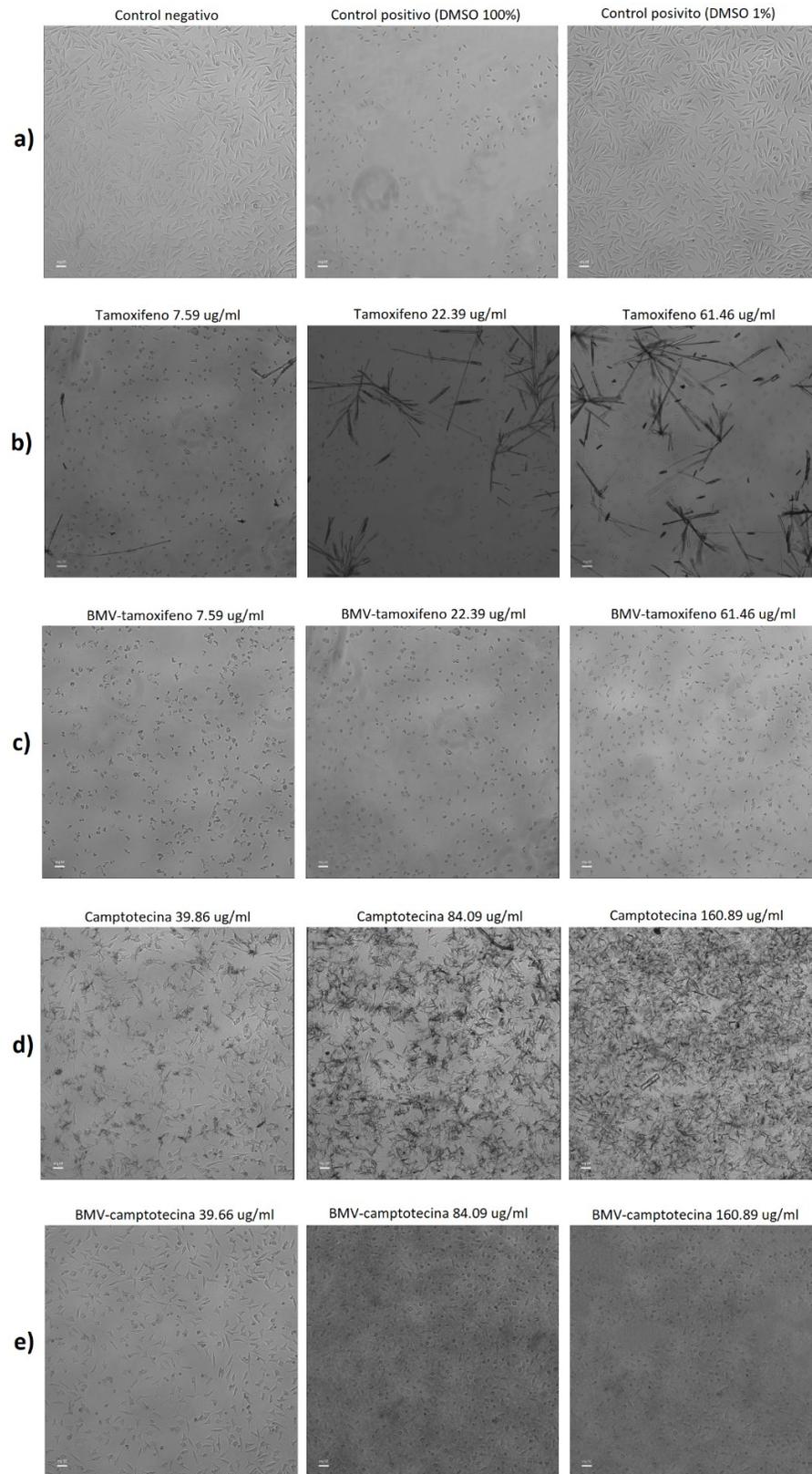


Figura 29. Cambios en la morfología celular en MCF-7 después de 24 horas de tratamientos. a) Control negativo y positivo. b) Concentraciones 7.59, 22.39 y 61.46 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tamoxifeno. c) concentraciones 7.59, 22.39 y 61.46 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BMV-tamoxifeno. d) concentración de camptotecina 39.86, 84.09 y 160.89 $\mu\text{g}/\text{ml}$. e) concentración de 39.86, 84.09 y 160.89 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BMV-camptotecina. Microscopio invertido aumento 10x.

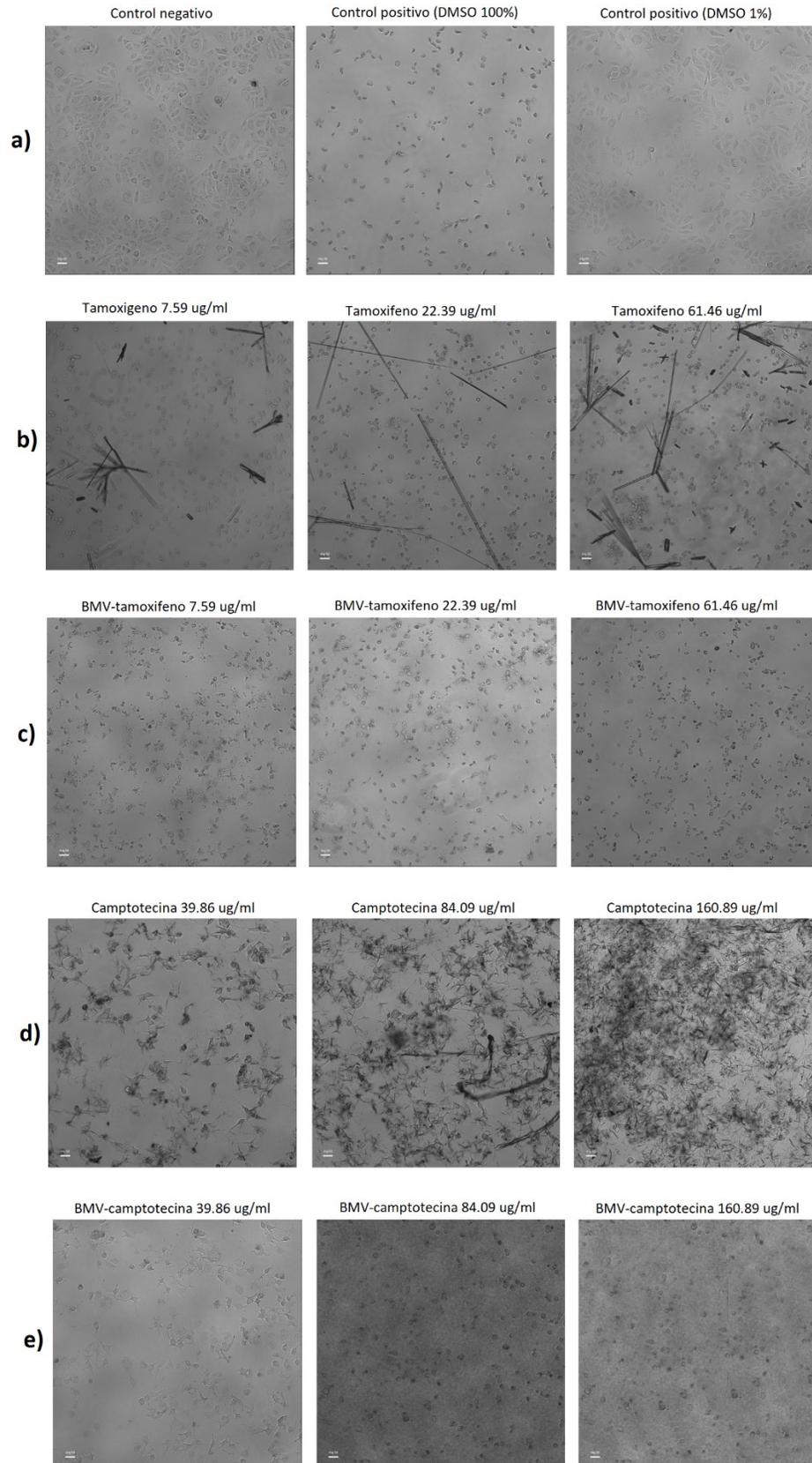


Figura 30. Cambios en la morfología celular en MDA-MB-231 después de 24 horas de tratamiento. a) Control negativo y positivo. b) concentraciones 7.59, 22.39 y 61.46 $\mu\text{g/ml}$ de tamoxifeno. c) concentraciones 7.59, 22.39 y 61.46 $\mu\text{g/ml}$ de BMV-tamoxifeno. d) concentración de camptotecina 39.86, 84.09 y 160.89 $\mu\text{g/ml}$. e) concentración de 39.86, 84.09 y 160.89 $\mu\text{g/ml}$ BMV-camptotecina. Microscopio invertido aumento 10x.

Capítulo 4. Discusión

Se ha demostrado en varios trabajos realizados a partir de las proteínas que conforman la cápside del CCMV o BMV la encapsidación múltiple de enzimas (Minten et al., 2011), la activación de profármacos mediante enzimas encapsidadas (Sánchez-Sánchez et al., 2014), la encapsidación de insulina (Escobedo, D., 2018) , entre muchos otros, el amplio potencial que presentan los virus para su utilización en nanomedicina, ya sea como nanovehículos, nanocontenedores o bionanorreactores. Sin embargo, no hay ningún trabajo reportado hasta la fecha sobre el uso de cápsides virales del CCMV o BMV como nanovehículo de fármacos hidrofóbicos. Debido a esto, la obtención de un nanovehículo de manera rápida, eficiente, pura, económica a partir de cápsides virales representa un paso imprescindible para su futura aplicación en nanomedicina. Con base en lo anterior, en el presente proyecto de tesis se desarrolló un procedimiento eficiente para la producción de nanovehículos de moléculas hidrofóbicas (tamoxifeno y camptotecina) utilizando la cápside del BMV como modelo.

La presencia de motivos hidrofóbicos en la cápside tanto del CCMV como del BMV da lugar a que diversas moléculas apolares puedan adherirse por interacciones hidrofóbicas a este virus. La determinación *in silico* de motivos hidrofóbicos se realizó utilizando la cantidad de estructuras secundarias hidrofóbicas que presenta el CCMV y BMV (Figura 31-32, anexos). La cantidad de motivos hidrofóbicos para el CCMV y BMV fue 1260 y 1620 respectivamente. El criterio utilizado para determinar si un motivo hidrofóbico es hidrofóbico o no, fue el explicado por Gromiha y Selvaraj en 1998. El método se basa en determinar la cantidad de aminoácidos en la estructura secundaria, y si más de la mitad de aminoácidos son hidrofóbicos la estructura tendera a presentar un comportamiento hidrofóbico. La razón por la cual el BMV contiene 360 motivos hidrofóbicos más que el CCMV se desconoce, debido a que no se ha realizado un estudio previo sobre este tema en específico. Consideramos que es debido a que estas proteínas de la cápside comparten solo un 70% de homología en su secuencia (Speir et al., 1995), permitiendo que el 30% restante se pliegue de manera diferente, lo cual podría llevar a que el BMV se conforme de una manera más hidrofóbica que el CCMV. Con base en lo anterior se decidió utilizar el BMV como modelo.

Primeramente, para llevar a cabo el proyecto se realizó la producción y purificación del virus BMV. La producción de BMV se realizó en verano, ya que la cebada (huésped del virus) necesita un clima fresco y moderadamente seco para alcanzar la madurez fisiológica (Roa, Y., 2017). Después de realizar la colecta de hojas infectadas y utilizando el procedimiento para su purificación se obtuvo un rendimiento considerable, 0.5 mg por cada gramo de hoja infectada. Así, también se determinó el tamaño del BMV

nativo a través de dispersión dinámica de luz (Figura 6), obteniendo un diámetro hidrodinámico de 24.64 ± 1.43 nm, muy cercano al reportado en la literatura (Chen, Kao, & Dragnea, 2008).

Los cálculos teóricos realizados sobre la concentración óptima del tamoxifeno que puede ser atrapado por la cápside viral, muestran que para que todos los sitios hidrofóbicos de la cápside del virus BMV (200 μ g) se encuentren ocupados por moléculas de tamoxifeno, se deben añadir 26.18 μ g del fármaco. Esta carga equivale al 13.1% en peso. Es importante recalcar que este resultado se calculó a partir de los estudios *in silico* realizados sobre la cantidad de motivos hidrofóbicos presentes en las proteínas de cápside del BMV. La cantidad de motivos hidrofóbicos por cápside viral es de 1620, por lo cual teóricamente 1620 moléculas de tamoxifeno podrían interactuar con el virus, considerando una molécula hidrofóbica por motivo hidrofóbico.

Previo a la inserción del tamoxifeno a la cápside del BMV, se analizaron diferentes concentraciones de solventes (DMSO y etanol) para determinar la concentración del solvente a la cual nuestra cápside fuera estable, sin afectar las interacciones hidrofóbicas que se generan entre los motivos hidrofóbicos de la cápside y el fármaco. Las cápsides nativas de BMV que fueron expuestas a concentraciones entre 1-20% de DMSO con o sin Mg^{+2} como estabilizante, mostraron una buena estabilidad en comparación al virus que se encontraba en solución amortiguadora de virus. Esto es debido a que se ha reportado que la forma compacta nativa del BMV se encuentra entre valores de pH de 3 a 6 (Bockstahler y Kaesberg, 1962). Los valores de pH de DMSO a esas concentraciones se encontraron dentro del rango óptimo (Figura 7). Las cápsides que fueron expuestas a concentraciones entre 1-20% de etanol sin Mg^{+2} , presentaron una estabilidad baja, ya que se obtuvieron tamaños de 40 a 60 nm (Figura 9). Por otra parte, las que fueron expuestas a las mismas concentraciones de etanol, pero con Mg^{+2} , presentaron una mejor estabilidad, obteniendo tamaños de 27 a 41 nm. El Mg^{+2} actúa como estabilizante del BMV, ya previene la transición térmica interactuando con el ARN del virus (Pfeiffer et al., 1976). El aumento en el diámetro hidrodinámico al utilizar estas concentraciones de etanol es debido a que el pH es mucho mayor a 6, lo cual podría estar generando un hinchamiento considerable del virus o hasta el mismo desensamble de este. Concentraciones mayores a 20% tanto de DMSO como de etanol no se tomaron en cuenta, ya que se ha demostrado que altas concentraciones perjudican considerablemente las interacciones hidrofóbicas, ya que las moléculas siempre se encontrarían disueltas en el solvente (Kalepu & Nekkanti, 2015). Con base a los resultados anteriores, se concluyó que la concentración adecuada del solvente para realizar la adhesión de los fármacos hidrofóbicos (tamoxifeno y camptotecina) a la cápside viral del BMV es de 20% de DMSO.

El estudio y caracterización del número de moléculas que son atrapadas por la cápside viral fue determinado por medio de espectros de emisión de fluorescencia. Los espectros de emisión de tamoxifeno (Figura 10) presentaron un incremento logarítmico en la intensidad al aumentar la concentración del fármaco. Las concentraciones de tamoxifeno 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se emplearon, ya que son valores que se encuentran por encima y por debajo del valor teórico calculado. Las mediciones de intensidad de fluorescencia del tamoxifeno se realizaron después de irradiar con UV durante 15 minutos para determinar indirectamente la cantidad de este fármaco. Esto es debido a que el tamoxifeno por si solo es un fluoróforo débil y al estar expuesto a la luz ultravioleta se transforma en 4-hidroxitamoxifeno y endoxifeno, los cuales proporcionan una mejor fluorescencia (Agudelo et al., 2013).

La ecuación de la función logarítmica obtenida en la curva de emisión de tamoxifeno y BMV tamoxifeno (Figura 11) se utilizaron para calcular la cantidad de fármaco atrapado en la cápside viral del BMV (Figura 13). Para una concentración de 200 μg de BMV y concentraciones de tamoxifeno de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se obtuvo un atrapamiento de 0.52, 1.43, 3.59, 7.59, 22.39 y 61.46 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectivamente. Consideramos que la razón por la cual la proporción de fármaco atrapado aumenta con concentraciones iniciales mayores de tamoxifeno, se debe a la probabilidad de que los motivos hidrofóbicos y el fármaco interactúen (interacciones hidrofóbicas) al aumentar el número de moléculas presentes en la solución.

La distribución de tamaño por volumen mostro que las cápsides virales expuestas a diferentes concentraciones de tamoxifeno (Figura 12) presentaron un incremento gradual en el diámetro hidrodinámico en comparación al virus BMV nativo. El tamaño predominante para una concentración de tamoxifeno de 61.46 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fue de 33.5 nm. Este resultado fue apoyado por las micrográficas obtenidas a través de microscopia electrónica de transmisión (Figura 15). El análisis del tamaño de las poblaciones presentes en la micrografía dio como resultado un tamaño promedio de 34.2 nm, aproximándose al valor obtenido por DLS. Con base a la distribución de tamaño y micrográficas obtenidas para BMV-tamoxifeno, se considera que el incremento se debe a la formación de una corona interna del fármaco en la cápside viral.

Es importante mencionar que una vez realizada la inserción de tamoxifeno a la cápside del BMV se ultrafiltraron las muestras para eliminar el exceso de tamoxifeno que no se había adherido a la cápside. Cualquier molécula de tamoxifeno libre fue removida a través de la membrana Amicon, cuyos poros son de 100 kDa. Los nanovehículos funcionalizados con tamoxifeno se recuperan con facilidad del filtro, debido a que el peso molecular de la cápside viral es de 4.6MDa.

A través de la cantidad de tamoxifeno atrapado en la cápside viral del BMV, se pudo obtener información acerca del número de moléculas de tamoxifeno adheridos por cápside viral. Se realizó una curva de calibración en función de la cantidad de μg de BMV y las diferentes concentraciones de tamoxifeno adherido a la cápside (Figura 14), para estimar el número de moléculas de tamoxifeno que se adhieren tanto por cápside viral como por motivo hidrofóbico. Para la concentración más baja de tamoxifeno adherido ($0.54 \mu\text{g/ml}$) se obtuvieron 32 moléculas por cápside viral y 0.02 moléculas por motivo hidrofóbico. Esto quiere decir que 32 moléculas están adheridas a la cápside del BMV, y que posiblemente solo estarían interactuando con 32 motivos hidrofóbicos de los 1620 presentes en la cápside. Es posible que las moléculas de tamoxifeno interaccionen con los motivos hidrofóbicos más apolares, es decir los que presentan la mayor cantidad de aminoácidos hidrofóbicos (isoleucina, fenilalanina, triptófano y valina) (Needham, T, 1970). Para la concentración más alta de tamoxifeno adherido ($61.46 \mu\text{g/ml}$) se obtuvieron 3804.9 moléculas por cápside viral y 2.4 moléculas por motivo hidrofóbico. Lo cual quiere decir que 3805 moléculas de tamoxifeno están adheridas a la cápside del BMV, y que cada 2 moléculas interactúan con 1 motivo hidrofóbico de los 1620 presentes. Con base en lo anterior, se refuerza la idea de una corona de fármaco interna, ya que las interacciones hidrofóbicas se pueden generar de igual manera entre las mismas moléculas de tamoxifeno.

En caso de la camptotecina, los cálculos teóricos para determinar la concentración óptima de este fármaco por cápside viral, arrojaron que para que todos los sitios hidrofóbicos en $200 \mu\text{g}$ de virus BMV se encuentren ocupados por moléculas de camptotecina se deben añadir $24.54 \mu\text{g}$. Esta carga equivale al 12.27% en peso. Los valores de concentración teóricos para el tamoxifeno y camptotecina son casi iguales, debido a que el peso molecular de estos es similar.

Los espectros de emisión de camptotecina (Figura 16) presentaron un incremento logarítmico en la intensidad al aumentar la concentración del fármaco. Las concentraciones de camptotecina 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y $200 \mu\text{g/ml}$ se emplearon, ya que son valores que se encuentran por encima y por debajo del valor teórico calculado.

La ecuación de la función logarítmica obtenida en la curva de emisión de camptotecina y BMV-camptotecina (Figura 17) se utilizaron para calcular la cantidad de fármaco atrapado en la cápside viral del BMV (Figura 19). Para una concentración de $200 \mu\text{g}$ de BMV y concentraciones de camptotecina de 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y $200 \mu\text{g/ml}$ se obtuvo un atrapamiento de 2.81, 8.79, 16.84, 39.86, 84.09 y $160.89 \mu\text{g/ml}$ respectivamente. La cantidad de camptotecina adherida a la cápside viral es proporcional a la concentración inicial de fármaco utilizado. Consideramos que la razón por la cual se atrapo una mayor

cantidad de moléculas de camptotecina en la cápside viral en comparación con el tamoxifeno, es debido a que el parámetro de hidrofobicidad (mas hidrofóbico) de la camptotecina es mucho mayor que el del tamoxifeno (Wen et al., 2017), lo cual proporciona una mayor estabilidad a las interacciones hidrofóbicas que se forman.

La distribución de tamaño por volumen mostro que las cápsides virales expuestas a diferentes concentraciones de camptotecina (Figura 18) presentaron un incremento gradual en el diámetro hidrodinámico en comparación al virus BMV nativo. El tamaño predominante para una concentración de camptotecina de 160.89 $\mu\text{g/ml}$ fue de 36.88 nm. Este resultado fue apoyado por las micrográfias obtenidas a través de microscopia electrónica de transmisión (Figura 21). El análisis del tamaño de las poblaciones presentes en la micrografía dio como resultado un tamaño promedio de 37.5 nm, y que están de acuerdo con el tamaño obtenido por DLS. De igual manera que para el tamoxifeno, se cree que el incremento gradual en el diámetro hidrodinámico de la cápside viral al incrementar la concentración de camptotecina, se debe a la formación de una corona interna del fármaco alrededor de la cápside. El tamaño del nanovehículo BMV-camptotecina fue ligeramente mayor en comparación al BMV-tamoxifeno, debido al parámetro de hidrofobicidad mencionado anteriormente.

Una vez realizada la inserción de camptotecina a la cápside del BMV se ultrafiltraron las muestras para eliminar el exceso de camptotecina que no se había adherido a la cápside. Cualquier molécula de camptotecina libre fue removida a través de la membrana Amicon, cuyos poros son de 100 kDa. Los nanovehículos funcionalizados con camptotecina se recuperan con facilidad del filtro, debido a que el peso molecular de la cápside viral es de 4.6 MDa.

A través de la cantidad de camptotecina atrapada en la cápside viral del BMV, se pudo obtener información acerca del número de moléculas de camptotecina adheridas por cápside viral. Se realizó una curva de calibración en función de la cantidad de μg de BMV y las diferentes concentraciones de camptotecina adheridas a la cápside (Figura 20). La curva de calibración mostró una relación lineal, por lo cual se realizó una estimación tanto del número de moléculas de camptotecina que se adhieren por cápside viral como por motivo hidrofóbico. Para la concentración más baja de camptotecina adherida (2.81 $\mu\text{g/ml}$) se obtuvieron 185.5 moléculas por cápside viral y 0.1 moléculas por motivo hidrofóbico. Esto quiere decir que 185 moléculas están adheridas a la cápside del BMV, y estarían interactuando con 185 motivos hidrofóbicos de los 1620 presentes en la cápside. De igual manera, es posible que las moléculas de camptotecina interaccionen con los motivos hidrofóbicos más apolares. Para la concentración más alta de camptotecina adherida (160.89 $\mu\text{g/ml}$) se obtuvieron 10622.8 moléculas por cápside viral y 6.6

moléculas por motivo hidrofóbico. Lo cual quiere decir que 10622 moléculas de camptotecina están adheridas a la cápside del BMV, y que posiblemente cada 6 moléculas interactúan con 1 motivo hidrofóbico de los 1620 presentes. Con base en lo anterior, se refuerza la idea de una corona de fármaco interna, ya que las interacciones hidrofóbicas se pueden generar de igual manera entre las mismas moléculas de camptotecina. El número de moléculas por cápside viral fue mayor para la camptotecina debido al parámetro de hidrofobicidad.

Para demostrar la viabilidad de los nanovehículos de fármacos hidrofóbicos (tamoxifeno y camptotecina) para su posible uso en terapias contra cáncer de mama, se analizó primeramente la capacidad de internalización de BMV nativo en la línea celular MCF-7 y MDA-MB-231. La caracterización a través de microscopia confocal de estas líneas celulares demostró que el BMV es capaz de internalizarse en células de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 debido muy probablemente a su pequeño tamaño (25 nm). Aún se desconoce el proceso exacto por el cual se internaliza el BMV dentro de la célula animal.

Continuando con la caracterización de los nanovehículos para sus posibles aplicaciones, se realizaron ensayos de viabilidad celular para determinar la capacidad del virus BMV de inhibir la proliferación en las líneas celulares hormono-dependientes MCF-7 y hormono-independientes MDA-MB-231. El ensayo MTT demostró que el BMV nativo aumenta la tasa de proliferación en comparación con el control positivo (vivas). Estos resultados fueron consistentes para las diferentes concentraciones de BMV nativo utilizados. Consideramos que el aumento en la viabilidad celular es debido a que la célula utiliza el material proteico del virus una vez internalizado como una fuente de energía. El aumento en el porcentaje de viabilidad celular está relacionado con la concentración de virus empleada.

Los ensayos de viabilidad celular para diferentes concentraciones de tamoxifeno y BMV-tamoxifeno en líneas celulares MCF7, demostraron que el tratamiento BMV-tamoxifeno a diferentes concentraciones es parecido en comparación con el fármaco libre. Esto es debido a que la línea MCF-7 expresa receptores de estrógenos, andrógenos, progestágenos y glucocorticoides (Holliday & Speirs, 2011), lo cual permite que el tamoxifeno actué con los receptores de estrógenos, internalizándose en la célula y activando la cascada de señalización que promueve la muerte celular por apoptosis. Para la línea celular MDA-MB-231, se demostró que las diferentes concentraciones de BMV-tamoxifeno disminuyen el porcentaje de viabilidad celular en comparación al fármaco libre aproximadamente 10%. Esto es debido a que la línea MDA-MB-231 no expresa receptores de estrógeno (Liu et al., 2014), lo cual no permite que el tamoxifeno se internalice por si solo dentro de la célula.

Los ensayos de viabilidad celular para diferentes concentraciones de camptotecina y BMV-camptotecina en líneas celulares MCF-7 y MDA-231, demostraron que el tratamiento BMV-camptotecina a diferentes concentraciones presenta viabilidades parecidas en comparación al fármaco libre. La razón por la cual no se observa una disminución en la viabilidad celular al utilizar BMV-camptotecina en MDA-MB-231 y MCF-7 en comparación al fármaco solo no se sabe, debido a que los mecanismos moleculares y de interacción detallados para este fármaco no se entienden completamente. Se tiene conocimiento de que uno de los principales modos de acción de este fármaco quimioterapéutico puede ser mediante la activación de la apoptosis (Makin y Dive, 2001). De hecho, varios investigadores han informado que la camptotecina induce apoptosis en varias células cancerosas (Sánchez-Alcázar et al., 2000; Tan et al., 2009).

El análisis de la muerte celular por necrosis y apoptosis para la línea celular MDA-MB-231 indica que BMV-tamoxifeno impacta de manera relevante en la viabilidad celular, induciendo un porcentaje de apoptosis y necrosis mayor en comparación al fármaco libre. Se observó una dependencia en el mecanismo de muerte celular involucrado según la concentración de fármaco. El porcentaje de apoptosis temprana en MD-MB-231 fue mayor cuando se empleó una concentración de tamoxifeno y BMV-tamoxifeno de 7.59 $\mu\text{g/ml}$. Se observó un incremento en el porcentaje de apoptosis tardía en MDA-MB-231 al utilizar concentraciones de tamoxifeno y BMV-tamoxifeno de 22.39 $\mu\text{g/ml}$. El porcentaje de necrosis en MDA-MB-231 incremento al utilizar una concentración de tamoxifeno y BMV-tamoxifeno de 61.46 $\mu\text{g/ml}$. El incremento en el porcentaje de muerte celular de los nanovehículos en comparación al fármaco libre es debido a que las partículas de BMV-tamoxifeno pueden internalizarse dentro de las células MDA-MB-231. Con base a lo anterior, se puede deducir que las concentraciones bajas de tamoxifeno, promueven la muerte celular por apoptosis temprana; mientras que al incrementar la concentración de fármaco, este genera un aumento en la apoptosis tardía; y que concentraciones aún mayores de tamoxifeno generan un aumento en la muerte celular por necrosis. La apoptosis es un proceso genéticamente programado que puede volverse dañino si no está controlado y no responde a los mecanismos homeostáticos. Esto ocurre cuando los mecanismos apoptóticos se presentan en cantidades inadecuadas o desfasados en el tiempo de aparición. La necrosis ocurre de manera aguda, por una forma no fisiológica, mediante una agresión que causa lesión celular masiva; este proceso es desencadenado por toxinas, hipoxia severa o cualquier condición que genere caída de ATP (Zhang, Chen, Gueydan, & Han, 2018).

De igual manera mediante citometría de flujo, se determinó que la complejidad de la membrana celular cambiaba en relación con los tratamientos, siendo las concentraciones menores de BMV-tamoxifeno aquellos que ocasionaron que la membrana plasmática perdiera complejidad, en comparación

a las células que fueron tratadas únicamente con el fármaco (Figura 30). Esto se puede explicar debido a que los nanovehículos BMV-tamoxifeno se pueden internalizar con mayor facilidad al interior de las células MDA-MB-231, induciendo de esta forma una muerte celular programada, la cual induce que las células se vayan haciendo cada vez más pequeñas y menos complejas. En cambio, la concentración mayor de BMV-tamoxifeno, al inducir una muerte celular por necrosis, genera que las células pierdan la integridad de la membrana de forma abrupta, sin disminuir su tamaño ni complejidad celular.

El cambio en la morfología celular de ambas líneas celulares (MCF-7 y MDA-MB-231) para los diferentes tratamientos, se debe a los diferentes mecanismos de muerte celular que se activan al introducir una toxina, en este caso los diferentes tratamientos (tamoxifeno, BMV-tamoxifeno, camptotecina y BMV-camptotecina). En ambas líneas celulares los diferentes tratamientos generaron una disminución en el tamaño de las células en comparación al control parental. Esto es debido a que los fármacos utilizados (tamoxifeno y camptotecina) suprimen funciones celulares importantes que alteran a las células, llevándolas a un punto tal que comprometa su viabilidad.

La cristalización del fármaco (Figura 29-30) para los tratamientos donde se utilizó el fármaco libre (camptotecina y tamoxifeno), se genera debido al carácter hidrofóbico y alta concentración de las moléculas, y a que las células no son capaces de internalizar todas las moléculas del fármaco. Por lo cual, el fármaco que queda en el espacio extracelular se precipita, permitiendo la cristalización de fármaco remanente. Estudios previos han demostrado que la cristalización del tamoxifeno en pacientes genera maculopatía (Baget, Romero, & Traveset, 2008). Para los tratamientos con BMV-tamoxifeno y BMV-camptotecina a las mismas concentraciones que el fármaco libre no se observó la cristalización del fármaco. Esto es debido a que al estar adherido el fármaco a un virus que tiene la capacidad de internalizarse en las células MCF-7 y MDA-MB-231, permite que todas las moléculas se encuentren dentro de la célula, evitando la cristalización del fármaco, lo cual conllevaría a la reducción de los efectos secundarios adversos de estos medicamentos.

Capítulo 5. Conclusiones

La purificación de BMV nativo a través de hojas infectadas de cebada permitió obtener un alto rendimiento, en comparación a la mayoría de valores que se han publicado hasta el momento. La cápside del BMV representa un candidato ideal para investigaciones posteriores sobre terapias de entrega de fármacos hidrofóbicos, por lo cual se consideró utilizar los motivos hidrofóbicos de la cápside para el diseño de un nanovehículo de fármacos hidrofóbicos.

Fue posible cargar las cápsides del BMV con fármacos hidrofóbicos (tamoxifeno y camptotecina) a partir de las interacciones de los motivos hidrofóbicos presentes en el virus. Los resultados obtenidos a través de las diferentes caracterizaciones realizadas (DLS, espectrofluorimetría y TEM) muestra que el procedimiento desarrollado para generar la adhesión de tamoxifeno y camptotecina a la cápside viral resultaron ser favorables para la formación de nanopartículas BMV-tamoxifeno y BMV-camptotecina.

Se demostró que el BMV posee la capacidad de penetrar la membrana celular de las células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, volviéndolos un prospecto a utilizar para el transporte de diversas moléculas. Los nanovehículos BMV-tamoxifeno y BMV-camptotecina, poseen la capacidad de internalizarse y disminuir la viabilidad celular en líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. En términos de citotoxicidad BMV-tamoxifeno y BMV-camptotecina no presentaron cambios significativos en la viabilidad celular de MCF-7 y MDA-MB-231 en comparación al fármaco libre.

La citometría de flujo para los diferentes tratamientos de tamoxifeno y BMV-tamoxifeno nos permitieron deducir que el mecanismo de muerte celular (apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis) está asociado a la concentración de tamoxifeno utilizado. BMV-tamoxifeno genera una complejidad celular de MDA-MB-231 menor en comparación al fármaco libre. BMV-tamoxifeno provoca un aumento en el porcentaje de apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis en comparación al fármaco libre. Futuros experimentos deberán realizarse para validar el uso de nanovehículos BMV-tamoxifeno en líneas celulares hormono-independientes, así como también con camptotecina.

Es importante destacar que cuando es administrado tamoxifeno y camptotecina por medio de cápsides virales del BMV, no se presentaron la formación de cristales en las células en comparación a los fármacos administrados libremente, proyectando a estos nanovehículos como un candidato ideal para pruebas futuras en terapias para la entrega de fármacos anticancerígenos hidrofóbicos.

Literatura citada

- Agudelo, D., Sanyakamdhorn, S., Nafisi, S., & Tajmir-Riahi, H.-A. (2013). Transporting Antitumor Drug Tamoxifen and Its Metabolites, 4-Hydroxytamoxifen and Endoxifen by Chitosan Nanoparticles. *PLOS ONE*, *8*(3), e60250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060250>
- Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2004). Drug delivery systems: Entering the mainstream. *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5665), 1818–1822. <https://doi.org/10.1126/science.1095833>
- American Cancer Society, A. C. S. (2017). Tratamiento del cáncer de seno. Recuperado el 16 de agosto de 2018, de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/tratamiento.html>
- Baget, M., Romero, P., & Traveset, A. (2008). Maculopatía por tamoxifeno: Estudio mediante la tomografía de coherencia óptica. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, *83*(10), 615–617.
- Brumfield, S., Willits, D., Tang, L., Johnson, J. E., Douglas, T., & Young, M. (2004). Heterologous expression of the modified coat protein of Cowpea chlorotic mottle bromovirus results in the assembly of protein cages with altered architectures and function. *The Journal of General Virology*, *85*(Pt 4), 1049–1053. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19688-0>
- Cadena-Nava, R. D., Comas-García, 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>
- Castro, I., Arias, J., & Barrón, A. (2001). Antiestrógenos: Mecanismo de acción y aplicaciones clínicas. *Salud Pública de México*, *43*(6). Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10643612>
- Chen, C., Kao, C. C., & Dragnea, B. (2008). Self-Assembly of Brome Mosaic Virus Capsids: Insights from Shorter Time-Scale Experiments. *The journal of physical chemistry. A*, *112*(39), 9405–9412. <https://doi.org/10.1021/jp802498z>
- Claudia Arce. (2011). Cáncer de mama. *Oncología, Cancerología 6*. Recuperado de <http://incan-mexico.org/revistainvestiga/elementos/documentosPortada/1327324685.pdf>
- Cravo, A. S., & Mrsny, R. J. (2013). A Time Travel Journey Through Cancer Therapies. En *Cancer Targeted Drug Delivery* (pp. 3–35). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7876-8_1
- De Jong, W. H., & Borm, P. J. (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, *3*(2), 133–149.

- Duncan, R. (2003). The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 2(5), 347–360. <https://doi.org/10.1038/nrd1088>
- Escobedo, D. (2018). *Nanovehículos para insulina*. 82.
- Hassanpour, S. H., & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127–129. <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>
- Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13(4), 215. <https://doi.org/10.1186/bcr2889>
- INEGI, I. (2017). *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer*. Recuperado de http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf
- Jones, C. B., Clements, M. K., Wasi, S., & Daoud, S. S. (1997). Sensitivity to camptothecin of human breast carcinoma and normal endothelial cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 40(6), 475–483. <https://doi.org/10.1007/s002800050690>
- Kaiser, C. R., Flenniken, M. L., Gillitzer, E., Harmsen, A. L., Harmsen, A. G., Jutila, M. A., ... Young, M. J. (2007). Biodistribution studies of protein cage nanoparticles demonstrate broad tissue distribution and rapid clearance in vivo. *International Journal of Nanomedicine*, 2(4), 715–733.
- Kalepu, S., & Nekkanti, V. (2015). Insoluble drug delivery strategies: Review of recent advances and business prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 442–453. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.003>
- Lavelle, L., Michel, J.-P., & Gingery, M. (2007). The disassembly, reassembly and stability of CCMV protein capsids. *Journal of Virological Methods*, 146(1–2), 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.07.020>
- Lecoeur, H. (2002). Nuclear Apoptosis Detection by Flow Cytometry: Influence of Endogenous Endonucleases. *Experimental Cell Research*, 277(1), 1–14. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5537>
- Li, F., Jiang, T., Li, Q., & Ling, X. (2017). Camptothecin (CPT) and its derivatives are known to target topoisomerase I (Top1) as their mechanism of action: Did we miss something in CPT analogue molecular targets for treating human disease such as cancer? *American Journal of Cancer Research*, 7(12), 2350–2394.
- Liu, C.-Y., Hung, M.-H., Wang, D.-S., Chu, P.-Y., Su, J.-C., Teng, T.-H., ... Chen, K.-F. (2014). Tamoxifen induces apoptosis through cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A-dependent phospho-Akt

- inactivation in estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Breast Cancer Research: BCR*, 16(5), 431. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0431-9>
- Lockney, D. M., Guenther, R. N., Loo, L., Overton, W., Antonelli, R., Clark, J., ... Franzen, S. (2011). The Red clover necrotic mosaic virus capsid as a multifunctional cell targeting plant viral nanoparticle. *Bioconjugate Chemistry*, 22(1), 67–73. <https://doi.org/10.1021/bc100361z>
- Loredo-Tovias, M., Duran-Meza, A. L., Villagrana-Escareño, M. V., Vega-Acosta, R., Reynaga-Hernández, E., Flores-Tandy, L. M., ... Ruiz-García, J. (2017). Encapsidated ultrasmall nanolipospheres as novel nanocarriers for highly hydrophobic anticancer drugs. *Nanoscale*, 9(32), 11625–11631. <https://doi.org/10.1039/c7nr02118f>
- Loyzaga, Pablo. (2011). *Cultivo de células animales y humanas: Aplicaciones en medicina regenerativa*. Editorial Visión Libros.
- 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>
- Ma, Y., Nolte, R. J. M., & Cornelissen, J. J. L. M. (2012). Virus-based nanocarriers for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(9), 811–825. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.01.005>
- Maye, M. M. (2013). Self-assembly: *En route* to patchy superlattices. *Nature Nanotechnology*, 8(1), 5–6. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.244>
- Minten, I. J., Claessen, V. I., Blank, K., Rowan, A. E., Nolte, R. J. M., & Cornelissen, J. J. L. M. (2011). Catalytic capsids: The art of confinement. *Chemical Science*, 2(2), 358–362. <https://doi.org/10.1039/C0SC00407C>
- Needham, T. (1970). *The Solubility of Amino Acids in Various Solvent Systems*. (Open Access Dissertations), 95.
- OMS, O. (2016a). Cáncer. Recuperado el 16 de agosto de 2018, de World Health Organization website: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- OMS, O. (2016b). Datos y cifras sobre el cáncer. Recuperado el 16 de agosto de 2018, de WHO website: <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/>
- Pájaro Castro, N., Olivero Verbel, J., & Redondo Padilla, J. (2013). Nanotecnología aplicada a la medicina. *Revista Guillermo de Ockham*, 11(1), 125. <https://doi.org/10.21500/22563202.606>

- Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., & Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*, 2(12), 751–760. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.387>
- Pérez-Sánchez, J. E. (2017). *Cápsidas virales como nanovehículos de moléculas hidrofóbicas*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pfeiffer, P., Herzog, M., & Hirth, L. (1976). Stabilization of Brome Mosaic Virus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 276(943), 99–107. Recuperado de JSTOR.
- Pokorski, J. K., & Steinmetz, N. F. (2011). The art of engineering viral nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 8(1), 29–43. <https://doi.org/10.1021/mp100225y>
- Roa, Y. (2017). Cultivo de cebada. Recuperado el 15 de agosto de 2019, de Agronomaster website: <https://agronomaster.com/cultivo-de-cebada/>
- Saini, R., Saini, S., & Sharma, S. (2010). Nanotechnology: The Future Medicine. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 3(1), 32–33. <https://doi.org/10.4103/0974-2077.63301>
- Sánchez-Sánchez, L., Cadena-Nava, R. D., Palomares, L. A., Ruiz-Garcia, J., Koay, M. S. T., Cornelissen, J. J. M. T., & Vazquez-Duhalt, R. (2014). Chemotherapy pro-drug activation by biocatalytic virus-like nanoparticles containing cytochrome P450. *Enzyme and Microbial Technology*, 60, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.04.003>
- Sanyakamdhorn, S., Agudelo, D., Bekale, L., & Tajmir-Riahi, H. A. (2016). Targeted conjugation of breast anticancer drug tamoxifen and its metabolites with synthetic polymers. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 145, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.04.035>
- Sgro, J.-Y., Jacrot, B., & Chroboczek, J. (1986). Identification of regions of brome mosaic virus coat protein chemically cross-linked in situ to viral RNA. *European Journal of Biochemistry*, 154(1), 69–76. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09360.x>
- Smalley, M. J., & Ashworth, A. (2003). Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nature Reviews Cancer*, 3, 832–844. <https://doi.org/Smalley, Matthew John> <<http://orca.cf.ac.uk/view/cardiffauthors/A3534339.html>> and Ashworth, Alan 2003. Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nature Reviews Cancer* 3, pp. 832-844. 10.1038/nrc1212 <<http://dx.doi.org/10.1038/nrc1212>>
- Speir, J. A., Munshi, S., Wang, G., Baker, T. S., & Johnson, J. E. (1995). Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure (London, England: 1993)*, 3(1), 63–78.

- Steinmetz, N. F. (2010). Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(5), 634–641. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.04.005>
- Strebhardt, K., & Ullrich, A. (2008). Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews. Cancer*, 8(6), 473–480. <https://doi.org/10.1038/nrc2394>
- Tomellini, R. (2005). *Vision paper and basis for a strategic research agenda for nanomedicine*. Belgium: European Commission Luxembourg, Office for Official Publication of the European Commission.
- Valadares, S., Silveira Reis, I., Luisa Fontes, A., Fernandes, R., Biscaia, I., Torresão, I., & Sereno, P. (2012). Patrón de recidiva en carcinoma mamario. Comparación entre carcinomas hormonodependientes y hormonoindependientes. *Revista de Senología y Patología Mamaria*, 25(1), 8–13. [https://doi.org/10.1016/S0214-1582\(12\)70003-8](https://doi.org/10.1016/S0214-1582(12)70003-8)
- van Kan-Davelaar, H. E., van Hest, J. C. M., Cornelissen, J. J. L. M., & Koay, M. S. T. (2014). Using viruses as nanomedicines. *British Journal of Pharmacology*, 171(17), 4001–4009. <https://doi.org/10.1111/bph.12662>
- Venditto, V. J., & Simanek, E. E. (2010). Cancer Therapies Utilizing the Camptothecins: A Review of in Vivo Literature. *Molecular pharmaceutics*, 7(2), 307–349. <https://doi.org/10.1021/mp900243b>
- Wen, Y., Wang, Y., Liu, X., Zhang, W., Xiong, X., Han, Z., & Liang, X. (2017). Camptothecin-based nanodrug delivery systems. *Cancer Biology & Medicine*, 14(4), 363–370. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0099>
- Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., & Han, J. (2018). Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Research*, 28(1), 9–21. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.133>
- Ziomkowska, B., Cyrankiewicz, M., Wybranowski, T., & Kruszewski, S. (2014). *Determination of the Protein-Binding Properties of Camptothecins by Means of Optical Spectroscopy Methods*. <https://doi.org/10.12693/APhysPolA.125.A-61>

Anexos

Tabla 3. Concentración de los tratamientos añadidos a las diferentes líneas celulares. La concentración de tratamiento añadido se realizó tomando en cuenta un volumen final 100 µl de medio de cultivo por pozo. Se utilizaron dos placas de 96 pozos, una para los tratamientos de tamoxifeno y BMV-tamoxifeno y otra para camptotecina y BMV-camptotecina. Estos tratamientos se utilizaron para realizar los diferentes ensayos MTT.

Placa	Línea celular	Tratamiento	Pozos	Concentración (µg/ml)
1	MCF-7	Control -	A1-A3	-
1	MCF-7	Control + (100% DMSO)	A4-A6	-
1	MCF-7	Control + (1% DMSO)	A7-A9	-
1	MCF-7	Tamoxifeno	B1-B3	0.52
1	MCF-7	Tamoxifeno	B4-B6	1.43
1	MCF-7	Tamoxifeno	B7-B9	3.59
1	MCF-7	Tamoxifeno	B10-B12	7.59
1	MCF-7	Tamoxifeno	C1-C3	22.39
1	MCF-7	Tamoxifeno	C4-C6	61.46
1	MCF-7	BMV-tamoxifeno	C7-C9	0.52
1	MCF-7	BMV-tamoxifeno	C10-C12	1.43
1	MCF-7	BMV-tamoxifeno	D1-D3	3.59
1	MCF-7	BMV-tamoxifeno	D4-D6	7.59
1	MCF-7	BMV-tamoxifeno	D7-D9	22.39
1	MCF-7	BMV-tamoxifeno	D10-D12	61.46
1	MDA-MB-231	Control -	E1-E3	-
1	MDA-MB-231	Control + (100% DMSO)	E4-E6	-
1	MDA-MB-231	Control + (1% DMSO)	E7-E9	-
1	MDA-MB-231	Camptotecina	F1-F3	0.52
1	MDA-MB-231	Camptotecina	F4-F6	1.43
1	MDA-MB-231	Camptotecina	F7-F9	3.59
1	MDA-MB-231	Camptotecina	F10-F12	7.59
1	MDA-MB-231	Camptotecina	G1-G3	22.39
1	MDA-MB-231	Camptotecina	G4-G6	61.46
1	MDA-MB-231	BMV-camptotecina	G7-G9	0.52
1	MDA-MB-231	BMV-camptotecina	G10-G12	1.43
1	MDA-MB-231	BMV-camptotecina	H1-H3	3.59
1	MDA-MB-231	BMV-camptotecina	H4-H6	7.59
1	MDA-MB-231	BMV-camptotecina	H7-H9	22.39
1	MDA-MB-231	BMV-camptotecina	H10-H12	61.46
2	MCF-7	Control -	A1-A3	-
2	MCF-7	Control + (100% DMSO)	A4-A6	-
2	MCF-7	Control + (1% DMSO)	A7-A9	-
2	MCF-7	Camptotecina	B1-B3	2.81
2	MCF-7	Camptotecina	B4-B6	8.79

2	MCF-7	Camptotecina	B7-B9	16.84
2	MCF-7	Camptotecina	B10-B12	39.86
2	MCF-7	Camptotecina	C1-C3	84.09
2	MCF-7	Camptotecina	C4-C6	160.89
2	MCF-7	BMV-camptotecina	C7-C9	2.81
2	MCF-7	BMV-camptotecina	C10-C12	8.79
2	MCF-7	BMV-camptotecina	D1-D3	16.84
2	MCF-7	BMV-camptotecina	D4-D6	39.86
2	MCF-7	BMV-camptotecina	D7-D9	84.09
2	MCF-7	BMV-camptotecina	D10-D12	160.89
2	MDA-MB-231	Control -	E1-E3	-
2	MDA-MB-231	Control + (100% DMSO)	E4-E6	-
2	MDA-MB-231	Control + (1% DMSO)	E7-E9	-
2	MDA-MB-231	Camptotecina	F1-F3	2.81
2	MDA-MB-231	Camptotecina	F4-F6	8.79
2	MDA-MB-231	Camptotecina	F7-F9	16.84
2	MDA-MB-231	Camptotecina	F10-F12	39.86
2	MDA-MB-231	Camptotecina	G1-G3	84.09
2	MDA-MB-231	Camptotecina	G4-G6	160.89
2	MDA-MB-231	BMV-camptotecina	G7-G9	2.81
2	MDA-MB-231	BMV-camptotecina	G10-G12	8.79
2	MDA-MB-231	BMV-camptotecina	H1-H3	16.84
2	MDA-MB-231	BMV-camptotecina	H4-H6	39.86
2	MDA-MB-231	BMV-camptotecina	H7-H9	84.09
2	MDA-MB-231	BMV-camptotecina	H10-H12	160.89

Tabla 4. Concentración de los tratamientos añadidos en la línea celular MDA-MB-231. La concentración de tratamiento añadido se realizó tomando en cuenta un volumen final 2000 µl de medio de cultivo por pozo. Se utilizó una placa de 12 pozo para los tratamientos BMV-tamoxifeno y tamoxifeno. Estos tratamientos se utilizaron para realizar la citometría de flujo.

Línea celular	Tratamiento	Pozos	Concentración (µg/ml)
MDA-MB-231	Control -	A1-A3	-
MDA-MB-231	Control + (100% DMSO)	A4-B2	-
MDA-MB-231	Tamoxifeno	B3	7.59
MDA-MB-231	Tamoxifeno	B4	22.39
MDA-MB-231	Tamoxifeno	C1	61.46
MDA-MB-231	BMV-tamoxifeno	C2	7.59
MDA-MB-231	BMV-tamoxifeno	C3	22.39
MDA-MB-231	BMV-tamoxifeno	C4	61.46

Tabla 5. Cantidad de fluoróforo añadido en la línea celular MDA-MB-231. Para el control positivo y negativo se realizaron 3 tinciones diferentes y uno sin tinción. Para los diferentes tratamientos con tamoxifeno y BMV-tamoxifeno solo se realizó la doble tinción. La tinción con yoduro de propidio (IP) se realizó agregando 490 μ l células y 10 μ l de IP. La tinción con calceína (Ca-AM) se realizó agregando 250 μ l de células y 250 μ l de Ca-AM. La doble tinción IP/Ca se realizó agregando 240 μ l de células, 10 μ l de IP y 250 μ l de Ca-AM.

Tratamiento	IP (100 μ g/ml)	Ca-AM (2 μ M)	IP/Ca-AM	Sin teñir
Control -	10 μ l	250 μ l	10 μ l + 250 μ l	500 μ l (células)
Control +	10 μ l	250 μ l	10 μ l + 250 μ l	500 μ l (células)
Tratamientos	-	-	10 μ l + 250 μ l	-

Tabla 6. Cantidad y tipo de estructuras secundarias presentes en la cápside viral del CCMV. Los resultados reportados en esta tabla se dedujeron a partir de la Figura 31.

Número de estructura secundaria	Tipo de estructura secundaria	Cantidad de aminoácidos	Aminoácidos hidrofóbicos	Aminoácidos hidrofílicos	Tipo de motivo
1	α -hélice	10	4	6	No hidrofóbico
2	β -plegada	3	3	0	Hidrofóbico
3	β -plegada	4	3	1	Hidrofóbico
4	β -plegada	7	2	5	No hidrofóbico
5	α -hélice	3	3	0	Hidrofóbico
6	β -plegada	9	4	5	No hidrofóbico
7	α -hélice	3	0	3	No hidrofóbico
8	β -plegada	2	1	1	No hidrofóbico
9	α -hélice	8	6	2	Hidrofóbico
10	β -plegada	7	2	5	No hidrofóbico
11	α -hélice	12	9	3	Hidrofóbico
12	α -hélice	7	5	2	Hidrofóbico
13	α -hélice	5	2	3	No hidrofóbico
14	β -plegada	6	2	4	No hidrofóbico
15	β -plegada	9	5	4	Hidrofóbico

Tabla 7. Cantidad y tipo de estructuras secundarias presentes en la cápside viral del BMV. Los resultados reportados en esta tabla se dedujeron a partir de la Figura 32.

Número de estructura secundaria	Tipo de estructura secundaria	Cantidad de aminoácidos	Aminoácidos hidrofóbicos	Aminoácidos hidrofílicos	Tipo de motivo
1	α -hélice	9	5	4	Hidrofóbico
2	β -plegada	4	4	0	Hidrofóbico
3	α -hélice	2	1	1	No hidrofóbico
4	β -plegada	7	2	5	No hidrofóbico
5	β -plegada	8	5	3	Hidrofóbico
6	β -plegada	2	2	0	Hidrofóbico
7	α -hélice	8	6	2	Hidrofóbico
8	β -plegada	6	4	2	Hidrofóbico
9	α -hélice	12	10	2	Hidrofóbico
10	α -hélice	11	5	6	No hidrofóbico
11	β -plegada	7	4	3	Hidrofóbico
12	β -plegada	9	5	4	Hidrofóbico

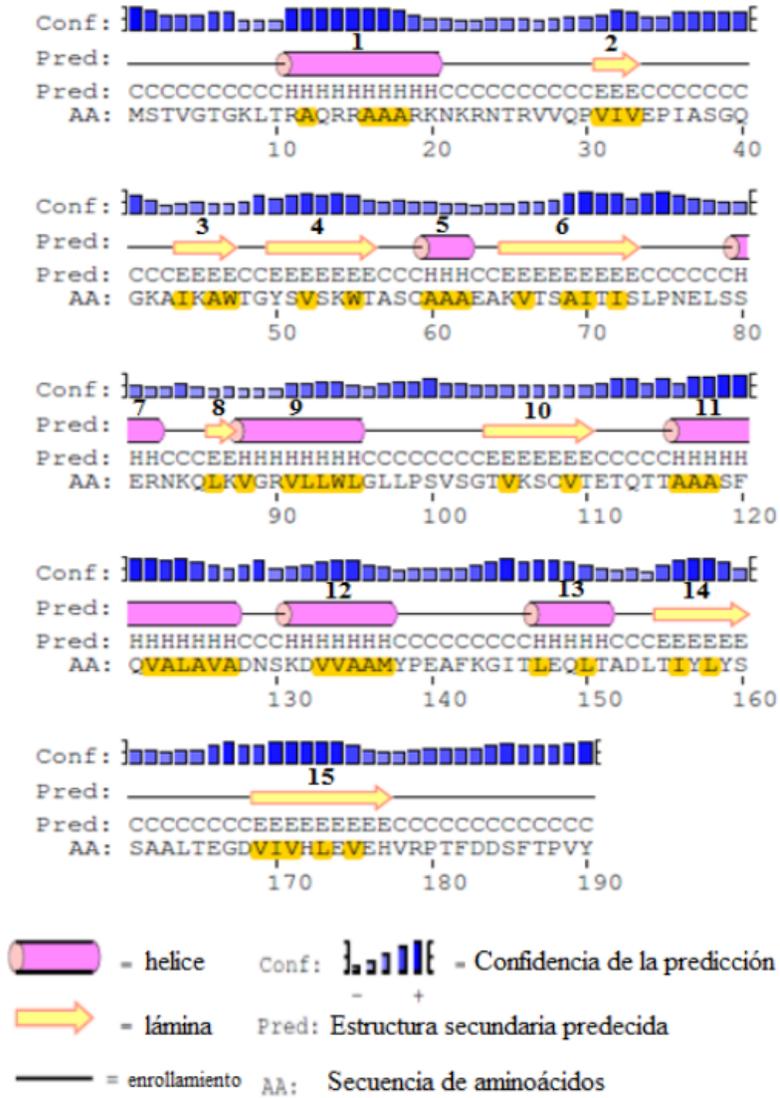


Figura 31. Predicción de las estructuras secundarias presentes en la proteína de la cápside del CCMV. Las estructuras secundarias se observan en la parte superior de cada secuencia. Las flechas amarillas representan laminas plegadas mientras que los cilindros rosas alfa hélices. Los aminoácidos hidrofóbicos se muestran subrayados en amarillo. La letra H en la secuencia de predicción (Pred) se utiliza para denominar a la estructura alfa hélice, la letra E a la beta plegada y la C a la cadena polipeptídica. Programa PSIPRED.

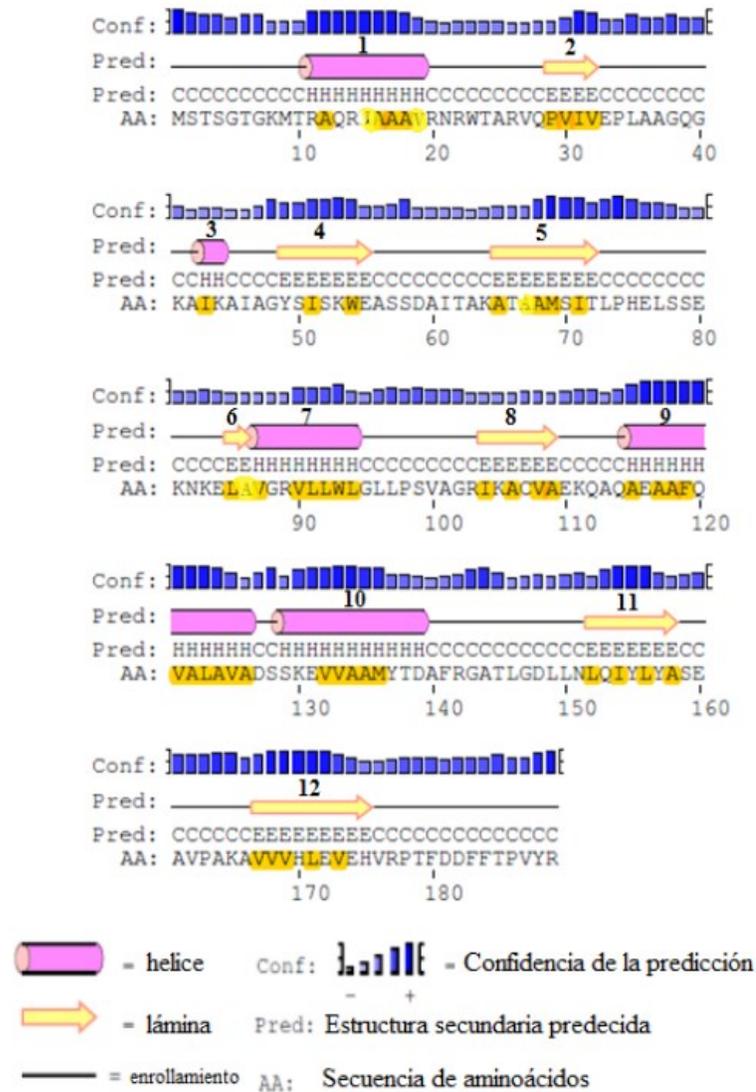


Figura 32. Predicci3n de las estructuras secundarias presentes en la prote3na de la c3pside del CCMV. Las estructuras secundarias se observan en la parte superior de cada secuencia. Las flechas amarillas representan laminas plegadas mientras que los cilindros rosas alfa h3lices. Los amino3cidos hidrof3bicos se muestran subrayados en amarillo. La letra H en la secuencia de predicci3n (Pred) se utiliza para denominar a la estructura alfa h3lice, la letra E a la beta plegada y la C a la cadena polipept3dica. Programa PSIPRED.

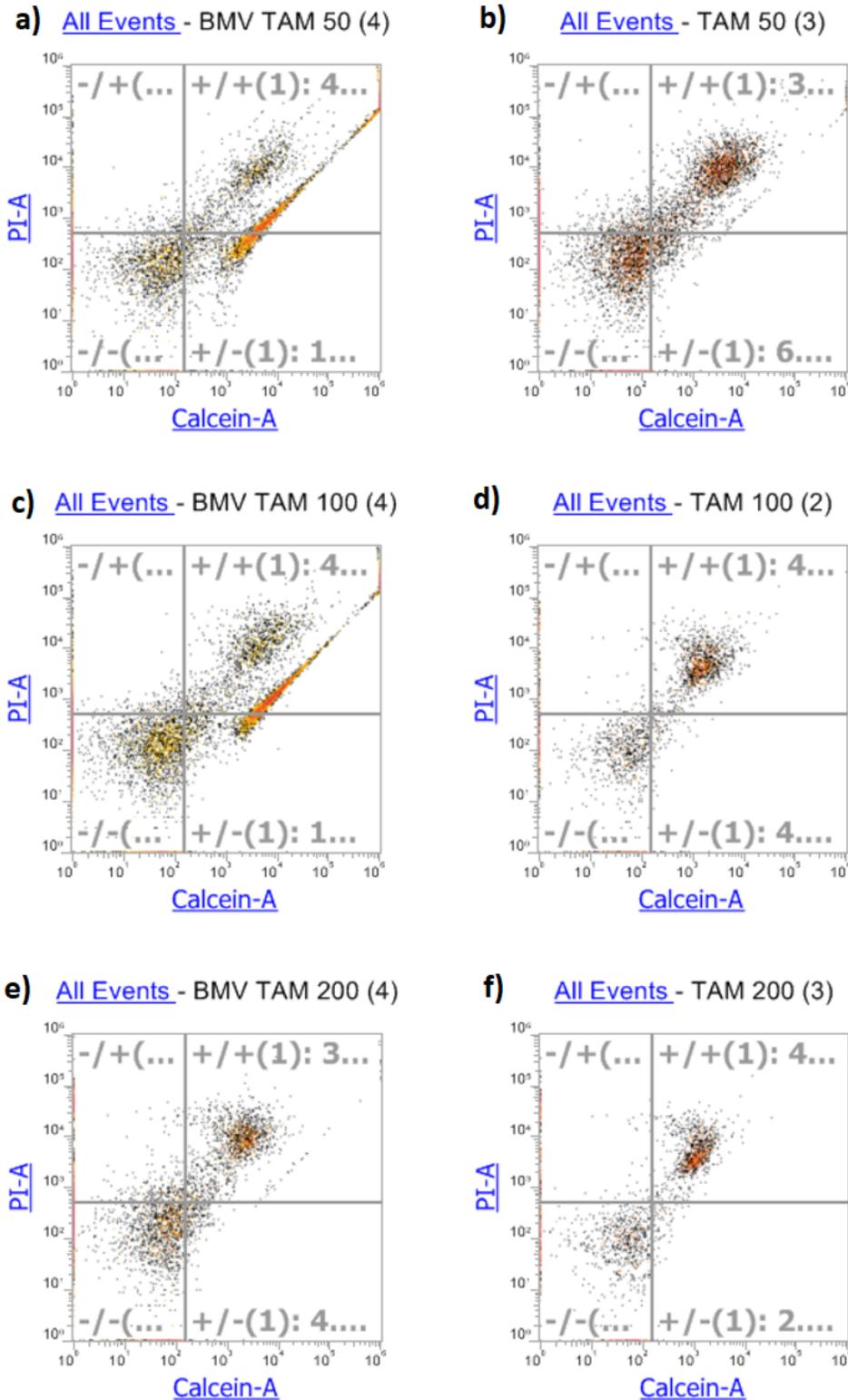


Figura 33. Diagrama de puntos. Doble tinción con calceína y yoduro de propidio de células MDA-MB-231 tratadas con diferentes dosis de tamoxifeno y BMV tamoxifeno. Las células tratadas con los diferentes tratamientos se tiñeron y analizaron en un citómetro de flujo para determinar la proporción de células viables (v), apoptóticas tempranas (a), apoptóticas tardías (A) y necróticas (n). a) BMV-tamoxifeno 7.59 $\mu\text{g/ml}$. b) Tamoxifeno 7.59 $\mu\text{g/ml}$. c) BMV-tamoxifeno 22.39 $\mu\text{g/ml}$. d) Tamoxifeno 22.39 $\mu\text{g/ml}$. e) BMV-tamoxifeno 61.46 $\mu\text{g/ml}$. f) Tamoxifeno 61.46 $\mu\text{g/ml}$. Se realizaron cuatro mediciones diferentes, obteniéndose resultados similares.

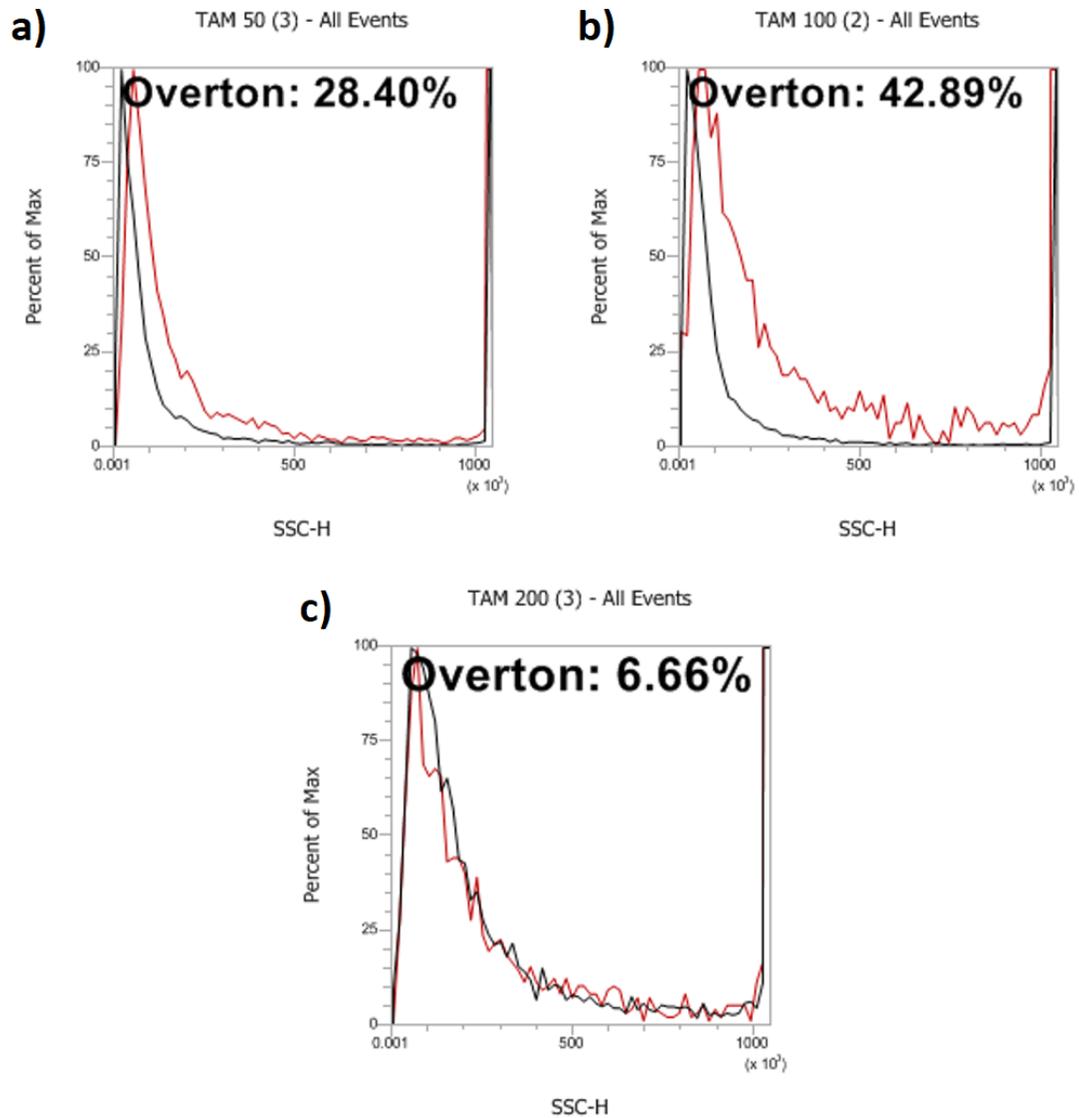


Figura 34. Overton. Las gráficas overton permiten comparar la complejidad de las células. a) Tamoxifeno y BMV-tamoxifeno 7.59 $\mu\text{g/ml}$. b) Tamoxifeno y BMV-tamoxifeno 22.39 $\mu\text{g/ml}$. c) Tamoxifeno y BMV-tamoxifeno 61.46 $\mu\text{g/ml}$. La línea roja representa la complejidad de las células MDA-MB-231 tratadas con tamoxifeno, mientras que la negra representa la complejidad de las células tratadas con BMV-tamoxifeno.