

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

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



---

**Maestría en Ciencias  
en Nanociencias**

---

**Desarrollo de nanocompositos de cápside viral P22 para la  
terapia con profármacos enzimáticos en cáncer de mama**

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

Presenta:

**Astrid Rebeca Luna Rios**

Ensenada, Baja California, México  
2024

Tesis defendida por  
**Astrid Rebeca Luna Rios**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Kanchan Chauhan**  
Directora de tesis

**Dra. Carolina Álvarez Delgado**

**Dr. Rafael Vázquez Duhalt**

**Dr. Pankaj Sharma**



---

**Dra. Catalina López Bastidas**  
Coordinadora del Posgrado en Ciencias en Nanociencias

---

**Dra. Ana Denise Re Araujo**  
Directora de Estudios de Posgrado

Copyright © 2024, Todos los Derechos Reservados, CICESE  
*Prohibida su reproducción parcial o total sin la autorización por escrito del CICESE*

Resumen de la tesis que presenta **Astrid Rebeca Luna Rios** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

**Desarrollo de nanocompositos de cápside viral P22 para la terapia con profármacos enzimáticos en cáncer de mama**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Kanchan Chauhan  
**Directora de tesis**

Las estrategias actuales contra el cáncer de mama presentan limitaciones debido a la falta de selectividad, disminuyendo su efectividad. La mayoría de los fármacos, como el tamoxifeno, requieren la activación metabólica por parte de las enzimas de la familia citocromo P450 (CYP) para ejercer mayores efectos anticancerígenos. Sin embargo, la concentración del CYP es variable y baja en las células tumorales, especialmente en el cáncer de mama, lo que provoca efectos secundarios. En la terapia de activación enzimática de profármacos (EPT), las enzimas se dirigen al tumor para transformar el profármaco, lo que normalmente implica la administración de la enzima seguida del profármaco. Sin embargo, las diferencias entre la farmacocinética y farmacodinamia son un obstáculo para mejorar el tratamiento. Por lo tanto, la administración conjunta de profármaco y enzima es esencial para garantizar su interacción favorable en el tumor. Este trabajo reporta una nueva clase de nanocompositos terapéuticos basados en partículas tipo virus P22 confinando CYP, funcionalizadas superficialmente con glucosa oxidasa (GOx) que transforma la glucosa en D-glucono- $\delta$ -lactona produciendo  $H_2O_2$ , el aceptor final de electrones en la transformación de tamoxifeno mediado por CYP, y conjugadas con un derivado de tamoxifeno como profármaco y ligando dirigido utilizando polietilenglicol como conector. En un microambiente tumoral rico en glucosa, estos nanocompuestos pueden producir fármaco activo *in situ*. Se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas y la catálisis secuencial mediada por glucosa de los nanocompositos. Los estudios *in vitro* demostraron una disminución en la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de mama ER+ y ER-. Sin embargo, la internalización celular en ausencia de glucosa mostró ser preferencial con las VLPs dirigidas en ambas líneas celulares. La administración conjunta de enzimas y profármacos con una localización mejorada de las VLPs desarrolladas después de la funcionalización del tamoxifeno, lo que sugiere el potencial de los nanocompositos desarrollados para superar los desafíos existentes de la EPT y mejorar los resultados terapéuticos con efectos secundarios reducidos.

**Palabras clave:** VLP-P22, Citocromo P450, Glucosa oxidasa, Tamoxifeno, Terapia de activación enzimática de profármacos

Abstract of the thesis presented by **Astrid Rebeca Luna Rios** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience

**Development of P22 viral capsid nanocomposites for enzymatic prodrug therapy in breast cancer**

Abstract approved by:

---

Dra. Kanchan Chauhan  
**Thesis Director**

Current treatment strategies against breast cancer have limitations due to lack in selectivity. Most drugs, such as tamoxifen, require metabolic activation by cytochrome P450 (CYP) enzymes to perform greater anticancer effects. However, the concentration of CYP varies and is low in tumor cells, especially in breast cancer, resulting in side-effects. In enzyme prodrug therapy (EPT), enzymes are targeted to the tumor cells for prodrug transformation, typically involving the sequential delivery of the enzyme followed by the prodrug. However, differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics are a major hindrance for improving treatment. Therefore, co-delivery of prodrug and enzyme is essential to ensure their favorable interaction in tumor. This work reports a new class of therapeutic nanocomposites based on P22 virus like particles (VLPs) confining the CYP activity, surface functionalized with glucose oxidase (GOx) that transforms glucose into D-glucono- $\delta$ -lactone producing hydrogen peroxide, the final electron acceptor in the CYP-mediated transformation of tamoxifen, and together conjugated with a tamoxifen derivative as prodrug and targeting ligand using polyethylene glycol as a linker. In glucose-rich tumor microenvironment, these nanocomposites can produce active drug in situ. The physicochemical properties and sequential glucose-mediated catalysis of the nanocomposites were characterized. *In vitro* studies demonstrated a decrease in cell viability in both ER+ and ER- breast cancer cell lines. However, cellular internalization in the absence of glucose showed improved uptake of targeted VLPs in both cell lines. The co-delivery of enzymes and prodrug with improved localization of developed VLPs after tamoxifen functionalization, suggests the potential of developed nanocomposites to overcome the existing challenges of EPT and improve the therapeutic outcomes with reduced side effects.

**Keywords: VLP-P22, Cytochrome P450, Glucose oxidase, Tamoxifen, Enzyme prodrug therapy**

## Dedicatoria

*Dedicado a mis papás, mis pilares, y mis hermanos, mi fuente de inspiración,*

*por su amor y apoyo incondicional, y todo lo que he aprendido de ellos.*

*Y a mí, por mi perseverancia y determinación.*

## Agradecimientos

- Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (Conahcyt) 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 (CICESE) por sus programas educativos de calidad y por haberme aceptado como estudiante de maestría en su institución.
- Al Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM (CNyN-UNAM), por facilitarme sus instalaciones, brindarme acceso a recursos y al financiamiento de CONACYT (CF-MI-2019-6357) y PAPIIT IA201620 para la realización del proyecto.
- A mi apreciada asesora y amiga, la Dra. Kanchan Chauhan, le agradezco su apoyo total, su dedicación y paciencia infinita, por su guía y fe en mi potencial.
- A la querida Dra. Ana Rodríguez, gracias por su enorme apoyo que con gran disposición y amabilidad estuvo apoyándome en el trabajo de laboratorio.
- A mis sinodales, la Dra. Carolina Álvarez Delgado, el Dr. Rafael Vázquez Duhalt y el Dr. Pankaj Sharma, agradezco sinceramente su tiempo, dedicación y sus valiosas aportaciones que han enriquecido este trabajo. Sus sabias orientaciones y observaciones han sido fundamentales para mejorar esta tesis.
- A mis amigos, Andrea Dorado, Yilmair Santillán, Mitzi Saldívar, Dulce Barrera, Carmen Maciel, Andrés Medina y Víctor Medina por su amistad y compañía en esta etapa.
- A mi familia elegida, mi querida Eloísa García, a la familia Lozano Galeno, quienes han llenado mi vida de mucho cariño y amor, risas y apoyo.
- A mis abuelitos, por su aliento, comprensión y alegría, gracias por estar siempre a mi lado.
- A mis queridos hermanos, mis compañeros de vida por ser mi constante inspiración, por estar siempre ahí, apoyándome en cada paso de este camino.
- A mi Carlos Sierra, gracias por estar siempre a mi lado sobre todas las cosas, gracias por tu apoyo incondicional constante y sostenerme en cada paso, por creer en todo lo que soy.
- A mis adorados papás, por su amor incondicional y por siempre creer en mí en todo momento. Gracias por ser la inspiración detrás de cada logro, nada de esto hubiera sido posible sin ustedes, tienen mi eterno agradecimiento, los amo.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas .....	xiii
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	6
1.1.1 Nanocompositos terapéuticos para la terapia contra el cáncer de mama .....	6
1.1.2 Nanotransportadores basados en partículas tipo virus .....	7
1.1.3 Encapsulación de enzimas dentro de cápsidas virales.....	9
1.1.4 Terapia de profármacos enzimáticos (EPT).....	11
1.1.5 Terapia de inanición y oxidación mediada por glucosa oxidasa .....	14
1.1.6 Nanocompositos basados en P22 como plataformas multimodales en terapia combinada .....	16
1.2 Hipótesis.....	21
1.3 Objetivos .....	21
1.3.1 Objetivo general .....	21
1.3.2 Objetivos específicos.....	21
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>22</b>
2.1 Síntesis química del derivado del tamoxifeno .....	22
2.2 Caracterización del derivado de tamoxifeno .....	23



2.2.1	Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) .....	23
2.2.2	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).....	24
2.2.3	Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) .....	24
2.3	Síntesis y purificación de las cápsides virales P22CYP .....	24
2.4	Caracterización de las cápsides virales P22CYP .....	25
2.4.1	Cuantificación de las cápsides virales P22CYP .....	25
2.4.2	Análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) .....	26
2.4.3	Molaridad de confinamiento y porcentaje de ocupación.....	26
2.5	Multifuncionalización de los nanorreactores.....	27
2.5.1	Multifuncionalización vía EDC y NHS .....	27
2.5.2	Bioconjugación de los nanorreactores P22 mediante PEGilación .....	28
2.6	Caracterización de los nanorreactores P22 multifuncionalizados .....	29
2.6.1	Distribución de tamaños y potencial zeta.....	29
2.6.2	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	29
2.6.3	Electroforesis en gel de agarosa.....	30
2.6.4	Espectroscopia UV-VIS .....	30
2.6.5	Espectroscopia de fluorescencia .....	30
2.7	Ensayos de la actividad enzimática de los nanorreactores .....	31
2.7.1	Actividad enzimática del citocromo P450 .....	31
2.7.2	Actividad enzimática de la glucosa oxidasa (GOx) .....	31
2.7.3	Actividad enzimática combinada de CYP-GOx .....	32
2.8	Ensayo <i>in vitro</i> para la internalización selectiva en líneas celulares.....	32
2.8.1	Líneas celulares .....	32
2.8.2	Cultivo celular.....	33
2.9	Establecimiento de protocolo de internalización celular.....	34
2.10	Ensayos de viabilidad celular en presencia de los nanorreactores P22.....	34

2.10.1	Ensayo MTT .....	34
2.11	Internalización de los nanorreactores P22 en MCF-7 y MDA-MB-231 .....	36
<b>Capítulo 3. Resultados .....</b>		<b>38</b>
3.1	Caracterización del derivado de tamoxifeno .....	38
3.1.1	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) .....	38
3.1.2	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).....	39
3.1.3	Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) .....	41
3.2	Caracterización de las cápsides virales P22CYP .....	42
3.2.1	Cromatografía líquida rápida de proteínas a alta velocidad (FPLC) .....	42
3.2.2	Cuantificación de las cápsides virales P22CYP .....	43
3.2.3	Análisis densitométrico de proteínas en gel SDS-PAGE .....	44
3.2.4	Molaridad de confinamiento y porcentaje de ocupación .....	45
3.3	Multifuncionalización y caracterización de los nanorreactores P22. ....	45
3.3.1	Dispersión de luz dinámica (DLS) .....	46
3.3.2	Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) .....	48
3.3.3	Gel de agarosa.....	49
3.3.4	Espectroscopia UV-VIS .....	50
3.3.5	Espectroscopia de fluorescencia .....	52
3.4	Ensayos de la actividad enzimática de los nanorreactores .....	53
3.4.1	Actividad enzimática del citocromo P450 .....	53
3.4.2	Actividad enzimática de la glucosa oxidasa (GOx) .....	54
3.4.3	Actividad enzimática combinada de CYP-GOx .....	55
3.5	Ensayo <i>in vitro</i> para la internalización selectiva en líneas celulares .....	56
3.5.1	Establecimiento de protocolo .....	56
3.6	Ensayos de viabilidad celular en presencia de los nanorreactores P22.....	59

3.6.1	Ensayo MTT .....	59
3.7	Internalización de los nanorreactores P22 en MCF-7 y MDA-MB-231 .....	63
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>68</b>
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>78</b>
	<b>Literatura citada .....</b>	<b>80</b>
	<b>Anexos .....</b>	<b>89</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Estructuras de VLPs.....	8
2. Partículas tipo virus como nanotransportadores para la administración de enzimas. Las moléculas de enzima están encapsuladas dentro de la cápside del virus. ....	9
3. Representación esquemática de las VLPs como nanotransportadores para la terapia con profármacos enzimáticos.....	12
4. Reacción catalizada por glucosa oxidasa.. ....	15
5. Representación de las tres morfologías diferentes que puede adoptar P22 dependiendo de las condiciones de calentamiento.. ....	17
6. Representación esquemática de las VLPs P22CYP funcionalizadas.. ....	18
7. Representación esquemática del mecanismo plausible para el efecto sinérgico de la terapia fotodinámica y enzima-profármaco, la biotransformación de tamoxifeno a través de peroxigenasas impulsada por la producción de ROS en presencia de superóxido dismutase. Micrografía TEM de P22CYP-PpIX-PEG(EST). ....	19
8. Representación esquemática del nanorreactor multienzimáticos. ....	19
9. Representación esquemática de la reacción en cascada enzimática en los nanorreactores P22CYP-GOx-IcG para lograr una terapia combinada. Micrografía TEM de nanorreactores P22CYP-GOx.. ....	20
10. Proceso de obtención del tamoxifeno desmetilado. 1) producto con impurezas, 2) producto después de purificar mediante cromatografía líquida y 3) producto puro (tamoxifeno desmetilado). ....	22
11. El MTT es absorbido por las células y entra en las mitocondrias. Dentro de las mitocondrias, el MTT es reducido por enzimas mitocondriales en células metabólicamente activadas. Esta reducción convierte el MTT en su forma reducida, el formazán, que es insoluble en agua y se acumula en las células vivas.....	35
12. Esquema de la síntesis de tamoxifeno desmetilado (Tam-NH).. ....	38
13. Espectro FTIR de Tam-NH (rojo) y su precursor (azul). La ausencia del estiramiento de N-H (3300-3500 cm <sup>-1</sup> ) en el precursor confirma la formación del producto N-desmetil tamoxifeno. ....	39
14. Espectro RMN de protones del tamoxifeno. Se ha resaltado H en rojo, ya que se muestra las posiciones máximas de los protones. ....	40
15. Espectro RMN de protones de TAMNH. Comparación del espectro del tamoxifeno y el producto desmetilado, TamNH, la reducción a 3 protones del grupo metilo (CH <sub>3</sub> ) confirma la	

formación del producto. Se ha resaltado C en rojo, ya que se muestra las posiciones máximas del carbono. ....	41
16. Espectro de masas de alta resolución del Tam-NH. El pico en 358.2195 corresponde a TAM-NH, con un peso molecular teórico de 357.50 g/mol. ....	41
17. Perfil de elución de las cápsides virales P22CYP obtenidas mediante FPLC. Se observan dos picos principales a los 42.7 y 60.9 minutos. ....	42
18. Curva de calibración estándar del BSA. ....	43
19. Gel SDS-PAGE al 12% con las muestras de cápsides virales P22 a diferentes diluciones. ....	44
20. Diagrama esquemático de la multifuncionalización de los nanocompositos. ....	46
21. Distribución de tamaño de los NRs funcionalizados mediante el análisis de DLS. El diámetro hidrodinámico medio tiende a aumentar después de cada funcionalización. ....	47
22. Variación de la carga superficial de los nanorreactores funcionalizados mediante potencial zeta. ....	47
23. Estabilidad de la distribución de tamaño de los NRs funcionalizados mediante el análisis de DLS un mes después de la multifuncionalización. ....	48
24. Micrografías TEM. a) Nanorreactores P22CYP-GOx y b) nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH. ....	49
25. Análisis de movilidad electroforética de los nanorreactores P22CYP (1), P22CYP-GOx (2) y los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH (3). ....	50
26. Espectro UV-VIS del PEG-TamNH (reacción) y el sobrenadante. ....	51
27. Curva de calibración del PEG-TamNH mediante UV-VIS. ....	51
28. Espectros de emisión de fluorescencia de PEG-TamNH (Reacción) y P22CYP-GOx-PEG-TamNH (nanocompositos) en la solución PBS+DMSO (90%:10%) y como referencia el P22CYP. ....	53
29. Comparación del tiempo de exposición de los tratamientos en células MCF-7 a 0, 4 y 8 horas de incubación en ausencia de glucosa. La barra de escala representa 10 $\mu$ m. ....	57
30. Comparación del tiempo de exposición de los tratamientos en células MDA-MB-231 a 0, 4 y 8 horas de incubación en ausencia de glucosa. La barra de escala representa 10 $\mu$ m. ....	58
31. Viabilidad celular de la línea celular MCF-7 en medio sin glucosa expuestas con diferentes concentraciones de NRs. A) Incubación por 4 horas. B) Incubación por 8 horas. Los resultados se expresan como el promedio $\pm$ SD (n = 3). ****p < 0,0001 utilizando un ANOVA de dos factores con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. ....	59
32. Viabilidad celular de la línea celular MDA-MB-231 en medio sin glucosa expuestas con diferentes concentraciones de NRs. A) Incubación por 4 horas. B) Incubación por 8 horas. Los resultados se expresan como el promedio $\pm$ SD (n = 3). ****p < 0,0001 utilizando un ANOVA de dos factores con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. ....	61

33. Viabilidad celular de ambas líneas celulares en medio con glucosa expuestas con diferentes concentraciones de nanorreactores. A) MCF-7. B) MDA-MB-231. El tiempo de incubación a 8 horas es resaltado con el patrón de relleno de líneas en las barras. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD (n = 3). \*\*\*\*p < 0,0001 utilizando un ANOVA de dos factores con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. .... 62
34. Imágenes de microscopía confocal. Internalización celular de los nanorreactores P22CYP-GOx y los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH en células MCF-7. Canal azul, corresponde al DAPI (núcleos), canal verde, corresponde DCFDA (producción de ROS) y merge, corresponde a la combinación de DAPI y DCFDA. La barra de escala representa 20  $\mu$ m. .... 64
35. Comparación de la emisión verde del DCFDA correspondientes a P22CYP-GOx y P22CYP-GOx-PEG-TamNH en células MCF-7. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD (n = 3). \*\*\*\*p < 0,0001 utilizando un ANOVA de un factor con la prueba de Bartlett. .... 65
36. Imágenes de microscopía confocal. Internalización celular de los nanorreactores P22CYP-GOx y los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH en células MDA-MB-231. Canal azul, corresponde al DAPI (núcleos), canal verde, corresponde DCFDA (producción de ROS) y merge, corresponde a la combinación de DAPI y DCFDA. La barra de escala representa 20  $\mu$ m. .... 66
37. Comparación de la emisión verde del DCFDA correspondientes a P22+CYP-GOx y P22+CYP-GOx-PEG-TamNH en células MDA-MB-231. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD (n = 3). \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 utilizando un ANOVA de un factor con la prueba de Bartlett. .... 67
38. Espectro RMN de carbono. Comparación del espectro del tamoxifeno y el producto desmetilado (TamNH). Se ha resaltado C en rojo, ya que se muestra las posiciones máximas del carbono. .... 89
39. Comparación del tiempo de exposición de los tratamientos en células MCF-7 a 0, 12 y 24 horas de incubación en ausencia de glucosa. .... 90
40. Comparación del tiempo de exposición de los tratamientos en células MDA-MB-231 a 0, 12 y 24 horas de incubación en ausencia de glucosa. .... 91

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. Concentración de P22CYP obtenida mediante el ensayo Bradford.....	43
2. Análisis densitométrico para calcular la relación CP y CYP-SP.....	44
3. Constantes cinéticas del CYP en nanorreactores P22CYP.....	54
4. Actividad específica del CYP después de cada funcionalización.....	54
5. Actividad específica de GOx después de cada funcionalización.....	54
6. Constantes cinéticas para la transformación de DMP.....	55
7. Actividad combinada específica por la transformación del DMP en la reacción de cascada mediada por glucosa.....	55
8. Estabilidad de los NRs mediante DLS después de un mes de la funcionalización.....	48
9. Cantidad ( $\mu\text{g}$ ) de PEG-TamNH.....	52
10. Características morfológicas de diferentes tipos de muerte celular regulada.....	75

## Capítulo 1. Introducción

---

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y se define como una enfermedad que comienza con la rápida proliferación de células anormales que crecen sin control y desplazan a las células normales, luego pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y extenderse a otros órganos; este último proceso se conoce como metástasis siendo un factor que incrementa la tasa de mortalidad. El cáncer puede desarrollarse en cualquier parte del cuerpo, como en los pulmones, los senos o el hígado (World Health Organization, 2022). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha resaltado el rápido aumento de los casos de cáncer de mama a nivel mundial, ya que hay más de 2.3 millones de nuevos casos que ocurren cada año, lo que lo convierte en la segunda causa principal de muerte por cáncer en las mujeres (después del cáncer de pulmón, tanto en hombres como en mujeres, según la OMS). En el 2040 se estima que el impacto que tendrá esta enfermedad es que aumentará la carga de cáncer de mama a más de 3 millones de casos nuevos por año (un aumento del 40 %) y más de 1 millón de muertes por año (un aumento del 50 %) (World Health Organization, 2023).

La probabilidad de que una mujer muera de cáncer de mama es de aproximadamente 1 en 39 (alrededor del 2.5%). Las tasas de mortalidad por cáncer de mama han disminuido constantemente desde 1989, con una disminución general del 43 % hasta 2020. Se cree que la disminución de las tasas de mortalidad es el resultado de detectar el cáncer de mama antes mediante pruebas de detección y una mayor conciencia, así como mejores tratamientos. Sin embargo, esta disminución en la tasa de mortalidad se ha ralentizado ligeramente en los últimos años (American Cancer Society, 2023).

Las estrategias de tratamiento actuales son intervenciones quirúrgicas (en la que se extirpa toda la mama, denominada mastectomía, o en la que solo se extirpan el tumor y los tejidos circundantes, denominada lumpectomía con conservación de la mama), la radioterapia (en la que se utiliza radiación de alta energía para eliminar las células cancerosas) y la quimioterapia (en la que se utilizan fármacos para eliminar las células cancerosas) (Tran et al., 2020). Esto incluye los fármacos utilizados sobre todo en la quimioterapia, como tamoxifeno, paclitaxel, docetaxel, doxorubicina y metotrexato; normalmente se dirigen a las células que están proliferando. Por lo tanto, persisten las limitaciones en cuanto a la eficacia selectiva y se dirigen no solo a las células tumorales sino también a las células sanas, provocando los ya conocidos eventos adversos relacionados con la quimioterapia como son; alopecia, reacción en el lugar de la inyección, erupción cutánea infecciones o fiebre, neutropenia o trombocitopenia, anemia, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia, estreñimiento, disminución del apetito, diarrea, náuseas, vómitos, estomatitis,



deshidratación o anomalía electrolítica, desnutrición, trombosis venosa profunda o embolia pulmonar, artralgias, mialgias, neuropatía periférica, aumento de las enzimas hepáticas y la bilirrubina (Hassett et al., 2006; Rashid et al., 2015). Además, la mayoría de los fármacos administrados permanecen circulando en el torrente sanguíneo, aumentando los posibles efectos secundarios sobre el tejido sano debido a su escasa solubilidad y permeabilidad acuosa que han dado como resultado una baja biodisponibilidad y una disminución de la eficacia del tratamiento (Martin et al., 2022; Tran et al., 2020).

La mayoría de los fármacos quimioterapéuticos son los inhibidores mitóticos (paclitaxel, docetaxel, vincristina y vinblastina), los agentes alquilantes (busulfán, temozolomida, ciclofosfamida y cisplatino), los antimetabolitos (mercaptipurina, capecitabina, metotrexato y fluorouracilo (5-FU)), los inhibidores de la topoisomerasa (doxorubicina, etopósido, mitoxantrona, topotecan e irinotecan) y las antraciclinas (doxorubicina, epirrubicina, idarrubicina y daunorubicina) que inhiben la síntesis de ADN y la mitosis, con el fin de evitar la rápida proliferación celular. Estos fármacos están disponibles como profármacos que requieren de la activación por enzimas de la familia de los citocromos P450 (CYP) para ejercer su actividad antitumoral. Debido a su actividad sobre determinados profármacos (principalmente fármacos antivirales y fármacos quimioterapéuticos), los citocromos P450 son importantes por ser el mayor complejo enzimático implicado en el metabolismo de fármacos en nuestro organismo, desempeñando un papel fundamental en la fase oxidativa del metabolismo. Por lo tanto, la administración del fármaco de interés de manera específica y controlada es un paso clave hacia el aumento de los beneficios terapéuticos y la disminución de los efectos secundarios. Entonces, como un enfoque alternativo, la terapia enzimática se ha aplicado para el tratamiento del cáncer dirigido, también conocida como terapia de activación enzimática de profármacos (EPT, Enzyme Prodrug Therapy) (Fuhrmann et al., 2018; González-Davis et al., 2023a; Sánchez y Rafael Vázquez Duhalt, 2018).

La finalidad del diseño de los profármacos consiste en aumentar la eficacia terapéutica y reducir los efectos negativos citotóxicos a través de la activación de enzimas en sitios específicos. La EPT se destaca como una modalidad de tratamiento excepcional, en la que las enzimas activadoras de profármacos se transfieren inicialmente a los tejidos tumorales empleando diferentes estrategias de direccionamiento; este enfoque de direccionamiento de enzimas es seguido por una terapia con un profármaco seguro que se transforma selectivamente en un agente tóxico contra el cáncer, a través de la función enzimática en el sitio objetivo, es decir; esta terapia se basa en la activación específica del profármaco en el sitio del tumor, permitiendo así la eliminación eficiente de las células cancerosas, al tiempo que se preserva la integridad de los tejidos saludables. De esta manera, la dosis del fármaco modificado puede ser alta en las células cancerosas, lo que disminuye la citotoxicidad sistémica en los tejidos normales. Por lo tanto, esta estrategia terapéutica

puede emplearse para mejorar la administración dirigida del tumor mientras se minimiza la citotoxicidad sistémica (Afzal et al., 2021; Vivo-Llorca et al., 2022).

El alcance de la terapia enzimática se amplía mediante el uso de nanopartículas como transportadores de enzimas. El desarrollo de nanotransportadores para la administración de fármacos ha sido de gran interés para muchos investigadores en las últimas décadas, ya que superan las limitaciones de los métodos tradicionales de administración de fármacos. Las nanopartículas (NPs) tienen propiedades únicas en términos de propiedades físicas, ópticas, químicas y terapéuticas. Los transportadores tradicionales de administración de fármacos enfrentan una alta toxicidad y una baja eficiencia de administración, lo que hace que la gran diversidad de nanosistemas, como polímeros, proteínas, nanopartículas metálicas, orgánicas e inorgánicas sean alternativas viables. Estas nanoestructuras brindan estabilidad contra la degradación por proteasas y la inactivación por parte del sistema inmunitario, lo cual es necesario para una circulación sanguínea prolongada y una vida media para una acumulación efectiva en la región del tumor (Gama et al., 2023; González-Davis et al., 2023a; X. Yu et al., 2022).

Las jaulas de proteínas son estructuras naturales tridimensionales autoensambladas y monodispersas. Su forma es principalmente esférica, pero son comunes otras formas como varillas, anillos o geometrías más complejas. La familia de las jaulas de proteínas se compone, entre otras, de ferritinas, chaperoninas, proteínas de choque térmico y, especialmente, partículas tipo virus (VLPs, del inglés "virus-like particles"). Estas se forman mediante el autoensamblaje de subunidades de proteínas para formar estructuras similares a jaulas, y consisten en un número variable de subunidades para formar jaulas huecas de proteínas de diferentes tamaños, con diámetros que van desde unos pocos nanómetros hasta decenas de nanómetros, se pueden diseñar como bio-vehículos inteligentes para la entrega de carga dirigida para terapia e imágenes (Chauhan et al., 2021; X. Yu et al., 2022). Dentro de las jaulas de proteínas desarrolladas, las más destacadas son las partículas tipo virus o VLPs, son nanopartículas hechas de las proteínas de la cubierta del virus sin el genoma viral y, por lo tanto, no son infecciosas y no pueden replicarse, y tienen la capacidad de formar cápsides huecas; estas cápsides de virus vacías generalmente de bacteriófagos o virus de plantas. Las VLPs poseen tamaños nanométricos que oscilan entre 10 y 800 nm, con una estructura muy regular capaz de autoensamblarse a partir de múltiples copias de subunidades de proteínas y, en algunos casos, de otros componentes moleculares pequeños como el ARN. Estas partículas se pueden utilizar como andamios básicos para el diseño y la fabricación de materiales nanoestructurados. Dentro de este contexto, algunas de las características que hacen sobresalientes a las VLPs son: 1) estructuras altamente ordenadas a escala nanométrica y capaces de autoensamblarse; 2) se han descrito alrededor de 1031 virus que habitan la Tierra donde existe una amplia diversidad de tamaños

(17-1500 nm en cápsides icosaédricas) y formas, con cápsides icosaédricas, filamentosas y siendo predominantes las formas helicoidales; 3) estructuras monodispersas en tamaño y con composición homogénea con diferentes estabilidades de pH, temperatura y fuerza iónica; 4) tienen una alta superficie específica con una gran variedad de grupos funcionales expuestos en un alto número de copias, lo que permiten el acoplamiento de múltiples ligandos, ya sea de la misma o de diferentes moléculas; 5) son estructuras huecas que podrían usarse para encapsular moléculas para diversas aplicaciones; 6) algunas de ellas muestran capacidad de internalización celular y por su naturaleza proteica son biocompatibles y biodegradables. Las VLPs tienen tres interfaces disponibles que pueden ser modificadas química o genéticamente: la superficie exterior (expuesta al solvente), la interfaz entre las subunidades de proteínas y la superficie interna. Esta última se ha utilizado para encapsular diversos materiales como metales, fármacos, ADN y proteínas con el fin de sintetizar nuevos materiales, catalizadores y sistemas de entrega. Las diferentes superficies se pueden utilizar para ajustar con precisión nuevas funciones para las diferentes aplicaciones (Chauhan et al., 2021; Essus et al., 2023; González-Davis et al., 2023; Sánchez y Rafael Vázquez Duhalt, 2018; Sergio Picazo-Vela y Luis Ricardo Hernández, 2020; Yu et al., 2022).

Desde esta perspectiva, las VLPs emergen como los nanotransportadores ideales ya que han demostrado su uso potencial como nanobiorreactores (biorreactores de tamaño nanométrico) debido a la encapsulación de cantidades significativas de enzimas terapéuticas. Su estructura porosa permite una difusión eficiente de los sustratos (metabolitos) y los productos pueden entrar y salir fácilmente. El interior de las VLPs actúa como una cámara de reacción aislada donde pueden ocurrir múltiples reacciones catalíticas en conjunto, siendo así un vehículo atractivo para el suministro de actividad biocatalítica. Además, la presencia de grupos reactivos en la superficie de las VLPs facilita la funcionalización de la superficie con ligandos que son reconocidos por receptores celulares específicos, lo cual resulta en un tratamiento que evita la circulación sistémica (Chauhan et al., 2018, 2022; González-Davis et al., 2023; Tapia-Moreno et al., 2017).

Las VLPs presentan claras ventajas como transportadores de carga molecular debido a que poseen una alta capacidad efectiva de carga; albergan múltiples sitios que pueden funcionalizarse fácilmente para el direccionamiento específico a células; están intrínsecamente diseñados para proteger y entregar la carga molecular a un objetivo (esta protección previene la degradación prematura de la carga y evita la interacción de la carga con el medio ambiente); y se acumulan dentro de los tumores sólidos debido al tamaño nanométrico, esto causado por un fenómeno conocido como efecto de retención y permeabilidad aumentada (EPR, del inglés "enhanced permeability and retention effect"). Esta acumulación se debe a que los vasos sanguíneos promovidos por el tumor rodean a dicho tumor, presentando una arquitectura

desorganizada con una serie de agujeros en su estructura (200-800 nm), lo que permite la extravasación de nanopartículas al tejido (Chauhan et al., 2021; Sánchez y Rafael Vázquez Duhalt, 2018; Sánchez-Sánchez et al., 2014).

Uno de los modelos más prometedores para el desarrollo de nanojaulas de VLPs, es el bacteriófago P22 de *Salmonella typhimurium*. Es una cápside icosaédrica de 58 nm, compuesta por algunas proteínas minoritarias (proteínas de expulsión y portal) y ensamblada por la combinación de dos proteínas estructurales: por 420 proteínas de cubierta (CP) de 46.6 kDa que se ensambla con la ayuda de 100–300 proteínas de andamiaje (SP) de 33.6 kDa, en una estructura conocida como procápside. Las VLPs-P22 tienen aproximadamente el doble del diámetro exterior (~60 nm) de otras VLPs que se usan comúnmente (~28 nm), lo que le permite encapsular moléculas más grandes o un mayor volumen de carga. Designándolos como vehículos con una gran capacidad de carga, adecuados para transportar en su interior cantidades considerables de proteínas (utilizados para encapsular varias enzimas con alta densidad de carga) y además es capaz de conferir protección a la proteína encapsulada contra la degradación de la proteasa, así como una barrera contra el reconocimiento del sistema inmunitario. La estrategia utilizada para incorporar las enzimas en el interior de la cápside P22 requiere fusionar genéticamente la enzima deseada al extremo N de una forma truncada de la proteína de andamiaje, que aún es capaz de interactuar de forma no covalente con el interior de CP y dirigir el ensamblaje de la cápside (Essus et al., 2023; González-Davis et al., 2023; Noh, 2018; Sánchez y Rafael Vázquez Duhalt, 2018).

En la última década, el interés y la investigación sobre esta partícula han ido creciendo considerablemente, con una gran cantidad de estudios publicados que demuestran la amplia capacidad para modificar su estructura y la abundancia de cargamentos que ya han sido cargados en su interior. El objetivo de este trabajo se propone en diseñar las VLPs- P22 mediante la inmovilización de enzimas duales CYP y la glucosa oxidasa (GOx), con una función combinada de actividad enzimática dual y la liberación desencadenada de fármacos para una acción inteligente contra el cáncer de mama. Las enzimas duales podrán agotar la glucosa en el sitio tumoral, llevándolo a la inanición y, posteriormente, catalizar la transformación enzimática del profármaco estimulada por el microambiente tumoral (TME, del inglés “tumor microenvironment”). Por lo tanto, se espera que el desarrollo de nuevos nanocompositos de VLPs-P22 muestren su capacidad de combinar múltiples componentes mientras conservan la integridad estructural y la actividad de los biocatalizadores, siendo al mismo tiempo una plataforma multimodal basada en P22 que combina varias propiedades para luchar contra el cáncer por múltiples caminos a la vez y proporcionando una estrategia innovadora y dirigida para el tratamiento efectivo de esta enfermedad.

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Nanocompositos terapéuticos para la terapia contra el cáncer de mama

En los últimos años, ha habido un creciente interés en el desarrollo de nuevas tecnologías a escala nanométrica debido a la demanda de terapias alternativas para el tratamiento del cáncer. La necesidad de desarrollar sistemas de administración dirigidos específicamente al tejido tumoral y así tener una mayor eficiencia del tratamiento. El transporte optimizado basado en la nanotecnología muestra un desarrollo revolucionario para superar las limitaciones de las terapias convencionales (Essus et al., 2023; Shende y Shah, 2021). Esto abre el camino para el desarrollo de estrategias terapéuticas alternativas como las terapias combinadas. En 2015, Tian y colaboradores las describen como la administración conjunta de dos o más agentes terapéuticos o una combinación de diferentes tratamientos generando efectos anticancerígenos sinérgicos, maximizando la eficacia del tratamiento y reduciendo la toxicidad individual relacionada con los medicamentos (minimizando los efectos secundarios adversos), todo gracias a una administración más precisa y dirigida (Shende y Shah, 2021; Singh et al., 2021).

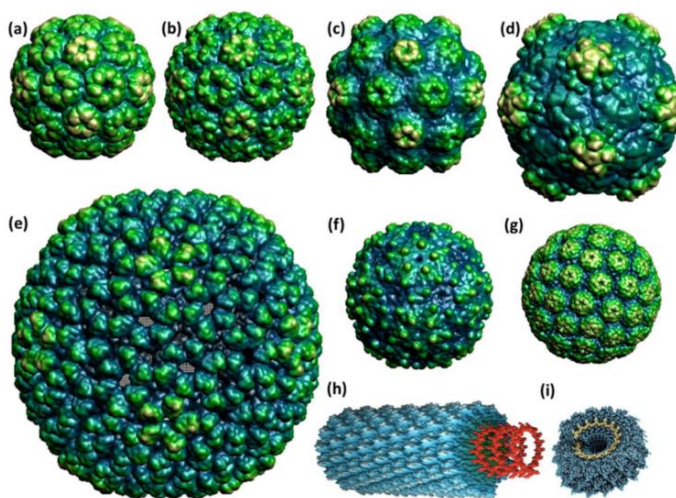
En este sentido, Nayak y Hasnain en 2021 destacaron la capacidad anticancerígena de los transportadores de tamaño nanométrico, comúnmente llamados "nanotransportadores". La mejora de la farmacocinética y la biodistribución, la disminución de la toxicidad, la mejora de la solubilidad, la estabilidad, la liberación controlada y la administración de agentes terapéuticos en sitios específicos son algunas de las características que los nanotransportadores pueden incorporar en los sistemas de administración de fármacos como lo han reportado Din y colaboradores en 2017. Además, las propiedades fisicoquímicas de los nanotransportadores se pueden ajustar alterando su composición (orgánica, inorgánica o híbrida), tamaños (pequeños o grandes), formas (esfera, varilla o cubo) y propiedades superficiales (carga superficial, grupos funcionales, PEGilación u otro recubrimiento, unión de fracciones objetivo, etc.) estos son una plataforma revolucionaria para superar los desafíos existentes para el tratamiento del cáncer (Din et al., 2017; Nayak y Hasnain, 2021; Shende y Shah, 2021).

Los nanocompositos son sistemas integrados por más de un material y que tienen al menos una dimensión física en el rango nanométrico. En el 2018, Mishra y colaboradores destacaron su papel en la administración de fármacos dirigidos al cáncer: 1) se pueden funcionalizar para administrar fármacos de forma selectiva en el sitio del tumor; 2) pueden circular durante más tiempo para que estén presentes en la circulación sistémica durante más tiempo; 3) se pueden obtener diferentes propiedades fisicoquímicas

mediante la combinación de diferentes materiales; 4) se puede modificar el tamaño y la química de la superficie para modular los efectos citotóxicos; 5) una superficie más grande puede ser útil para una mayor carga biomolecular; 6) los abundantes grupos funcionales asociados con los nanocompositos permiten su bioconjugación; 7) se pueden conjugar con ligandos para dirigirse a células cancerosas específicas mediante una internalización eficiente, mejorando así la eficacia terapéutica. La naturaleza multicomponente de los nanocompositos hace que las propiedades fisicoquímicas resultantes sean al menos una combinación aditiva de las propiedades de los componentes individuales, pero incluso con una se puede producir un efecto sinérgico otorgando propiedades únicas al compuesto. Además, la amplia variedad de estrategias sintéticas y nanomateriales que puede manejar la comunidad investigadora abre la posibilidad de diseñar nanocompositos con capacidad de respuesta múltiple para lograr una mejor administración dirigida en un sitio de acción específico (Nayak y Hasnain, 2021).

### 1.1.2 Nanotransportadores basados en partículas tipo virus

El uso de jaulas de proteínas basadas en VLPs se han propuesto como nanoplataformas de transporte para administrar terapias anticancerígenas a células tumorales específicas confiriendo muchas ventajas: son excepcionalmente robustas y permanecen estables en una variedad de temperaturas y pHs. Además, pueden modificarse fácilmente tanto genética como químicamente ya sea en su superficie externa, en la interfase entre las subunidades proteicas o en la cara interna. Esta última se ha utilizado para encapsular diversos materiales como metales, medicamentos, DNA y proteínas con el fin de transportar y proteger su carga. Esta protección previene la degradación prematura de la carga y evita la interacción de la carga con el medio ambiente. Dada su alta superficie específica que contiene grupos reactivos se pueden funcionalizar fácilmente con ligandos específicos para ser reconocidos por receptores específicos del tejido blanco o pueden conjugarse con otras moléculas para formar VLPs más complejas, lo que hace que estos nanotransportadores puedan ser verdaderamente dirigidos al sitio deseado. Debido a su tamaño, las cápsidas virales no pueden ser filtradas y eliminadas por el riñón (umbral de remoción <40 kDa), permaneciendo más tiempo circulando en el organismo (aumenta el tiempo de residencia dentro del organismo) (Chauhan et al., 2018; Gama et al., 2023; Qazi et al., 2013; Sánchez-Sánchez y Vazquez-Duhalt, 2014; Tejeda-Rodríguez et al., 2019). Estos virus exhiben una diversidad distintiva de formas y tamaños, desde formas simples helicoidales e icosaédricas hasta estructuras más complejas, que oscilan entre 20 y 750 nanómetros. En 2013, Wu y colaboradores presentan diversos virus de plantas y bacteriófagos que se han estudiado en los últimos años (Figura 1).



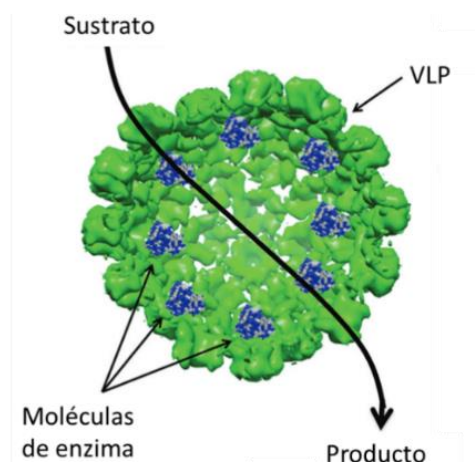
**Figura 1.** Estructuras de VLPs. (a) Virus del mosaico del bromo (BMV), de 27 nm de diámetro; (b) virus del moteado clorótico del frijol caupí (CCMV), de 28 nm de diámetro; (c) virus del mosaico amarillo del nabo (TYMV), de 30 nm de diámetro; (d) virus del mosaico necrótico del trébol rojo (RCNMV), de 36 nm de diámetro; (e) bacteriófago P22, 58 nm de diámetro; (f) bacteriófago MS2, 26 nm de diámetro; (g) virus simio 40, 25 nm de diámetro; (h) virus del mosaico del tabaco (TMV), de 18 nm de diámetro y longitud variable; (i) vista superior del TMV.

En los últimos años los virus, incluyendo bacteriófagos, han despertado interés en el desarrollo de nanocompositos, como lo mencionan Qazi y colaboradores en 2013, se han utilizado para la encapsulación de agentes de imagen como el virus del moteado clorótico del frijol caupí (CCMV), virus del mosaico del caupí (CPMV), y bacteriófagos Q $\beta$ 14 y MS2. Por ejemplo, el bacteriófago P22, de aproximadamente el doble de tamaño, permite una carga útil mucho mayor de agente de imágenes por cápside. El tamaño sustancial de la cavidad interior se puede utilizar de manera más eficiente mediante la incorporación de una red de oligómeros acoplada a múltiples agentes de obtención de imágenes de moléculas pequeñas. Ellos modificaron en su arquitectura genéticamente de "wiffleball" (sufre una transformación a esta forma permitiendo que las moléculas pequeñas se difundan libremente entre el medio externo y el interior de la cápside) con residuos reactivos de tiol específicos del sitio en la posición como agente de contraste para resonancia magnética basado en T1 Gd. En 2019, Gonzalez-Davis y colaboradores destacaron el desarrollo de un nanorreactor monoenzimático basado en virus. Encapsularon peroxidasa de rábano blanco en CCMV y estudiaron el comportamiento enzimático del nanorreactor desarrollado. Fue el primer informe que mostró la permeabilidad de la cápside del virus al sustrato/producto y la alteración de la permeabilidad por el cambio de pH. En la misma investigación sobresale la construcción un sistema multienzimático densamente empaquetado capaz de realizar una cascada acoplada de reacciones. En este trabajo, produjeron una proteína de 160 kDa mediante la fusión de  $\beta$ -glucosidasa, galactoquinasa y glucoquinasa y encapsuladas en VLPs derivadas del bacteriófago P22. Además, sus resultados mostraron que la

canalización intermedia entre enzimas secuenciales depende tanto de la distancia entre enzimas como del equilibrio entre los parámetros cinéticos de las enzimas involucradas.

### 1.1.3 Encapsulación de enzimas dentro de cápsides virales

Hasta ahora, esta estrategia es una de las alternativas más prometedoras, ya que la encapsulación de enzimas dentro de estos vehículos puede conducir a altas concentraciones internas de carga (en el rango de mM). Como se mencionó anteriormente, las VLPs son cápsides de virus vacías, generalmente de bacteriófagos o virus de plantas, y su capacidad para ingresar a células sin poder replicarse las convierte en una herramienta prometedora para aplicaciones terapéuticas. Además, las enzimas encapsuladas dentro de las VLPs son bionanorreactores de tamaño nanométrico y generan nuevas características en el nanorreactor resultante, como mejoras en la estabilidad frente a la temperatura o la degradación de proteasas, así como una barrera contra el reconocimiento por el sistema inmune. A través de los poros de las VLPs, los sustratos y productos pueden difundirse fácilmente, y el interior de las VLPs actúa como una cámara de reacción aislada donde pueden ocurrir múltiples reacciones en conjunto (González-Davis et al., 2023b; Sánchez-Sánchez et al., 2015; Sánchez-Sánchez y Vazquez-Duhalt, 2014). En 2017, Koyani y colaboradores enfatizan en que las características químicas de las cápsides vacías deben ser consideradas para el diseño de diferentes estrategias de diseño de VLPs enzimáticas funcionales (Figura 2); como la carga externa e interna, el tamaño, la nucleación, la temperatura óptima y el pH para el autoensamblaje y la formación de estructuras secundarias con diferentes fuerzas iónicas, degradación y estabilidad en condiciones no óptimas.



**Figura 2.** Partículas tipo virus como nanotransportadores para la administración de enzimas. Las moléculas de enzima están encapsuladas dentro de la cápside del virus.



La encapsulación por VLPs facilita la inmovilización de enzimas mediante diversos métodos, como lo mencionan en los grupos de investigación de González-Davis en 2023 y Wilkerson en 2018 en sus artículos, existe una diversidad de estrategias de encapsulación, algunas de ellas son por; cargas complementarias, conector dirigido, proteína de fusión (mediada por proteínas de andamio), encapsulación dirigida no covalente, por espiral, por aptámeros de ARN y encapsulación dirigida covalente. Esta inmovilización da lugar al aumento de la velocidad de las reacciones, cuando la reacción ocurre dentro de la VLP debido a la gran cantidad de enzimas confinadas. Estas reacciones enzimáticas en cascada son reacciones catalíticas altamente coordinadas de sistemas multienzimáticos en las que se pueden alcanzar consecutivamente reacciones más complejas. Una cuestión clave de estas vías enzimáticas altamente eficientes es la organización cooperativa y espacial de las enzimas para garantizar la conversión secuencial de sustratos (Chauhan et al., 2020, 2021; Essus et al., 2023; González-Davis et al., 2023).

Actualmente muchos estudios han demostrado el gran potencial en este ámbito, por ejemplo, el primer artículo reportado sobre la encapsulación de enzimas en VLPs fue en el 2007, Comellas-Aragonès y colaboradores diseñaron un sistema para estudiar el comportamiento cinético de enzimas a nivel individual, basado en la incorporación de la peroxidasa de rábano blanco (HRP, del inglés “horseradish peroxidase”) en la cavidad interna del virus CCMV, demostrando que la cápside del virus es permeable al sustrato y al producto y que esta permeabilidad puede alterarse cambiando el pH. En la investigación de DePorter y McNaughton en 2014, bioconjugaron los bacteriófagos M13 con peroxidasa de rábano blanco (en la proteína de cubierta p9) y una secuencia peptídica llamada Ypep, que tiene capacidad de orientación y penetración en células de cáncer de próstata PC-3 (en la proteína de cubierta p3). La peroxidasa de rábano blanco convierte el profármaco ácido indol-3-acético (IAA) en un radical peroxilo, y la adición simultánea de los fagos M13 con IAA condujo a una muerte celular casi completa *in vitro* contra las células PC-3. En el 2020 Shukla y colaboradores mencionan el exitoso resultado del confinamiento de una cascada enzimática funcional debido al uso de etiquetas complementarias de ácidos nucleicos monocatenarios para lograr la coencapsidación de múltiples enzimas en una sola partícula de CCMV. En otro trabajo, en el 2020 el grupo de investigación de Liu confinaron tres enzimas, amilasa, maltasa y glucocinasa en la estructura del fago T4. Cada enzima la fusionaron con la proteína de la cápside externa Hoc mediante el emparejamiento SpyTag-Spy Catcher y se ensambló en el fago T4.

También numerosos informes reportados por el grupo de investigación de Bionanotecnología del CNYN-UNAM, han destacado el exitoso encapsulamiento de enzimas basados en VLPs, en 2014 el trabajo de Sánchez-Sánchez mostraron por primera vez la encapsulación de una peroxigenasa mejorada CYP<sub>BM3</sub> (CYP) derivada de *Bacillus megaterium*, mutante 21B3, dentro de CCMV (mediante cargas electrostáticas) como

resultado tuvo la capacidad de lograr la transformación de profármacos quimioterapéuticos como el tamoxifeno y el resveratrol. En el grupo de investigación de Gama en 2021, demostraron la producción exitosa de nanorreactores enzimáticos basados en BMV, que contienen galactosa-1fosfato uridil-transferasa (GALT) mediante una estrategia de autoensamblaje molecular. Estos se internalizan eficazmente *in vitro* mediante diferentes cultivos celulares (fibroblastos de ratón L929 (CCL-1), hepatocitos murinos AML-12 y células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) (CCL-34)) sin funcionalización, lo que convierte en un candidato potencial como tratamiento terapia de reemplazo enzimático (ETR) para la galactosemia clásica. Otro informe en 2022 por Chauhan y colaboradores, lograron encapsular la enzima  $\beta$ -glucocerebrosidasa (Gcasa) dentro del virus del mosaico del bromo (BMV), y la superficie fue funcionalizada con grupos manosa, este estudio demuestra que pueden dirigirse selectivamente a células de macrófagos para internalizarse de manera eficiente e inducir un incremento significativo en la actividad de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa dentro de las células de macrófagos. Estos nanorreactores dirigidos y basados en VLPs mejoraron la estabilidad de GCasa, lo cual es crucial para mejorar la vida media en la circulación sanguínea. Otro estudio por Gama y colaboradores en 2023, diseñaron y produjeron nanorreactores enzimáticos utilizando el virus del mosaico del bromo (BMV) encapsularon la enzima glucosa oxidasa (GOx) y los recubrieron con albúmina sérica humana (VLP-GOx@HSA) para dirigirse a las células tumorales de mama triple negativo mostrando una evidente producción de oxígeno por la enzima antioxidante catalasa inducida por la alta producción de peróxido de hidrógeno a partir de la actividad GOx.

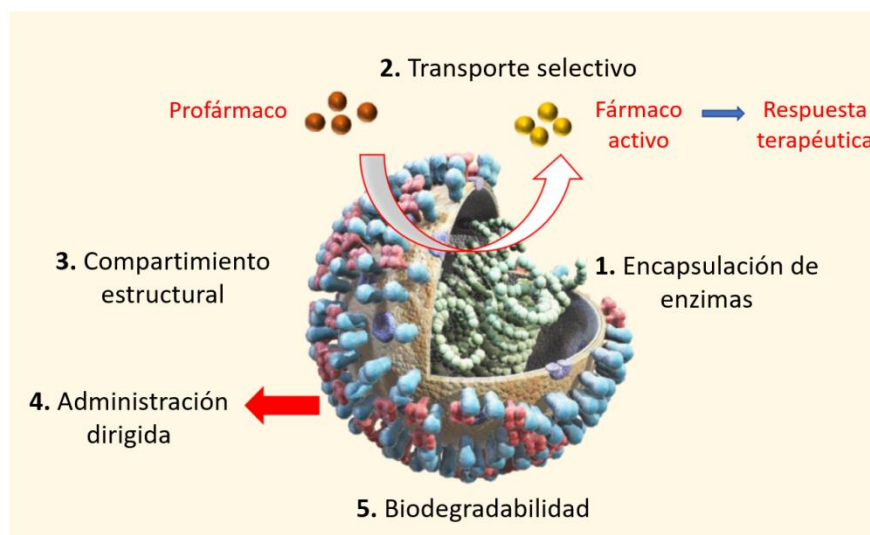
#### 1.1.4 Terapia de profármacos enzimáticos (EPT)

Los nanotransportadores que tienen la capacidad de administrar las enzimas de forma selectiva a los sitios específicos después de penetrar en la célula. De esta manera conservan el grado terapéutico del profármaco y la enzima después de tiempos de circulación prolongados. Estas propiedades hacen que los nanotransportadores hayan emergido como una estrategia prometedora para el tratamiento específico del cáncer, ya que los nanorreactores realizan reacciones altamente específicas para la producción *in situ* de moléculas terapéuticas a partir de profármacos inicialmente inertes o menos tóxicos (Chauhan et al., 2020; Sharifi et al., 2020).

El propósito del profármaco es eliminar los impactos negativos citotóxicos mediante la activación de ellos por enzimas en los sitios específicos. Los profármacos son compuestos menos tóxicos o no tóxicos que al sufrir una transformación *in vivo* por medio de reacciones químicas o enzimáticas resultando en una alta concentración local de las moléculas tóxicas en el sitio de tratamiento. La administración de profármacos

mediante el uso de nanorreactores enzimáticos a tejidos específicos del cuerpo mejora la eficiencia del tratamiento, reduciendo las dosis, minimizando los efectos secundarios y mejorando su función en comparación con los tratamientos convencionales. Este es principio de la terapia de activación enzimática de profármacos (EPT, del inglés “enzyme prodrug therapy”), la cual se basa en la activación específica de un profármaco en el sitio del tumor para la eliminación eficiente de las células cancerosas, preservando al mismo tiempo los tejidos sanos (Mukerabigwi et al., 2018; Tapia-Moreno et al., 2017; Vivo-Llorca et al., 2022).

El objetivo final de esta estrategia utilizando enzimas exógenas es el de aumentar la concentración local de fármaco activo en las células tumorales, lo cual incrementaría la eficiencia del medicamento en el tumor y reduciría la toxicidad producida por el fármaco en el resto de las células. Esta terapia se lleva a cabo en dos pasos, en el primer paso, la enzima exógena debe ser dirigida o expresada a las células de interés y acumularse en el sitio; para posteriormente en un segundo paso, administrar el profármaco no tóxico (ya sea de manera dirigida o sistémica), activándose selectivamente en las células objetivo siendo un sustrato de la enzima exógena que ahora se encuentra en los tumores. El resultado final es que el profármaco administrado sistémicamente puede transformarse en una alta concentración local de un fármaco anticancerígeno activo en los tumores (Sánchez-Sánchez y Vazquez-Duhalt, 2014; Xu y McLeod, 2001). El alcance de la EPT se amplía mediante el uso de VLPs como portadores de enzimas (Figura 3) (González-Davis et al., 2023).



**Figura 3.** Representación esquemática de las VLPs como nanotransportadores para la terapia con profármacos enzimáticos. Las VLPs poseen características como estructuras huecas para la encapsulación de la enzima para la transformación específica de un profármaco en un fármaco activo que mejora los resultados terapéuticos, compartimiento estructural para diversas modificaciones, administración dirigida al sitio enfermo y alta biodegradabilidad, lo que lo destaca para el desarrollo de nanomedicinas inteligentes para el tratamiento del cáncer.

Se han propuesto a grandes rasgos dos métodos para llevar a cabo el suministro de la enzima, capaz de activar el profármaco, a las células de interés: suministro de genes, conocidos por sus siglas en inglés como GDEPT (gene-directed enzyme prodrug therapy) y suministro de enzimas activas ADEPT (antibody-directed enzyme prodrug therapy). El mayor número de ensayos clínicos en curso es la EPT dirigida por genes, también conocida como “terapia génica suicida”, involucra la introducción a células tumorales específicas, de uno o varios genes que codifican para enzimas con la capacidad de transformar profármacos. Estos genes pueden ser suministrados a las células tumorales utilizando distintos vectores, entre los que se encuentran los de tipo viral. Por otro lado, para el caso del suministro de enzimas activas, la terapia basada en anticuerpos ha sido una de las más desarrolladas marcó el primer éxito ampliamente reconocido de la EPT. La enzima capaz de transformar el profármaco se dirige selectivamente a las células blanco, a través de la conjugación con un anticuerpo, que tiene la capacidad de unirse específicamente a antígenos que se expresan en la superficie de las células tumorales (Sánchez-Sánchez y Vazquez-Duhalt, 2014; Walther et al., 2017; Xu y McLeod, 2001).

La mayoría de los medicamentos utilizados para la quimioterapia se administran como profármacos y deben ser transformados a su forma activa por la familia de enzimas citocromos P450 (CYP), como es el caso del tamoxifeno. El tamoxifeno es el profármaco antiestrógeno más utilizado para el tratamiento de cánceres de mama ER+, este es metabolizado por las enzimas del CYP, en dos metabolitos primarios, N-desmetil-tamoxifeno, 4-hidroxi-tamoxifeno, produciéndose una segunda reacción del metabolito 4-hidroxi-N-dimetil-tamoxifeno (endoxifeno). Es decir, el CYP metaboliza el tamoxifeno con las enzimas CYP3A4, CYP3A5 y CYP2C19 para convertirlo en desmetil-tamoxifeno, la enzima CYP2D6 metaboliza el tamoxifeno en 4-hidroxitamoxifeno y ambos metabolitos primarios en el metabolito secundario endoxifeno. El mecanismo de acción se basa en la capacidad de competir con los estrógenos y unirse a los receptores de estrógenos, de modo que bloquea la estimulación del crecimiento de células tumorales por parte de los estrógenos. Como resultado, inhibe la expresión de genes regulados por estrógenos y evita la proliferación de células cancerosas (Clemons et al., 2002; Huttunen et al., 2008; Loredó García, 2023; Medina et al., 2004; Pliego Sosa, 2020).

El CYP<sub>BM3</sub> de *Bacillus megaterium* comparte una notable similitud con el CYP3A4 humano, aunque su dominio hemo utiliza peróxidos en lugar de dioxígeno y NAD(P)H, facilitando la hidroxilación mediante la vía de derivación del peróxido. El CYP<sub>BM3</sub> tiene mayor solubilidad y estabilidad en comparación con otros tipos de CYP. Por esta razón, han reportado varias mutaciones inducidas aumentan su actividad catalítica para diversos sustratos. Una de estas variantes, CYP<sub>BM3</sub>21B3, fue obtenida por Cirino y Arnold en 2003 consta del dominio hemo y contiene la mutación F87A, nueve sustituciones de aminoácidos, y de las cuales

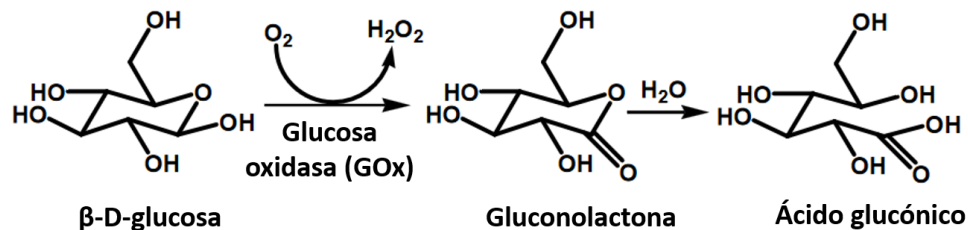
4 mutaciones se colocan en la superficie de la proteína, estas mutaciones adicionales ha demostrado su capacidad de transformar el tamoxifeno en fármacos anticancerígenos activos como el endoxifeno y 4-hidroxitamoxifeno, entre otros sustratos. Esta variante específica exhibe una actividad peroxidasa mejorada para el uso de  $H_2O_2$  como aceptor final de electrones; de esta manera, NADPH y el dominio reductasa ya no son necesarios (Pliego Sosa, 2020; Quester et al., 2017). Para aumentar la generación de la forma del fármaco activo *in situ* dentro del tumor, se han propuesto diferentes estrategias. El aumento de la actividad de CYP en el tejido tumoral podría inducir un tratamiento quimioterapéutico más eficaz y la consiguiente reducción de la cantidad de fármaco administrada, reduciendo así los efectos secundarios tóxicos sistémicos (Gonzalez-Davis et al., 2019).

En los últimos años, el grupo de investigación de Bionanotecnología del CNYN-UNAM, ha diseñado diversos nanotransportadores que encapsulan la peroxigenasa mejorada, CYP<sub>BM3</sub> derivada de *Bacillus megaterium* para la EPT. El CYP utiliza el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como aceptor de electrones en lugar del costoso cofactor natural NADPH; lo que lo hace más ventajoso en comparación del CYP450 natural. En el 2020, Chauhan y colaboradores demostraron que los nanorreactores bioactivos administraron la carga útil enzimática en el sitio del tumor, mejorando la transformación del tamoxifeno para lograr una mayor eficacia terapéutica con dosis más bajas del fármaco y con la capacidad de producir  $H_2O_2$  *in situ* para mejorar la eficacia terapéutica *in vivo*.

### 1.1.5 Terapia de inanición y oxidación mediada por glucosa oxidasa

Como proveedor clave de energía, la glucosa desempeña un papel crucial en el crecimiento, la proliferación y el metabolismo de las células tumorales que depende principalmente de la glucólisis aeróbica, haciendo que las células tumorales sean sensibles al cambio de concentración de glucosa. La terapia de inanición es un nuevo método que bloquea el suministro de nutrientes para frenar el crecimiento tumoral suprimiendo el suministro de energía, disminuyendo la concentración de glucosa y oxígeno en las células cancerosas al tiempo que aumenta el peróxido de hidrógeno que es citotóxico. Esta terapia utiliza la enzima glucosa oxidasa (GOx), que ha despertado un gran interés en la investigación del tratamiento contra el cáncer debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad inherentes, y a sus propiedades catalíticas únicas contra la  $\beta$ -D-glucosa (glucosa dentro de los tumores). La GOx como oxidorreductasa endógena cataliza eficientemente la oxidación de la glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) mediante el uso de oxígeno molecular como un aceptor de electrones (Figura 4) (L. Fu et al., 2019; L.-H. Fu et al., 2018; M. Wang et al., 2019; Z. Yu et al., 2018; Zhang et al., 2018).

Esto da lugar al agotamiento de la glucosa intracelular mediante la reacción enzimática de la glucosa (la principal fuente de energía conduce a la terapia de inanición), en la cual puede transformar la célula tumoral en una “célula hambrienta”, y al mismo tiempo induce una reducción de los niveles de  $O_2$  que activa la hipoxia tumoral lo que lleva a la muerte de las células cancerosas. Por otro lado, la generación de ácido glucónico incrementa la acidez del microambiente tumoral y esto puede desencadenar la liberación de fármacos que responden al pH. La oxidación de la glucosa por GOx también está asociada a la formación de  $H_2O_2$ , lo que puede facilitar muerte de las células cancerosas mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés “reactive oxygen species”) generadas a partir de  $H_2O_2$ . La terapia de oxidación se basa en el exceso de ROS como  $H_2O_2$ ,  $\bullet OH$  y oxígeno singlete para aumentar significativamente el estrés oxidativo de las células tumorales e inducir la muerte celular (Dinda et al., 2018; Fu et al., 2019; Fu et al., 2018). Entonces, la GOx es un candidato competitivo para la terapia de inanición y la terapia de oxidación debido a su actividad específica relativamente alta y los abundantes sustratos (glucosa) y oxígeno en el tejido tumoral. A medida que avanza la reacción, la glucosa se consume gradualmente; por lo tanto, se bloquea el suministro de glucosa, lo que induce una terapia de inanición, y el  $H_2O_2$  generado de forma continua puede inducir un estrés oxidativo en las células, es decir, una terapia de oxidación. (Wang et al., 2020).



**Figura 4.** Reacción catalizada por glucosa oxidasa. Obtenida por (Dinda et al., 2018).

En los últimos años se han desarrollado diferentes diseños de nanotransportadores enzimáticos que incorporan a la GOx con el fin de lograr una combinación sinérgica de terapias activadas por oxidación, inanición e hipoxia. Estos enfoques se han investigado como una estrategia innovadora para combatir las células cancerosas; algunos ejemplos son los nanogeles de polímero con GOx (Zhao et al., 2017a), nanopartículas huecas de sílice mesoporosa con un fotosensibilizador cloro e6 y GOx en la superficie coencapsulando el oxalato de bis (CPPO) y perfluorohexano (Yu et al., 2018), liposoma modificado con PEG cargado con GOx y el profármaco con diclorhidrato de banoxantrona (Zhang et al., 2018), estructura metal-

orgánicas (MOF) de imidazolato zeolítico 8 cargado con GOx y hemoglobina (Ranji-Burachaloo et al., 2019), nanohojas de dióxido de manganeso armadas con GOx (He et al., 2020), nanopartículas de CuS recubiertas de GOx (Singh et al., 2021) y VLP del mosaico del bromo (BMV) encapsulando la GOx recubierto con albúmina sérica humana (Gama et al., 2023). Los estudios que analizaron la viabilidad celular destacaron la disminución de la viabilidad con el uso de la glucosa oxidasa, y la toxicidad sistemática de GOx se reduce drásticamente cuando los transportadores la transportan a la zona tumoral.

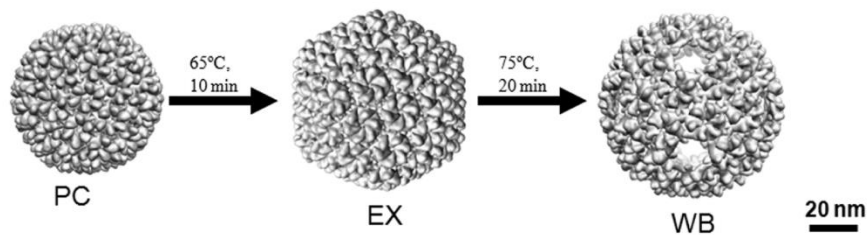
### 1.1.6 Nanocompositos basados en P22 como plataformas multimodales en terapia combinada

Esta investigación destaca el uso potencial de nanocompositos P22 como plataformas multimodales con integridad estructural conservada y que además es posible utilizarlos en terapia combinada. Esta terapia implica la administración simultánea de dos o más agentes terapéuticos o una combinación de diferentes tratamientos, produciendo efectos anticancerígenos sinérgicos, reduciendo la toxicidad individual asociada con los fármacos y suprime la resistencia a múltiples fármacos a través de diferentes mecanismos de acción (Tian et al., 2015).

En este aspecto, una de las VLPs más estudiadas son las del bacteriófago P22 de *Salmonella typhimurium*. Es una cápside icosaédrica de 58 nm compuesta por 420 proteínas de cubierta (CP) de 46,6 kDa producidas por el gen 5 para ensamblarse junto con 100-300 proteínas de andamiaje (SP) de 33,6 kDa producidas por el gen 8. El autoensamblaje de la cápside P22 en presencia de estas proteínas es una característica fundamental de este sistema. La procápside P22 adopta una estructura icosaédrica T=7 con un diámetro externo de 58 nm. Una enzima de interés puede encapsularse fácilmente en VLP P22 uniéndola genéticamente a la SP para formar una proteína de fusión y expresándolas de forma heteróloga junto con la CP (González-Davis et al., 2023; Hansol, 2020; Patterson et al., 2012; Sánchez-Sánchez et al., 2015).

Además, el P22 sufre una serie de transiciones estructurales caracterizadas al calentarse, lo que produce grandes cambios en el volumen interno y la accesibilidad externa a su interior hueco a través de transformaciones en la porosidad de la cápside (cambio de forma). Un calentamiento a 65°C durante 10 minutos provoca una expansión irreversible de la estructura CP con un diámetro promedio de 64 nm denominada forma expandida con pérdida de SP. El cambio resultante en el diámetro de la morfología de la cápside a su forma expandida da como resultado una casi duplicación del volumen efectivo de la cavidad interna (58 000 nm<sup>3</sup> en la forma compacta a 113 000 nm<sup>3</sup> en la forma expandida. Una transformación

adicional conocida como “wiffleball” (WB) se puede inducir calentando tanto la forma compacta como la forma expandida a 75°C durante 20 minutos (o más), lo que provoca la liberación selectiva de subunidades de los 12 vértices icosaédricos, produciendo una estructura más redonda marcada por la presencia de poros más grandes de alrededor de 10 nm en cada uno de los vértices, permitiendo así un mejor acceso al interior de la cápside. De esta manera, las VLPs P22 tiene tres morfologías (**Figura 5**) con propiedades distintas que pueden explotarse para múltiples fines, como carga de cargamento, decoración de partícula o estudios biofísicos (Essus et al., 2023; Patterson et al., 2012).



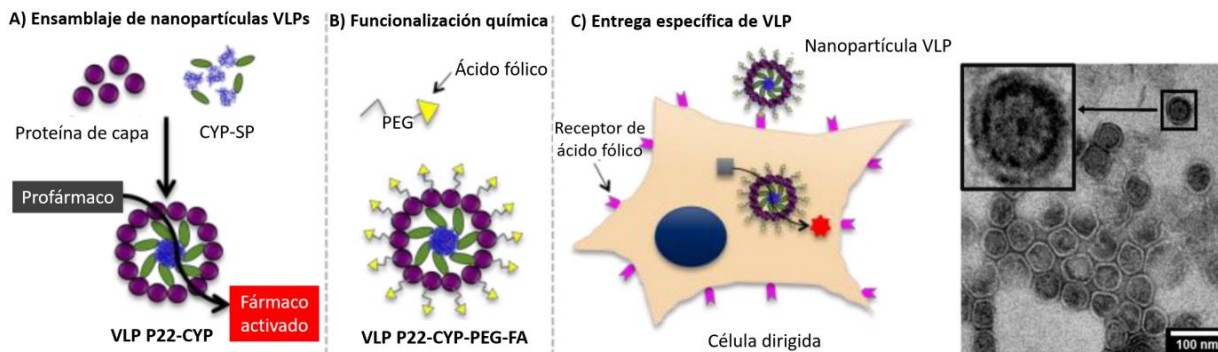
**Figura 5.** Representación de las tres morfologías diferentes que puede adoptar P22 dependiendo de las condiciones de calentamiento. Obtenido de (Patterson et al., 2012).

El grupo de Bionanotecnología del CNYN-UNAM ha utilizado con éxito las VLPs del bacteriófago P22 en la terapia de activación enzimática de profármacos o terapia combinada. Los informes más destacados que han dado base a este estudio son: El diseño de nanorreactores P22 con actividad CYP que fue reportado por primera vez en 2015, por Sánchez-Sánchez y colaboradores, en donde diseñaron un nanorreactor basado en la encapsulación de una peroxigenasa mejorada CYP<sub>BM3</sub>21B3 de *Bacillus megaterium*, dentro del bacteriófago P22. Estos contenían 109 moléculas de CYP por cápside y una estabilidad enzimática frente a la degradación de proteasas. La carga de CYP retiene el 70 % de la actividad catalítica y mostró una  $K_M$  ligeramente mayor en comparación con la enzima libre. Y finalmente evaluaron la actividad del citocromo P450 en células HeLa. Debido a sus propiedades obtenidas (la resistencia a las proteasas y la estabilidad en pH ácido), reportaron su uso potencial en la terapia de activación enzimática de profármacos contra el cáncer.

En otro estudio por Tapia-Moreno y colaboradores en 2017, también fusionaron genéticamente con el SP viral del bacteriófago P22 para producir nanorreactores P22 que contiene citocromo P450 (CYP), pero esta vez recubiertas con polietilenglicol y funcionalizadas con ácido fólico como ligando para su direccionamiento específico a receptores de folato (Figura 6). Las células tratadas (células de carcinoma



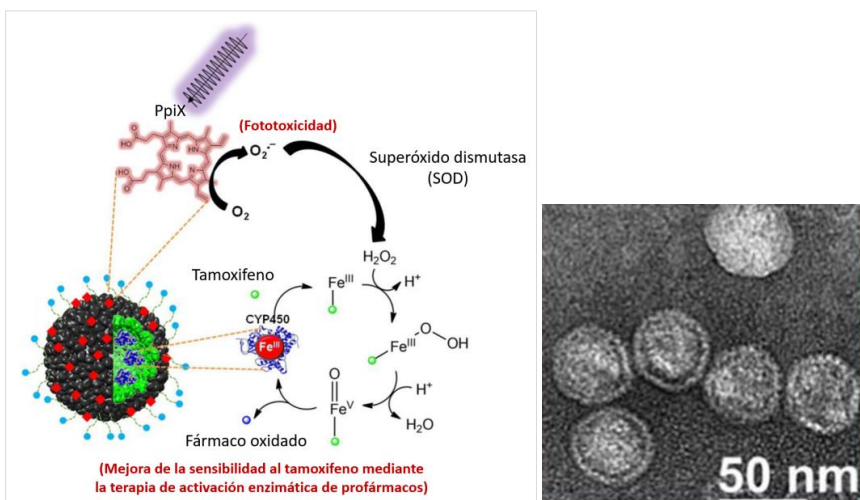
de cuello uterino humano HeLa y células de adenocarcinoma de mama MCF-7) mostraron una capacidad mejorada para la transformación del profármaco tamoxifeno, que resultó en un aumento de la sensibilidad celular a este fármaco oncológico.



**Figura 6.** Representación esquemática de las VLPs P22CYP funcionalizadas. A) Ensamblaje de las VLP P22 mediante la interacción no covalente. B) Funcionalización química por medio del recubrimiento con PEG que contiene ácido fólico en el extremo distal del polímero. C) Tratamiento dirigido por la liberación específica de los nanorreactores a los receptores sobreexpresados en las células. Micrografía TEM de VLP P22CYP-PEG-FA funcionalizadas. Obtenido de (Tapia-Moreno et al., 2017).

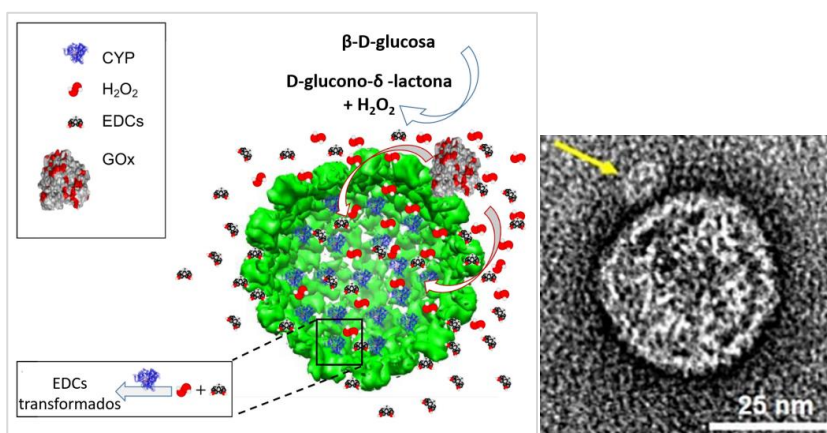
La multivalencia y versatilidad de los nanocompositos P22 también se utilizaron como plataforma multimodal para la administración específica de enzimas junto con el efecto sinérgico de la terapia de activación enzimática de profármacos y la terapia fotodinámica (PDT) en el estudio de Chauhan y colaboradores en 2018 para el tratamiento de cáncer de mama ER+. La multifuncionalización de las cápsides virales P22 con actividad CYP fue mediante la fusión del CYP y la proteína de andamiaje para permitir la activación enzimática del tamoxifeno dentro de las células cancerosa.

El nanorreactor resultante lo funcionalizaron con un fotosensibilizador, protoporfirina IX (PpIX) y se acopló con el ligando a base de estradiol en la superficie de la cápside utilizando polietilenglicol como conector mejorando el direccionamiento y consecuente internalización en las células MCF-7 y al mismo tiempo redujo significativamente la respuesta inmunogénica de las VLPs (Figura 7). Los nanorreactores funcionalizados con estradiol se internalizaron en las células tumorales de mama ER+, aumentando la actividad CYP intracelular y mostrando la capacidad de producir ROS tras la irradiación UV 365 nm. La sinergia entre la PDT y la EPT mejoraron drásticamente la sensibilidad al tamoxifeno *in vitro*, lo que demostró la capacidad de las VLPs para combinar múltiples componentes manteniendo la integridad estructural y la actividad de los biocatalizadores.



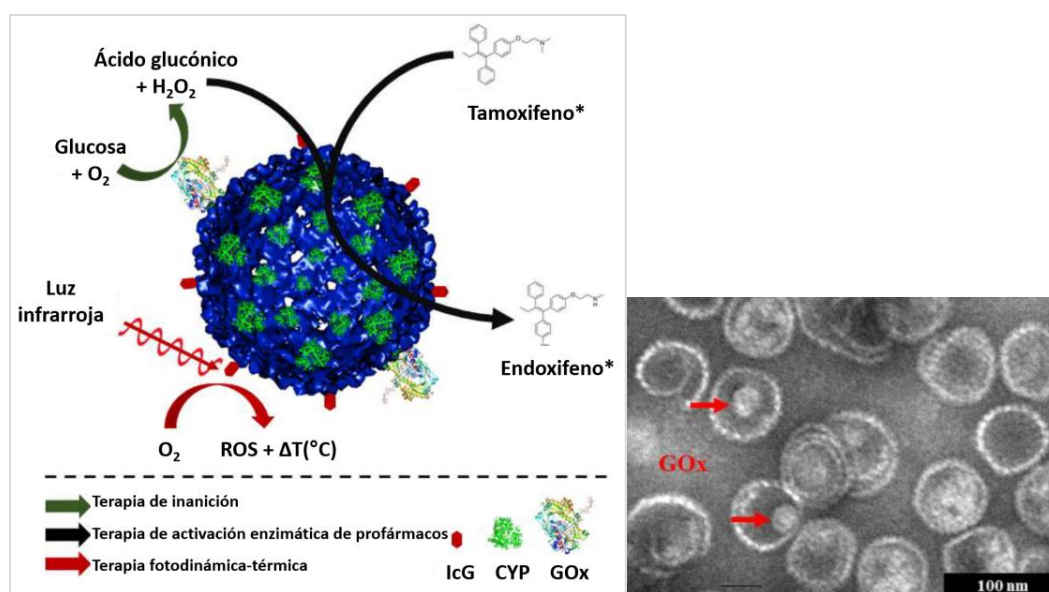
**Figura 7.** Representación esquemática del mecanismo plausible del efecto sinérgico de la terapia fotodinámica y enzima-profármaco, la biotransformación de tamoxifeno a través de peroxigenasas impulsada por la producción de ROS en presencia del superóxido dismutasa. Micrografía TEM de P22CYP-PpIX-PEG(EST). Obtenido de Chauhan et al., 2018.

Un estudio más reciente por González-Davis y colaboradores en 2020, diseñaron un bionanoreactor basado en la encapsulación de una peroxigenasa  $CYP_{BM3}21B3$  mejorada dentro de la cápside del bacteriófago P22 y funcionalizado con glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (Figura 8). En presencia de glucosa, estos bionanoreactores fueron capaces de generar *in situ* el peróxido de hidrógeno necesario para activar la transformación de compuestos disruptores endocrinos (bisfenol A, nonilfenol, 17- $\beta$ -estradiol, triclosán y resorcinol) mediado por CYP. Este estudio propone el uso de nanorreactores para eliminar compuestos tóxicos de células y tejidos, y su uso potencial en terapia con profármacos enzimáticos.



**Figura 8.** Representación esquemática del nanorreactor multienzimático. La glucosa oxidasa transforma la glucosa en D-glucono-lactona produciendo peróxido de hidrógeno, que activa el dominio hemo del CYP a través de la vía de derivación de la peroxidasa y, por tanto, se produce la transformación EDC mediada por el CYP. Micrografía TEM de nanobiorreactores P22CYP-GOx. Obtenida de González-Davis et al., 2020.

Finalmente en el 2020, el grupo de investigación de Pliego Sosa sintetizaron cápsides virales P22 con una peroxigenasa CYP<sub>BM3</sub>21B3, funcionalizado con glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* y verde de indocianina (IcG) unidos covalentemente a la superficie de la cápside (Figura 9). Los nanorreactores P22CYP-GOx-IcG mostraron actividad combinada en concentraciones de glucosa que normalmente se encuentran en las células de cáncer de mama, por lo tanto, la reacción en cascada GOx-CYP transforma el tamoxifeno en sus metabolitos activos dentro de las células de cáncer de mama. En este proceso, la GOx provoca una disminución de la concentración de O<sub>2</sub> y glucosa, lo que induce a una privación celular de nutrientes y oxígeno. Además, la irradiación de luz en el infrarrojo cercano (NIR) genera estrés oxidativo e hipertermia en las células cancerosas. En este trabajo evaluaron el potencial de los nanorreactores en una terapia combinada cuádruple contra el cáncer de mama, incluidas terapia con profármacos enzimáticos, fotodinámica, fototérmica y de inanición.



**Figura 9.** Representación esquemática de la reacción en cascada enzimática en los nanorreactores P22CYP-GOx-IcG para lograr una terapia combinada. Micrografía TEM de nanorreactores P22CYP-GOx. Obtenida de (Pliego Sosa, 2020).

Todos estos estudios destacan el uso potencial de las VLPs P22 como nano Plataformas multimodales en terapia combinada. Y hasta ahora, la terapia con profármacos enzimáticos se lleva a cabo administrando primero los nanorreactores y luego se introduce el profármaco. Sin embargo, los profármacos y los nanobiocatalizadores poseen farmacocinéticas diferentes que puede afectar los resultados del tratamiento *in vivo* debido a la diferencia en el perfil de acumulación y excreción tanto del fármaco como del biocatalizador. Por lo que no se puede correlacionar con qué rapidez se acumulan en sitio del cáncer o si se acumularán al mismo tiempo o cuánto tiempo de interacción tendrán.

Hasta donde sabemos, aún no se ha reportado la entrega conjunta de profármacos y nanorreactores (NRs). Por lo tanto, el enfoque de este proyecto es entregar ambos mediante el desarrollo de nanocomposito utilizando el bacteriófago P22, encapsulando una peroxigenasa CYP<sub>BM3</sub>21B3 mejorada y funcionalizado con la glucosa oxidasa en la superficie de la cápside junto con un derivado de tamoxifeno modificado químicamente utilizando polietilenglicol como conector. Se espera que el nanocomposito propuesto muestre una administración de P22 con una administración dirigida selectiva en las células tumorales de mama dado que es una plataforma multimodal para luchar contra el cáncer por múltiples vías a la vez.

## 1.2 Hipótesis

Las VLPs bienzimáticas sensibles al microambiente tumoral y transportando un profármaco pueden actuar como nanofábricas para la producción del fármaco activo *in situ*, mejorando la eficiencia de la terapia antitumoral.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 Objetivo general

Desarrollar y caracterizar partículas tipo virus como nanofábricas terapéuticas con una función combinada de actividad enzimática dual y una entrega de fármacos desencadenada para una acción inteligente contra el cáncer de mama.

### 1.3.2 Objetivos específicos

- Diseñar la síntesis química y caracterización del derivado de tamoxifeno.
- Diseñar, producir, purificar y caracterizar las cápsides virales P22CYP.
- Multifuncionalizar y caracterizar las nanofábricas P22.
- Estudiar la actividad enzimática de las nanofábricas P22.
- Analizar *in vitro* la internalización selectiva en líneas celulares ER+.
- Analizar la citotoxicidad mediante el ensayo MTT.

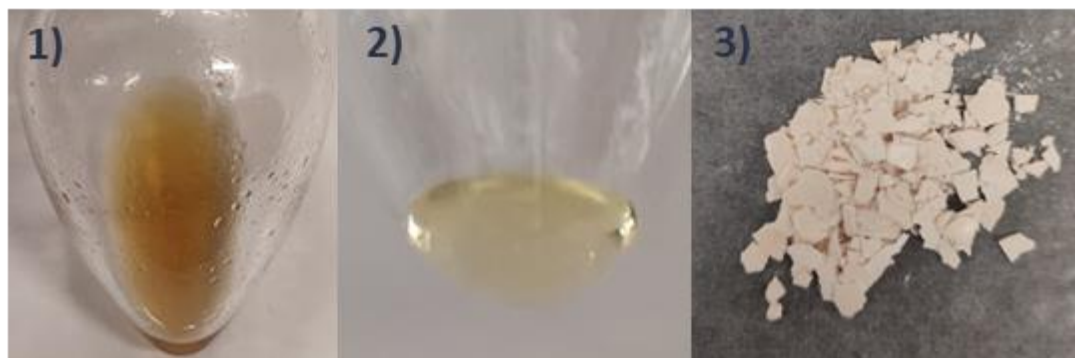
## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Síntesis química del derivado del tamoxifeno

La síntesis del compuesto N-desmetil tamoxifeno (Tam-NH) fue adaptado por la metodología descrita por Nelson et al., (2012) con algunas modificaciones.

Primero, se montó un sistema de reflujo en el cual se disolvieron 500 mg de tamoxifeno (Cayman Chemical) en 15 mL de 1,2-dicloroetano (DCE anhidrido, Sigma-Aldrich) en una atmósfera de nitrógeno y en agitación constante, obteniendo un producto viscoso blanco. Después se agregaron 0.58 mL de cloroformiato de 1-cloroetilo (AcE-Cl, Sigma-Aldrich) en agitación constante a 0°C durante 15 min. Posteriormente, se removió el nitrógeno y la reacción se sometió a reflujo a una temperatura de 70°C durante 48 horas. El progreso de la reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina (TLC) (matriz de gel de sílice, Sigma-Aldrich). Después de la reacción, el disolvente se evaporó al vacío en un rotavapor (BÜCHI) obteniendo un aceite viscoso de color amarillo [Figura 10 (1)].



**Figura 10.** Proceso de obtención del tamoxifeno desmetilado. 1) producto con impurezas, 2) producto después de purificar mediante cromatografía líquida y 3) producto puro (tamoxifeno desmetilado).

Para eliminar las impurezas del tamoxifeno obtenido se purificó mediante cromatografía líquida. En esta técnica de separación de componentes es en función de sus interacciones con una fase estacionaria, silica gel en este caso, mientras son eluidos por una fase móvil líquida. Entonces, se procedió a empaquetar la silica gel (Davisil grado 633, Sigma-Aldrich) en una columna de vidrio, y como fase móvil se utilizó al 10% metanol en diclorometano (DCM, Sigma-Aldrich), después el producto crudo se disolvió en DCM y se cargó

en la columna, finalmente se empacó con algodón de vidrio. Se recolectaron alícuotas de 1 mL y se analizaron mediante TLC. El puro producto se obtuvo con un rendimiento del 90%.

Para la siguiente reacción se realizó mediante la hidrólisis del producto purificado, se realizó mediante reflujo en el cual se utilizó el mismo sistema de reflujo y se añadieron 10 mL de metanol a una temperatura de a 70°C durante 18-24 horas hasta que el color cambió a amarillo pálido [Figura 10 (2)]. Finalmente, el solvente fue evaporado en el rotavapor obteniendo TAM-NH como polvo de color crema con un rendimiento del 70% [Figura 10 (3)]. El Tam-NH obtenido se guardó a 4°C en condiciones de oscuridad.

## 2.2 Caracterización del derivado de tamoxifeno

El producto final se caracterizó mediante espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR, del inglés “Fourier Transform Infrared”), espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN, del inglés “Nuclear Magnetic Resonance”) y espectrometría de masas de alta resolución (HRMS, del inglés “High-resolution mass spectrometry”).

### 2.2.1 Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier fue utilizada para comparar el tamoxifeno (precursor) y el Tam-NH en el equipo Bruker Tensor 27 FT-IR Spectrometer, identificando los compuestos químicos presentes debido a que cada compuesto tiene un patrón de absorción de infrarrojos único debido a las vibraciones de sus enlaces químicos. Asimismo, la se realizó la determinación de los grupos funcionales, dado que las vibraciones de los enlaces químicos en una molécula generan patrones característicos en el espectro FTIR.

Previamente al análisis se realizó la preparación de las muestras utilizando pastillas de bromuro de potasio (KBr, Sigma-Aldrich), con la ayuda de un mortero de ágata se pulverizó el KBr y se agregó la muestra en una proporción de 1:100 (muestra:KBr), se mezclaron hasta obtener una mezcla homogénea y finamente molida. Esta mezcla se comprimió en una pastilladora a presión, para obtener una pastilla con un espesor de 7-13 mm, y finalmente se montó correctamente en el área de muestreo para su medición. Los datos obtenidos fueron tratados en Excel y para graficar Origin9 de OriginLab.

### 2.2.2 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

Para obtener la información estructural detallada del tamoxifeno obtenido y del precursor se enviaron a analizar por espectroscopia de resonancia magnética nuclear al Instituto de Química de la UNAM, esta técnica se basa en la capacidad de los núcleos atómicos con espín nuclear de interactuar con campos magnéticos y absorber radiación electromagnética a una frecuencia específica, lo que proporciona información sobre la estructura y la composición de las moléculas en una muestra. El análisis se realizó en el instrumento Bruker Avance III 400 MHz. El tamoxifeno se disolvió en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) mientras que el TamNH se disolvió en metanol deuterado (MeOD) para obtener espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

### 2.2.3 Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)

La espectrometría de masas es una técnica analítica utilizada para determinar con precisión la relación entre la masa y la carga ( $m/z$ ) de los iones producidos, facilitando la identificación precisa de los compuestos del Tam-NH, esta caracterización determinó en principio la exactitud de masas de la muestra y la detección de iones puede ser positivos y negativos. Se envió a analizar la muestra en el Departamento de Innovación Biomédica (DIB) del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y el resultado es presentado como un espectro de masas, un gráfico de intensidad en función de la relación masa-carga.

## 2.3 Síntesis y purificación de las cápsides virales P22CYP

Los nanorreactores P22CYP fueron sintetizados y purificados conforme a los reportes anteriores del grupo de investigación del Dr. Vázquez-Duhalt con algunas modificaciones. Los nanorreactores enzimáticos se obtuvieron a partir de las células bacterianas *E. coli* BL21 (DE3) que albergan los plásmidos de expresión spBAD CYP-SP y pRSF P22 siguiendo la metodología reportada por Pliego Sosa en 2020 y Sánchez-Sánchez et al., en 2015.

La purificación de los nanorreactores consistentes en cápsides P22 conteniendo el CYP<sub>BM3</sub>21B3 de *Bacillus megaterium* constó de dos etapas, la extracción de las células bacterianas y la purificación por cromatografía de exclusión por tamaño.

Los pellets celulares se resuspendieron en 100 mL de buffer lisis (fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 7.6) mediante sonicación con un homogeneizador disruptor celular ultrasónico (YM-1000Y, TOPTION) a 35% de potencia durante 10 minutos, con 9.9 segundos de sonicación y 9.9 segundos de pausa para lisar las células. El homogenizado resultante se centrifugó con un rotor de ángulo fijo JA-25.50 (Beckman Coulter) a 13,000 rpm, 4°C durante 45 minutos para eliminar los residuos celulares.

Después el sobrenadante fue ultracentrifugado sobre un colchón de sacarosa [35 % (p/v)], se utilizó la ultracentrifuga (Optima XPN-100, Beckman Coulter) utilizando el rotor SW 32 Ti a 31,000 rpm, 4 °C durante 2:30 horas.

Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en buffer de PBS (fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 25 mM, pH 7.4), los cuales se filtraron con una membrana de 0.22 µm (Millipore). Se purificó con una columna de exclusión por tamaño (HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR, Sigma Aldrich) mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (AKTA Prime Plus, General Electric). Antes de la inyección, la columna se equilibró con 4 volúmenes de columna de buffer de PBS. Las fracciones colectadas que contenían las VLPs P22CYP se concentraron mediante ultracentrifugación a 31,000 rpm, 4°C durante 2 horas. Finalmente, se resuspendieron los pellets purificados P22CYP en un buffer de PBS y se almacenaron a -80°C.

## **2.4 Caracterización de las cápsides virales P22CYP**

### **2.4.1 Cuantificación de las cápsides virales P22CYP**

El ensayo de proteínas Quick Start Bradford (Bio-Rad) es un método rápido y bastante sensible para determinar la concentración de proteína en solución, se basa en el cambio en la absorbancia máxima del tinte Coomassie Brilliant BlueG-250, el color azul resultante se mide a 595 nm después de la unión a proteínas desnaturalizadas en solución. El protocolo consiste en obtener una curva estándar, en el cual se prepararon diferentes concentraciones de la muestra estándar (albúmina de suero bovino (BSA, Bio-Rad) y se hicieron diluciones del P22CYP, se realizaron por triplicado cada muestra y como blanco se utilizó agua Milli-Q. En una microplaca de 96 pocillos se realizó el ensayo con 20 µL de cada muestra en un pocillo y se añadió 200 µL del reactivo Bradford (Quick Start Bradford 1X dye Reagent, Bio-Rad). Se incubó temperatura ambiente por 5 min y en un espectrómetro UV (Multiskan Go Thermo) se midió la absorbancia a 595 nm. Los datos obtenidos fueron tratados en Excel en el cual se trazó una curva estándar



en función de la concentración de BSA y se estimó la concentración de las muestras mediante un análisis de regresión lineal para calcular la pendiente de la curva estándar.

#### 2.4.2 Análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

La pureza de las muestras se comprobó mediante electroforesis la que permite separar proteínas en función de su peso molecular y carga. El gel SDS-PAGE fue preparado en las siguientes etapas: primero se prepararon las soluciones para realizar la electroforesis: La solución acrilamida-bisacrilamida (30%-0.8%, Sigma-Aldrich), buffer de Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M, Bio-Rad), buffer de Tris-HCl pH 8.8 (1.5 M), persulfato de amonio (PSA, Sigma-Aldrich) al 10 % (p/v), buffer de corrida 1X (H<sub>2</sub>O, glicerol, buffer de Tris-HCl 1 M pH 8.8, SDS y azul de bromofenol), solución de tinción (0.1 % de Coomassie, Sigma-Aldrich), solución de destintación y buffer de carga (0.1 mg/mL de azul de bromofenol, 0.05 mg/mL de 2-mercaptoetanol, Sigma-Aldrich).

El gel separador (fase de separación) al 12% se preparó utilizando agua destilada, solución de poliacrilamida, buffer de Tris-HCl (pH 8.8), PSA (10%) y tetrametiletilendiamina (TEMED). El gel concentrador se preparó con agua destilada, solución de poliacrilamida, buffer de Tris-HCl (pH 6,8), PSA (10%) y TEMED. Las muestras preparadas con el buffer de carga en una proporción de 1:1 (v/v) y se calentaron a 95°C durante 10 minutos en una placa térmica antes de correr el gel. Posteriormente, las muestras fueron cargadas en el gel en la fase de separación. La electroforesis fue corrida a 200 V durante 1:30 horas. Al término, el gel fue teñido con la solución de Coomassie durante 18 horas, y después se hicieron dos lavados con agua desionizada para obtener las bandas de proteína. Finalmente, el gel fue escaneado en el transiluminador de gel SDS-PAGE (iBright FL1000, Thermo Scientific), y la imagen obtenida fue procesada con el software ImageJ® para realizar un análisis densidad de pixeles de las bandas teñidas en el gel, y de esta manera estimar la proporción de cada una de las proteínas que conforman los nanorreactores.

#### 2.4.3 Molaridad de confinamiento y porcentaje de ocupación

La molaridad de confinamiento y el porcentaje de ocupación fue calculado mediante la metodología de Pliego Sosa, 2020; Tafuya Romo, 2017 a partir de las ecuaciones 1 y 2.

$$M = \frac{(\text{Enzimas}_{\text{por cápside}})}{(V_{\text{int}})(N_A)} \quad (1)$$

M es la molaridad de confinamiento, Enzimas<sub>por cápside</sub> es el número de enzimas CYP por cápside, V<sub>int</sub> es el volumen interno de la cápside y N<sub>A</sub> es el número de Avogadro.

$$\% \text{ ocupación} = \frac{(\text{Enzimas}_{\text{por cápside}})(V_{\text{enz}})}{(V_{\text{int}})} \quad (2)$$

Enzimas<sub>por cápside</sub> es el número de enzimas CYP por cápside, V<sub>enz</sub> es el volumen de CYP y V<sub>int</sub> es el volumen interno de la cápside.

## 2.5 Multifuncionalización de los nanorreactores

La multifuncionalización constó de dos etapas, en la primera se funcionalizó la glucosa oxidasa (GOx, Sigma-Aldrich) de *Aspergillus niger* en la superficie de la cápside y la segunda etapa que fue la funcionalización de P22CYP-GOx junto con el derivado de tamoxifeno (Tam-NH) utilizando polietilenglicol como conector.

### 2.5.1 Multifuncionalización vía EDC y NHS

La glucosa oxidasa (GOx) de *Aspergillus niger* se funcionalizó en la superficie de las cápsides P22CYP mediante el acoplamiento de carbodiimida en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, Sigma-Aldrich) y N-hidroxisuccinimida (NHS, Sigma-Aldrich). Esta reacción permite el acoplamiento de dos grupos funcionales, un grupo ácido carboxílico (-COOH) y un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) para formar un enlace peptídico entre moléculas biológicas o químicas. Mientras que, EDC y NHS se usan para promover la unión peptídica en condiciones a temperatura ambiente. Se realizaron unas modificaciones a la metodología reportada por Pliego Sosa en 2020.

La conjugación de proteínas con variaciones drásticas de tamaño fue complicada, ya que la concentración de los reactivos EDC y NHS de acuerdo con las concentraciones molares de la proteína más grande, P22 (63 mDa), no fue suficiente para la conjugación eficiente de GOx para una reacción en cascada eficaz,

mientras que las concentraciones de los reactivos de acuerdo con proteína más pequeña, GOx (160 kDa), fueron demasiado altas y causaron la precipitación del P22. Se sabe que la GOx es una enzima cargada negativamente con una gran cantidad de grupos -COOH en la superficie. Por lo tanto, los grupos ácidos superficiales de la GOx se activaron primero mediante incubación con EDC y NHS a un pH ligeramente ácido durante 0.5 h, y el exceso de los reactivos se eliminaron mediante filtración con Amicon. Luego, la cantidad concentrada de la GOx activada se mezcló con el P22 que tenía EDC NHS en las concentraciones adecuadas para el P22.

En resumen, se agregaron 2.5 mg/mL de GOx, 37.5 µg de EDC y 25 µg de NHS en una solución de buffer MES (50 mM, pH 6, Sigma-Aldrich). Se dejó en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 14,000 G (Multifuge X1R, Thermo Scientific), 4 °C durante 20 minutos en unidades de filtro de membrana Amicon Ultra (Sigma-Aldrich) con un límite de 100 kDa para eliminar los reactivos y al mismo tiempo concentrar. Posteriormente la reacción obtenida se le agregó una solución con 2 mg/mL de los nanorreactores P22CYP, 3.04 µg de EDC y 1.94 µg de NHS en una solución de buffer de PBS (pH 7.4). La reacción se mantuvo bajo agitación constante durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se realizaron 3 lavados utilizando las unidades de filtro de membrana Amicon Ultra (Sigma-Aldrich) con un límite de 100 kDa para eliminar los reactivos, se centrifugó a 14,000 G, 4 °C durante 20 minutos. Y finalmente la reacción final se ultracentrifugó utilizando un rotor de ángulo fijo de 90 Ti (Optima XPN1000, Beckman Coulter) a 40.000 rpm, 4 °C, durante 1:30 horas. El pellet obtenido (P22CYP+GOx) se resuspendió en un buffer de PBS.

### 2.5.2 Bioconjugación de los nanorreactores P22 mediante PEGilación

La conjugación covalente del derivado de tamoxifeno (TamNH) en la superficie del complejo P22CYP-GOx se utilizó un polietilenglicol (PEG) heterobifuncional con éster succinimidílico y el grupo maleimida (NHS-PEG<sub>4</sub>-Mal, Thermo Scientific-Waltham, MA) en los extremos distales. Permitió la conjugación selectiva del TamNH mediante un enlace amida formando PEG-TamNH y por otro lado el sitio de maleimida estaba abierto para la conjugación con las VLPs (el sitio maleimida estaba unido covalentemente al exterior de las VLPs) (Chauhan et al., 2018, 2022). Con los grupos amina expuestos en la superficie de los nanorreactores P22CYP-GOx se obtuvieron los nanocompositos, P22CYP-GOx-PEG-Tam-NH.

En una solución de DMSO se mezclaron 4.6 µg de Tam-NH y 6.48 µg de NHS-PEG<sub>4</sub>-MAL durante 2 horas a 40°C, después, se añadieron 1 mg/mL de P22CYP-GOx y se dejó en agitación constante durante 2 horas a

temperatura ambiente (la concentración final de DMSO fue al 10% DMSO:PBS en la mezcla acuosa del volumen total de la reacción). Los nanocompositos obtenidos se purificaron mediante lavados de PBS y también para eliminar el exceso de los reactivos por centrifugación (Multifuge X1R, Thermo Scientific) utilizando las unidades de filtros de membrana de 100 kDa a 14000 G durante 15 minutos a 4°C; este paso de centrifugado se hizo dos veces con lavados con PBS, guardando también el sobrenadante. Por último, se resuspendieron los nanocompositos en PBS y se almacenaron a 4°C.

## **2.6 Caracterización de los nanoreactores P22 multifuncionalizados**

### **2.6.1 Distribución de tamaños y potencial zeta**

La distribución de tamaño y el potencial Z de los NRs en diferentes etapas de funcionalización se determinaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS, del inglés “dynamic light scattering”) así como para conocer la homogeneidad de las partículas. Las mediciones se analizaron con el Zetasizer Nanoseries (Nano-ZS, Malvern Instruments). Las muestras fueron preparadas con 50 µg de NRs en 1 mL de agua milli-Q, las mediciones se realizaron por triplicado y también se verificó su estabilidad realizando de nuevo la medición un mes después de la funcionalización. Los valores fueron graficados utilizando el programa Origin9 de OriginLab.

### **2.6.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)**

La morfología y el tamaño de los NRs se analizaron mediante un microscopio de transmisión (TEM, Hitachi HF-3300) del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), operado a 200 kV y utilizando la tinción negativa de acetato de uranilo. Para ello se utilizó una concentración de 0.1 mg/mL de las muestras y se utilizaron rejillas de cobre (malla 400) recubiertas con una película de soporte de formvar/carbono (TedPella, EE. UU.). Se depositó 12 µL de la muestra en la rejilla durante 5 min y se retiró el exceso. Después se retiró el exceso de agua y previamente el acetato de uranilo al 2% en peso se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min; y se agregó 10 µL de acetato de uranilo durante 1 minuto y se retiró el exceso. Finalmente, las rejillas fueron almacenadas hasta que fueron analizadas. El análisis de las micrografías electrónicas se realizó a través del programa ImageJ de NIH.

### 2.6.3 Electroforesis en gel de agarosa

Para corroborar la presencia del PEG-TamNH en los NRs la movilidad de estos se caracterizó mediante la electroforesis en gel agarosa, ya que permite separar y analizar moléculas en función de su tamaño y carga eléctrica. El gel de agarosa se preparó con agarosa LE (Gold Biotechnology) al 1 % en TAE 1X. Se calentó hasta disolver y se vertió en la cámara de electroforesis. Las muestras fueron preparadas con glicerol en una proporción de 1:1 (v/v). Después las muestras se cargaron en el gel y este se corrió a 40 V durante 4 horas. El gel se tiñó con jetBLUE (GeneDirex Inc, Taiwán) durante 18 horas y se destiñó con agua para obtener las bandas. Por último, el gel fue escaneado en un transiluminador de gel (iBright FL1000, Thermo Scientific).

### 2.6.4 Espectroscopia UV-VIS

La cuantificación del tamoxifeno presente en los NRs se determinó mediante espectroscopia UV-VIS (Lambda 25, Perkin Elmer). Se realizó una curva de calibración correspondiente al área bajo la curva del PEG-TamNH en función de la concentración para determinar la cantidad ( $\mu\text{g}$ ) presente en la superficie de los NRs multifuncionalizados. Primero, se preparó una solución con la misma cantidad de PEG-TamNH inicial en la reacción (23  $\mu\text{g}$ ) en 2.5 mL (PBS:10%DMSO), con esta solución se realizaron diluciones seriales para obtener la curva de calibración. EL sobrenadante que obtuvimos de la multifuncionalización se concentró mediante rotaevaporación e hicimos que el volumen total fuera similar al control PEG-TamNH para compararlo. Entonces, a partir de las gráficas se obtuvo la ecuación de la recta y con ella la relación entre área y cantidad de fármaco. Los valores fueron graficados utilizando el programa Origin9 de OriginLab.

### 2.6.5 Espectroscopia de fluorescencia

Para respaldar la presencia del tamoxifeno en los nanocompositos se caracterizó mediante espectroscopia de fluorescencia en una placa de 96 pocillos (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, Agilent Technologies). Las condiciones del equipo fueron: longitud de onda de excitación 260 nm de 280-500 nm, con una velocidad de adquisición media, voltaje medio, ventana de excitación en 5 nm y ventana de emisión en 5 nm, filtro de excitación auto y filtro de emisión abierto. La cuantificación del PEG-TamNH se realizaron mediante mediciones de fluorescencia a temperatura ambiente y las muestras fueron

previamente irradiadas por el transiluminador (iBright FL1000, Thermo Scientific) durante 15 min, debido a que el tamoxifeno por sí 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 (Pérez Sánchez, 2019). Los valores fueron graficados utilizando el programa Origin9 de OriginLab.

## 2.7 Ensayos de la actividad enzimática de los nanoreactores

### 2.7.1 Actividad enzimática del citocromo P450

Las actividades catalíticas de los NRs que contienen CYP se determinaron mediante la transformación de 2-6 dimetoxifenol (DMP, Sigma-Aldrich) ( $\epsilon_{468} = 14,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). El medio de reacción se realizó en 0.5 mL que contenía una mezcla de 15  $\mu\text{L}$  de los nanocompositos (2.2 mg/mL), 5  $\mu\text{L}$  de DMP (50 mM) en un buffer de Tris-HCl (50 mM, pH 8) a temperatura ambiente. La reacción se inició añadiendo 2.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.6 M) y el alcance de la reacción se monitoreo a 468 nm usando un espectrómetro UV-VIS (Lambda 25, Perkin Elmer) durante 5 minutos.

El coeficiente de extinción molar del producto transformado de DMP a 468 nm es  $14,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Chauhan et al., 2020). Para determinar la actividad específica y calcular los parámetros cinéticos del CYP presente en los nanoreactores P22CYP, se llevó a cabo ensayos de actividad enzimática con diferentes concentraciones de DMP. Los resultados obtenidos fueron analizados con el software Origin para la determinación de los parámetros cinéticos correspondientes.

### 2.7.2 Actividad enzimática de la glucosa oxidasa (GOx)

La actividad enzimática de la GOx se utilizó para comprobar la presencia de la GOx en los NRs. El medio de reacción se realizó en 1 mL que contenía una mezcla de 5  $\mu\text{L}$  de los nanocompositos (2.2 mg/mL), 95  $\mu\text{L}$  de glucosa (1M, Baker) y 2  $\mu\text{L}$  de guaiacol (Sigma-Aldrich) ( $\epsilon_{470} = 26,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) en un buffer de acetato de sodio (50 mM, pH 5.1) a temperatura ambiente. La reacción se inició añadiendo 33  $\mu\text{L}$  de peroxidasa (HRP, Sigma-Aldrich) (con una actividad de 60 U/mL). La absorbancia del producto oxidado se controló a 470 nm usando un espectrómetro UV/VIS (Lambda 25, Perkin Elmer) durante 3 minutos para calcular la actividad enzimática.

El coeficiente de extinción molar del producto transformado del guaiacol a 470 nm es  $26,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Chauhan et al., 2020). La GOx experimenta la oxidación de la glucosa y como producto secundario, genera  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que es utilizado por la peroxidasa para llevar a cabo la oxidación del guaiacol.

### 2.7.3 Actividad enzimática combinada de CYP-GOx

Para calcular la actividad combinada de CYP-GOx, se utilizó un medio de reacción de 0.5 mL que contenía una mezcla de 30  $\mu\text{L}$  de los nanocompositos (2.2 mg/mL), 48  $\mu\text{L}$  de glucosa (1M) y 5  $\mu\text{L}$  de DMP (50 mM) en un buffer de Tris-HCl (50 mM, pH 8) a temperatura ambiente, la velocidad de la transformación de DMP se controló a 468 nm usando un espectrómetro UV/VIS (Lambda 25, Perkin Elmer) durante 40 minutos. Se llevó a cabo ensayos de actividad enzimática y se utilizaron diferentes concentraciones de glucosa, los resultados obtenidos fueron analizados con el software CurveExpert Pro para la determinación de los parámetros cinéticos correspondientes.

## 2.8 Ensayo *in vitro* para la internalización selectiva en líneas celulares

### 2.8.1 Líneas celulares

Las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 se utilizaron para evaluar si los nanorreactores P22 tienen la capacidad de ejercer un efecto antitumoral. Estas líneas celulares se eligieron debido a la diferencia significativa en la expresión del receptor de estrógeno (ER) (Holliday y Speirs, 2011).

Las células MCF-7 derivadas del adenocarcinoma de mama humano, son células adherentes bastante grandes, con un tamaño de célula típico de diámetro de 15-20 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ). Esta línea celular de cáncer epitelial es ampliamente estudiada como cáncer de mama estrógeno-dependiente (su crecimiento y proliferación están influenciados por la presencia de estrógeno), debido a que expresa receptores de estrógenos, andrógenos, progestágenos y glucocorticoides. Tiene características ideales particulares del epitelio mamario, estas incluyen la capacidad de las células MCF-7 de unirse al estrógeno, específicamente el estradiol a través de receptores de estrógenos presentes en distintas partes de la célula, incluyendo el citoplasma. Esto da como resultado que la línea celular MCF-7 sea una línea celular positiva para el receptor de estrógeno y también es positivo para el receptor de progesterona y negativo para HER2

(European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), 2023; MCF-7 Cells, 2023). Las células MDA-MB-231 son una línea celular epitelial de cáncer de mama humano derivada de un adenocarcinoma de mama humano, son células adherentes con un tamaño de 10-20 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) de diámetro. A diferencia de MCF-7, MDA-MB-231 es conocida por ser estrógeno-independiente (o que significa que no depende de la presencia de estrógeno para su crecimiento y proliferación). Es una línea celular de cáncer de mama triple negativo (TNBC) altamente agresiva, invasiva y poco diferenciada, ya que carece de receptores de estrógenos, es decir, receptores de estrógeno alfa ( $\text{ER-}\alpha$ ) y receptores de estrógeno beta ( $\text{ER-}\beta$ ); y de progesterona (PR), así como la amplificación de HER2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) (European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), 2023).

### 2.8.2 Cultivo celular

Las condiciones del cultivo para ambas líneas celulares fueron a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera húmeda de 5% de  $\text{CO}_2$  (CelCulture  $\text{CO}_2$  incubator, ESCO). Todos los procedimientos se realizaron bajo condiciones estériles, en una campa de flujo laminar (NuAire). El mantenimiento y el subcultivo celular se llevó a cabo con el medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) con 4500 mg/L de glucosa, L-glutamina estable y bicarbonato de sodio (3.7 g/L) y sin piruvato de sodio, suplementado con suero fetal bovino (SFB, BIOWEST) al 10% (v/v) y 1% de antibiótico/antimicótico (Sigma-Aldrich). Cada tercer día el medio de cultivo (DMEM) fue reemplazado por DMEM nuevo a ambas líneas celulares. A las células MCF-7 se le adicionaron 1.8  $\mu\text{L}$  de estradiol ( $\beta$  estradiol, Sigma-Aldrich) lo que resultó en una concentración final de 9 mM en un volumen total de 7 mL.

De acuerdo con el protocolo del laboratorio de Cultivo Celular del departamento de Bionanotecnología, cuando los cultivos celulares alcanzaron una confluencia del 80-90% se realizaron subcultivos para asegurar el crecimiento exponencial de las células. Para ello las células se deben desprender utilizando tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich), una enzima proteolítica que rompe los enlaces de unión de las células. El medio de cultivo se retiró y se hizo un lavado con un buffer de PBS (buffer salino de fosfatos 1X, Sigma-Aldrich). Posteriormente las células se despegaron añadiendo 1 mL de tripsina-EDTA y se incubó durante 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Después, para inactivar la reacción se agregaron 2 mL de DMEM, se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL y se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se decantó y el pellet celular obtenido se resuspendió en 1 mL de DMEM. Para el conteo de células se tomaron 10  $\mu\text{L}$  del pellet resuspendió y se colocaron en una cámara Neubauer. Finalmente se sembraron 200-250 mil células en una caja de cultivo de 10 cm con 14 mL de DMEM y se colocaron en la incubadora.



## 2.9 Establecimiento de protocolo de internalización celular

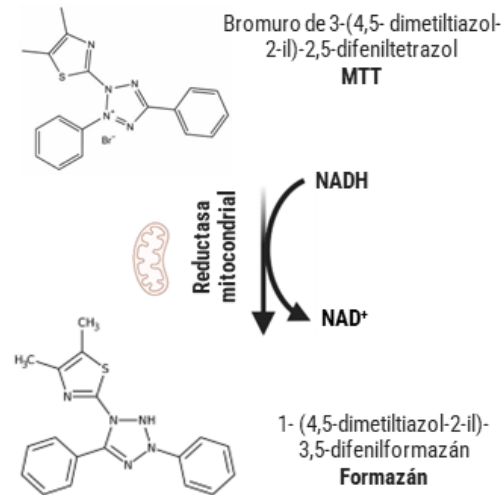
Para realizar los ensayos de MTT y observar la internalización celular de los NRs, se estableció un protocolo para conocer el efecto de las concentraciones de los tratamientos en ambas líneas celulares y el tiempo de incubación, considerando todo esto para los ensayos MTT e internalización. Con el objetivo de monitorear en vivo las células expuestas a los tratamientos mediante un microscopio invertido acoplado a una incubadora (Shel Lab, Lumascope-ETALUMA).

Se utilizó una placa de 96 pocillos, en la cual se sembraron 25,000 células (MCF-7 y MDA-MB-231) en cada pocillo con DMEM y se incubaron durante 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después el medio se retiró y se hizo un lavado con PBS 1X. Previo al ensayo, las muestras fueron previamente filtradas con una membrana de 0.22 µm (Millipore). Inmediatamente se agregaron los nanorreactores P22 (100 µg/mL) con el medio de DMEM con/sin glucosa (Sigma-Aldrich) (sin glucosa, L-glutamina, rojo fenol, piruvato de sodio y bicarbonato de sodio), suplementado con al 1% de antibiótico/antimicótico (Sigma-Aldrich) y finalmente el suero bovino fetal. Se utilizó como control positivo de viabilidad el DMEM sin glucosa suplementado y DMSO como control negativo de viabilidad. Las células fueron incubadas durante 24 horas siendo monitoreadas por el microscopio Lumascope-ETALUMA acoplado a la incubadora. Los fotogramas se obtuvieron mediante el software Lumaview.

## 2.10 Ensayos de viabilidad celular en presencia de los nanorreactores P22

### 2.10.1 Ensayo MTT

El efecto citotóxico causado por los nanorreactores P22 se estableció mediante el ensayo MTT para medir la actividad metabólica celular como indicador de la viabilidad y la proliferación celular. Este ensayo colorimétrico se fundamenta en la reducción de una sal de tetrazolio amarilla (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT) a cristales de formazán de color morado por las células metabólicamente activas. Las células viables contienen enzimas oxidorreductasas dependientes del NAD(P)H que reducen el MTT a formazán (Figura 11). Los cristales de formazán insolubles se disuelven utilizando una disolución de solubilización y la disolución coloreada resultante se cuantifica midiendo la absorbancia a con un espectrofotómetro multipocillos. Entonces, cuanto más oscura sea la disolución, mayor será el número de células metabólicamente activas viables (Merck, 2023).



**Figura 11.** El MTT es absorbido por las células y entra en las mitocondrias. Dentro de las mitocondrias, el MTT es reducido por enzimas mitocondriales en células metabólicamente activadas. Esta reducción convierte el MTT en su forma reducida, el formazán, que es insoluble en agua y se acumula en las células vivas.

La viabilidad celular puede evaluar cuántas células en una población siguen vivas después de un tratamiento específico, y al mismo tiempo comparar las células con el tratamiento y sus respectivos controles. Este ensayo se utilizó para determinar la capacidad de los NRs de inhibir el crecimiento celular y así, tener un efecto citotóxico (inanición por falta de glucosa) en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231.

Para el ensayo en placa de 96 pocillos, primero se sembraron 20,000 células (MCF-7 y MDA-MB-231, según sea el caso) en cada pocillo con DMEM y se incubaron durante 12 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se retiró el medio y se hizo un lavado con PBS 1X. Enseguida se agregaron por triplicado 100 µL de las concentraciones de los nanorreactores P22 (60, 100 120 µg/mL) con el medio de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM sin glucosa, Sigma-Aldrich) (sin glucosa, L-glutamina, rojo fenol, piruvato de sodio y bicarbonato de sodio) con al 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina y estreptomina, Sigma-Aldrich). Y se agregó al final directamente en cada pocillo el SFB al 10% (10 µL) a los tratamientos y controles con DMEM sin glucosa.

Las células fueron incubadas durante 4 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, considerando esta parte como tiempo de internalización en medio sin glucosa en los tratamientos con los nanorreactores P22. Cuando el tiempo transcurrió el medio de cada placa se descartó y se lavaron con PBS 1X. Después se agregaron 100 µL de DMEM a los pocillos que tenían los tratamientos y se incubaron durante 4 y 8 horas (placas diferentes). Después del período de incubación de cada tiempo establecido se añadió 10 µL de solución MTT (concentración final 0.5 mg/mL, Sigma-Aldrich) y se incubaron durante 4 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, cuidando que las placas no tuvieran exposición a la luz.

Finalmente, se agregó 100  $\mu$ L de la disolución de solubilización (isopropanol acidificado, Kit MTT) a cada pocillo y se incubaron hasta la solubilización completa de los cristales de formazán. El color se cuantificó midiendo la absorbancia de las muestras en el lector de placa (Multiskan Go Thermo) a 570 nm y tomando como referencia la medición a 690 nm. Los datos obtenidos fueron tratados en Excel y para graficar se utilizó el software GraphPad Prism.

## **2.11 Internalización de los nanorreactores P22 en MCF-7 y MDA-MB-231**

Para comprobar la internalización celular de los nanorreactores P22, se evaluó en células tumorales de mama humanas MCF-7 (ER+) y MDA-MB-231 (ER-) y demostrar la producción de ROS se realizó un ensayo de fluorescencia mediante microscopía confocal. Implica el uso de un sistema óptico especial que utiliza haces de luz enfocados en un punto específico de la muestra y una apertura en un plano conjugado focal para eliminar la luz fuera de foco proporcionando imágenes tridimensionales detalladas y reduce la luz fuera de foco, mejorando así la resolución y permitiendo la visualización en distintos planos de la muestra. Es ampliamente utilizada para analizar células vivas, fijas o secciones de tejidos que se puedan marcar con diversos fluoróforos (Aguilar Guzmán, 2020).

Las ROS son moléculas que regulan una amplia variedad de procesos fisiológicos celulares incluyendo la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. La sobreproducción de ROS, como el peróxido de hidrógeno o los radicales libres, pueden causar un daño irreversible a macromoléculas, bloqueo en la señalización, inhibición de la proliferación, envejecimiento, estrés oxidativo en las mitocondrias, daño al ADN mitocondrial, inflamación crónica y en muy altos niveles la muerte celular ya sea por apoptosis o necrosis. Para identificar la producción de ROS se utilizó el reactivo diacetato de 2',7' –diclorofluoresceína (DCFDA-abcam). Después de ingresar a la célula en forma de DCFDA, este compuesto es desacetilado por esterasas celulares, convirtiéndose en un compuesto no fluorescente. Posteriormente, cuando es oxidado por ROS se transforma en 2',7' –diclorofluoresceína (DCF). La DCF es un compuesto altamente fluorescente y puede ser detectado mediante espectroscopía de fluorescencia (Di Meo et al., 2016; Lim et al., 2019; Mikhed et al., 2015).

En este experimento se utilizaron cubreobjetos prefuncionalizados con Poli-L-lisina al 10% en PBS 1X en caja Petri de 3 cm de diámetro se sembraron 35,000 células por cada cubreobjeto, enseguida se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 20 minutos, después se agregaron 2 mL de DMEM y se dejaron en incubación por 24 horas. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se retiró el medio, se lavaron con PBS 1X y

después se agregó el DMEM sin glucosa, se colocaron los NRs (100 µg/mL) directamente en un volumen total de 2 mL y al final el SFB al 10% (200 µL) y se incubaron durante 4 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

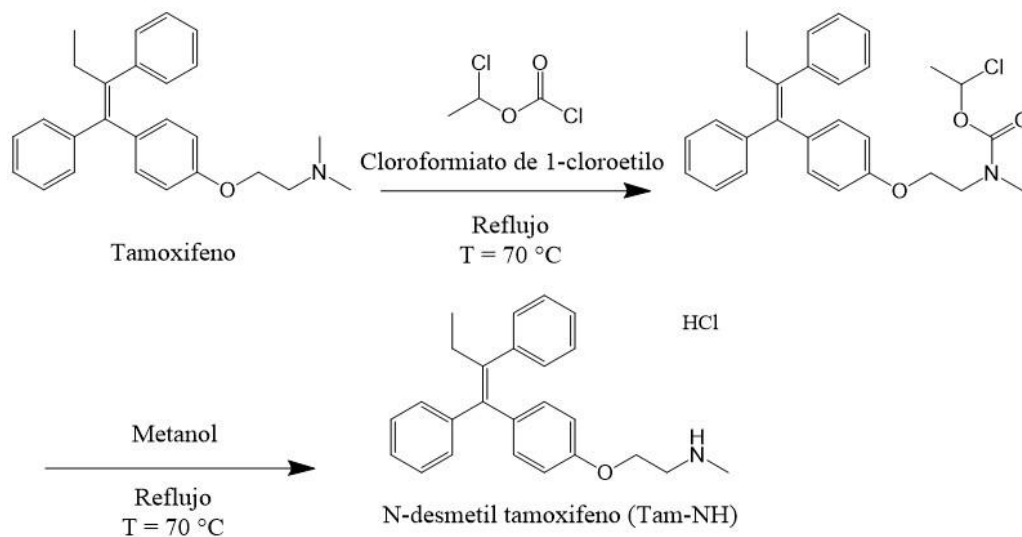
Al cumplir las 4 horas con el tratamiento el medio se retiró y se procedió a hacer un lavado con PBS 1X, después para teñir se agregó el diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA, Sigma-Aldrich) a 20 µM y se incubaron durante 30 minutos. El DCFDA es una sonda no fluorescente permeable a las células, y se desesterifica dentro de la célula y se transforma en 2',7'-diclorofluoresceína muy fluorescente tras su oxidación. Ya que nuestro interés es la cuantificación sensible y rápida de ROS en respuesta al metabolismo oxidativo (Merck, 2023a). Posteriormente se realizó otro lavado con PBS 1X para retirar los excedentes y para fijar las células se agregó glutaraldehído (Merck) en PBS 1X al 4% (v/v) durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS 1X, 3 lavados con PBS 1X con 0.3% de Tween 20 (Sigma-Aldrich) para después teñir los núcleos con DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol) es un fluoróforo permeable a las células que se une fuertemente a las hebras de ADN bicatenario, se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 15 minutos. Finalmente, se lavaron con PBS 1X y los cubreobjetos se montaron en los portaobjetos. Todas las muestras fueron observadas en un microscopio confocal FV1000 FluoView (Olympus®) utilizando la emisión y la excitación del DAPI y DCFDA. Se capturaron células con núcleos marcados con DAPI (teñidas en azul) y para ROS con DCFDA (teñidas de verde), las imágenes fueron procesadas mediante el software ImageJ y OLYMPUS FLUOVIEW Ver.4.2b.

## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Caracterización del derivado de tamoxifeno

Para la funcionalización del tamoxifeno en P22, se sintetizó el N-desmetil tamoxifeno (Tam-NH) con el grupo amina secundaria. En general, la síntesis se realizó en dos pasos (Figura 12).

En la primera reacción, la reacción de acilación se llevó a cabo desplazando un grupo metilo de la dimetilamina del tamoxifeno. Posteriormente, el producto fue sometido a hidrólisis utilizando exceso de metanol, reemplazando el grupo acilo por un hidrógeno, obteniendo el compuesto Tam-NH (Dreaden et al., 2009; Nelson et al., 2012; R. A. Olofson et al., 1984). Los productos de la reacción se analizaron por espectroscopía infrarroja, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas de alta resolución.



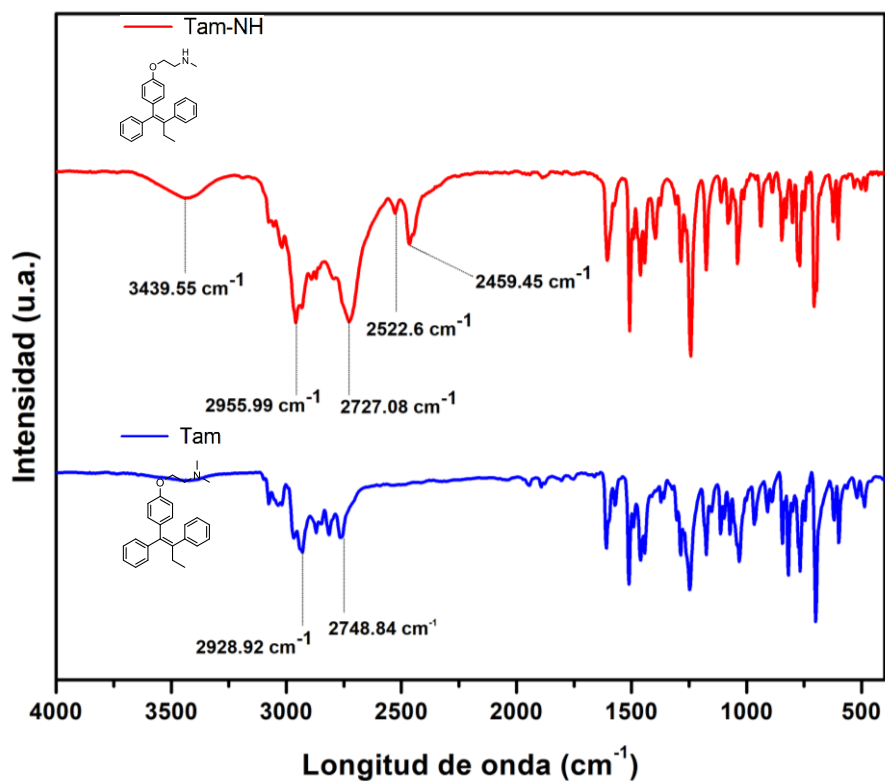
**Figura 12.** Esquema de la síntesis de tamoxifeno desmetilado (Tam-NH). Elaborado en el programa de ChemDraw.

#### 3.1.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR del precursor tamoxifeno y el Tam-NH se muestran en la Figura 13, el espectro FTIR de Tam-NH demuestra todas las características de las bandas del precursor tamoxifeno, confirmando exitosamente la síntesis, ya que en el espectro se observa un pico de intensidad media en  $3439.55\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la vibración de estiramiento de N-H (nitrógeno-hidrógeno) de las aminas secundarias en la región de alrededor de  $3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ ; este pico es relativamente ancho y a comparación del

precursor, está ausente. El resto de los picos corresponden al análisis previo que realizó otro grupo de investigación confirmando la síntesis del-TAM-NH (Kumar et al., 2018).

Además, los picos que aparecen a aproximadamente  $3000\text{ cm}^{-1}$  (superpuestos),  $2955.99\text{ cm}^{-1}$  y  $2849\text{ cm}^{-1}$  se atribuyen al modo de estiramiento de los enlaces C-H aromáticos (Nankali et al., 2020).



**Figura 13.** Espectro FTIR de Tam-NH (rojo) y su precursor (azul). La ausencia del estiramiento de N-H ( $3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ ) en el precursor confirma la formación del producto N-desmetil tamoxifeno.

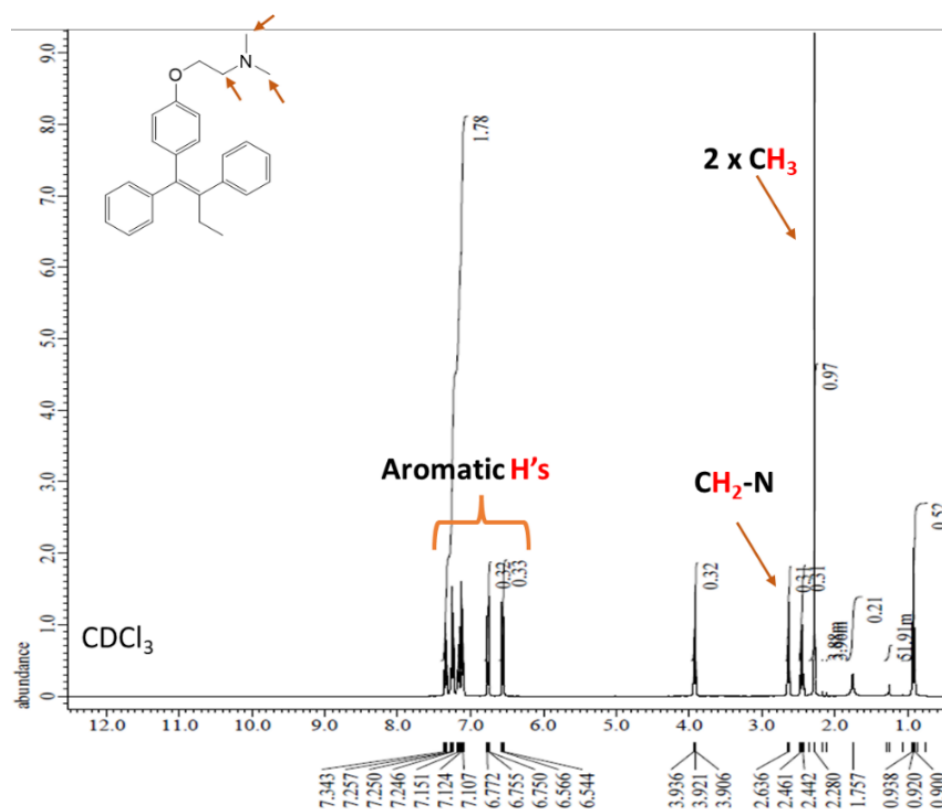
### 3.1.2 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

Al comparar el espectro de protones del precursor tamoxifeno y el producto Tam-NH, se observa un cambio significativo en la posición de los picos de los protones a medida que el entorno químico cambia, de amina terciaria a amina secundaria. Los otros picos están intactos debido a que su entorno químico no ha cambiado. Por lo tanto, se observó un cambio en la posición máxima de los protones correspondientes al grupo metilo y al grupo metileno como se observa en la Figura 14 y Figura 15.

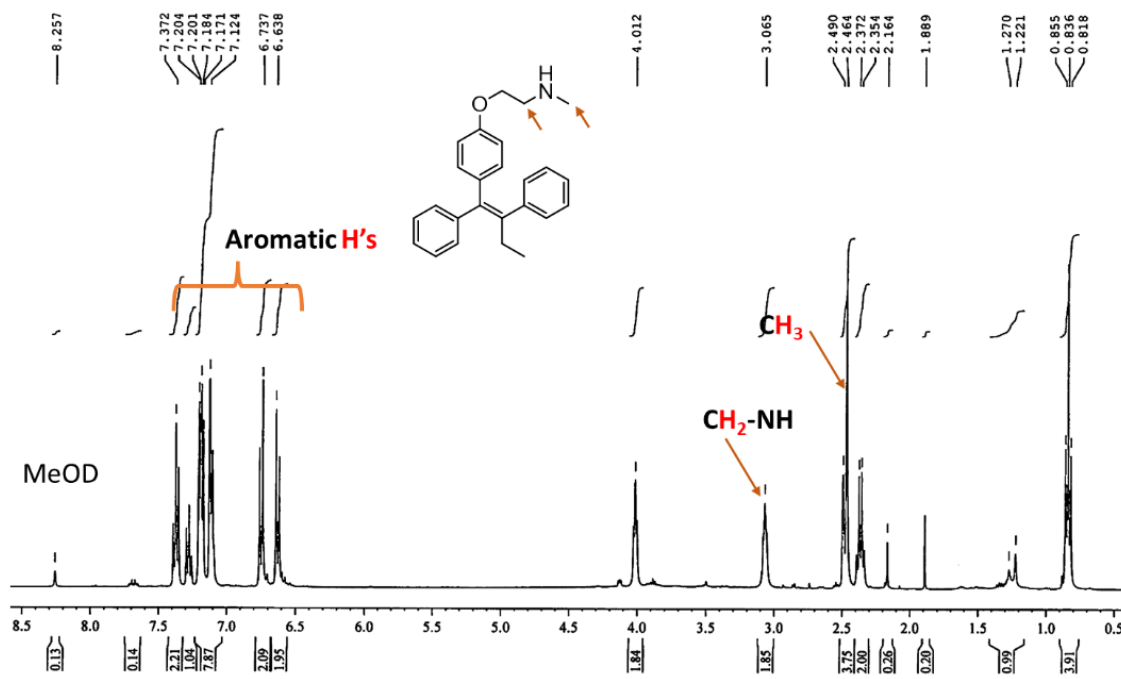
La integración máxima de protones de metilo también se redujo a 3 protones. Los picos intrínsecos multipletes entre  $6,5\text{ ppm}$  y  $7,4\text{ ppm}$  se atribuyen a grupos H aromáticos. Sin embargo, el pico de protones

del grupo -NH, que generalmente aparece como un singlete amplio en el ancho rango de 1 a 6 ppm, no apareció en el espectro. El valor real de la posición del pico depende en gran medida del solvente utilizado. Los protones -NH son ácidos y, por lo tanto, intercambiables con un solvente protónico como el CD<sub>3</sub>OD que se utilizó para preparar la muestra para el análisis. Por lo tanto, se espera que el protón -NH se intercambie con el deuterio y que el pico se reduzca (posiblemente ubicado en 2.1664 ppm) ya que el deuterio no aparece en la resonancia magnética nuclear de protones. Sin embargo, sería necesario realizar un análisis de intercambio de protones para confirmar la posición del pico de protones -NH.

En general, los desplazamientos de protones coinciden con informes previos y, por lo tanto, demuestran una síntesis exitosa (Dreaden et al., 2009; Nelson et al., 2012). El espectro de carbono en la Figura 38 (Anexo A), se observa el cambio en la posición del pico del grupo metilo (CH<sub>3</sub>) y el metileno (CH<sub>2</sub>) unido al N debido al cambio en el entorno químico. También se observa que la intensidad del pico de carbono correspondiente al grupo metilo disminuyó debido a la pérdida de un grupo metilo. Mientras que otros picos de carbono aromático se encontraron en una posición similar.



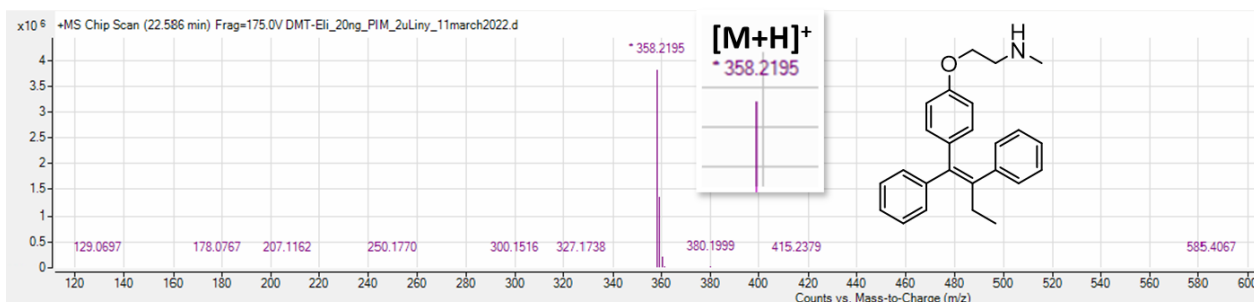
**Figura 14.** Espectro RMN de protones del tamoxifeno. Se ha resaltado H en rojo, ya que se muestra las posiciones máximas de los protones.



**Figura 15.** Espectro RMN de protones de TAMNH. Comparación del espectro del tamoxifeno y el producto desmetilado, TamNH, la reducción a 3 protones del grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) confirma la formación del producto. Se ha resaltado C en rojo, ya que se muestra las posiciones máximas del carbono.

### 3.1.3 Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)

En la Figura 16 se observa el espectro de HRMS de iones extraídos (EIC), donde el eje X representa la masa respecto a la carga ( $m/z$ ) y el eje Y representa la intensidad de la señal, el pico del producto se obtuvo en 358.2195, comparado con la masa teórica de la molécula de interés (357.50 g/mol), se pudo corroborar obtención exitosa de TAM-NH.



**Figura 16.** Espectro de masas de alta resolución del Tam-NH. El pico en 358.2195 corresponde a TAM-NH, con un peso molecular teórico de 357.50 g/mol.

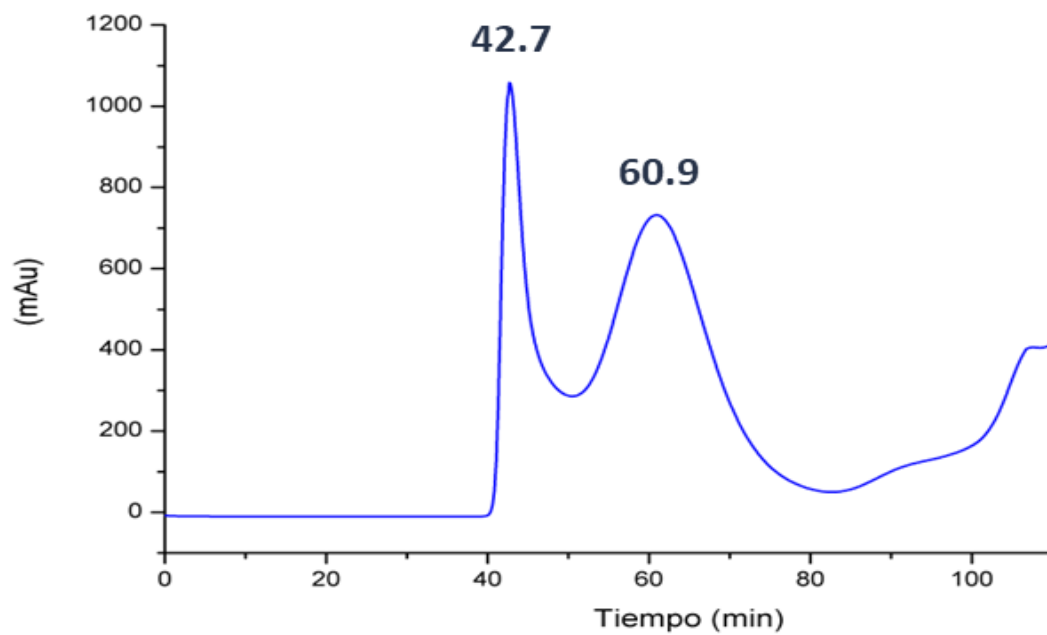


## 3.2 Caracterización de las cápsides virales P22CYP

### 3.2.1 Cromatografía líquida rápida de proteínas a alta velocidad (FPLC)

La purificación de las cápsides virales P22CYP se realizó por cromatografía de exclusión por tamaño. Los pellets bacterianos previamente almacenados se lisaron y la membrana celular se rompió mediante ultrasonido, liberando las proteínas. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se centrifugó en un cojín de sacarosa recolectando los pellets crudos conteniendo los nanorreactores P22CYP. El pellet se resuspendió en un buffer de PBS y se purificó mediante FPLC, en el cual la elución de las proteínas fue monitoreada a 280 nm. En la Figura 17, el perfil de elución de las fracciones se observan dos picos principales a los 42.7 min, correspondientes a las cápsides virales P22 aberrantes y 60.9 minutos que corresponden a las cápsides virales P22 ensambladas correctamente. Las fracciones obtenidas en el FPLC que corresponden al segundo pico fueron colectadas y concentradas por ultracentrifugación seguido de la resuspensión en un buffer de fosfatos.

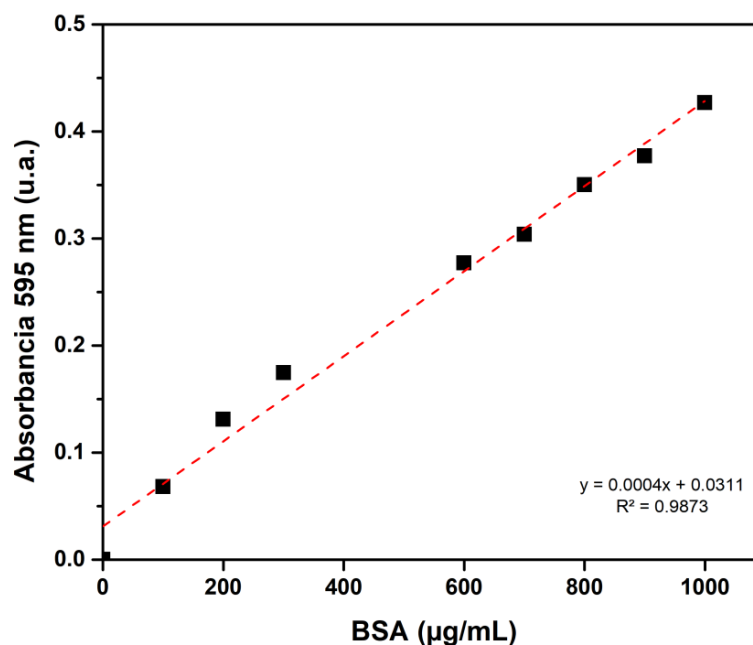
En trabajos previos, habían identificado dos picos correspondientes a las cápsides virales P22 no correctamente ensambladas (aberrantes) y las correctamente ensambladas (Chauhan et al., 2018; Pliego Sosa, 2020; Tapia-Moreno et al., 2017).



**Figura 17.** Perfil de elución de las cápsides virales P22CYP obtenidas mediante FPLC. Se observan dos picos principales a los 42.7 y 60.9 minutos.

### 3.2.2 Cuantificación de las cápsidas virales P22CYP

El ensayo de Quick Start Bradford en placa fue utilizado para cuantificar concentración de proteína del P22CYP obtenida del FPLC. La absorbancia se midió a 595 nm en diluciones 1:20, 1:30 y 1:40. Con la curva de calibración del BSA (Figura 18. Curva de calibración estándar del BSA.Figura 18) se estimó la concentración de las muestras mediante ( $R^2=0.987$ ).



**Figura 18.** Curva de calibración estándar del BSA.

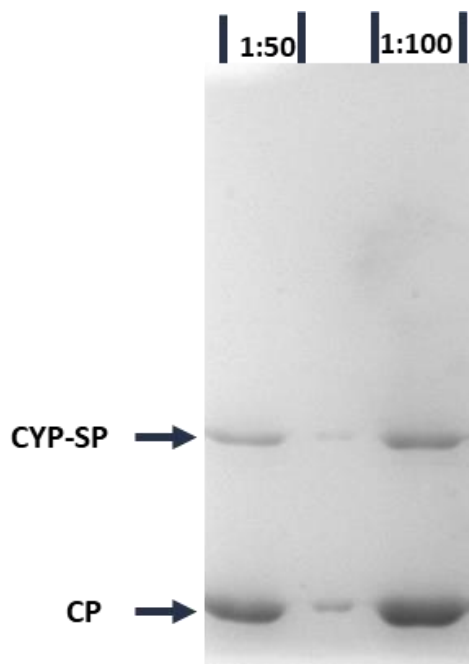
Entonces, en base a la curva de calibración y tomando en cuenta las diluciones, la concentración de la proteína obtenida se promedió (Tabla 1), y se obtuvo una concentración de 20.3 mg/mL.

**Tabla 1.** Concentración de P22CYP obtenida mediante el ensayo Bradford.

Concentración (mg/mL)
20.3 ±0.7

### 3.2.3 Análisis densitométrico de proteínas en gel SDS-PAGE

La pureza del P22CYP se verificó con electroforesis en gel SDS-PAGE y se utilizó el análisis densitométrico para cuantificar el número de proteínas de cubierta (CP) por proteína de andamiaje fusionada con CYP (CYP-SP) en las cápsides virales. Se analizaron en el gel dos concentraciones diferentes de las cápsides. en la Figura 19 se corrobora la exitosa purificación debido a que CP y CYP-CP son las únicas bandas presentes en el gel.



**Figura 19.** Gel SDS-PAGE al 12% con las muestras de cápsides virales P22 a diferentes diluciones.

Por reportes anteriores, se conoce que CP y CYP-SP tienen un peso molecular informado de 46.6 y 71.5 kDa respectivamente (Tapia-Moreno et al., 2017). Con esta información se utilizó el software ImageJ para obtener la relación del área de las bandas correspondientes de CP y CYP-SP y calcular el número de CYP-SP por proteínas CP (Tabla 2).

**Tabla 2.** Análisis densitométrico para calcular la relación CP y CYP-SP.

Relación CP:CYP-SP	±	Número de proteínas	±
2:1	0.11	420:214	12.02

La literatura señala que, el autoensamblaje de las cápsides de P22 requiere 420 proteínas de cubierta y alrededor de 100 a 300 proteínas de andamiaje (Wu et al., 2013). Para calcular el número de CP por CYP-SP, el número de CP se fijó en 420 y el número de CYP-SP se calculó asumiendo que el área de las proteínas en el gel es proporcional a su cantidad, es decir, en mg. Se obtuvieron cápsides P22 con 214 proteínas CYP-SP después de la purificación.

### 3.2.4 Molaridad de confinamiento y porcentaje de ocupación

Las ecuaciones (1) y (2) se utilizaron para calcular la molaridad de confinamiento y el porcentaje de ocupación de CYP dentro de la cápside, obteniendo las ecuaciones (3) y (4) respectivamente. De acuerdo con el análisis densitométrico SDS-PAGE, había 214 proteínas CYP-SP por cápside. En 2020 reportaron (Pliego Sosa, 2020) que el volumen interno obtenido a partir del análisis de distribución de tamaño TEM, donde el diámetro interno medio fue de 47.3 nm es equivalente a un volumen de 55,400 nm<sup>3</sup>.

La molaridad de confinamiento estimada de CYP en la cápside viral fue de 6.4 mM.

$$M = \frac{(\text{Enzimas}_{\text{por cápside}})}{(V_{\text{int}})(N_A)} = \frac{(214)}{(55400)(N_A)} = 6.4 \text{ mM} \quad (3)$$

Con trabajos anteriores del grupo de investigación del Dr. Vazquez-Duhalt, el porcentaje de ocupación se calculó utilizando 3.3 nm como radio hidrodinámico del CYP, obteniendo un volumen de enzima de 150 nm<sup>3</sup>.

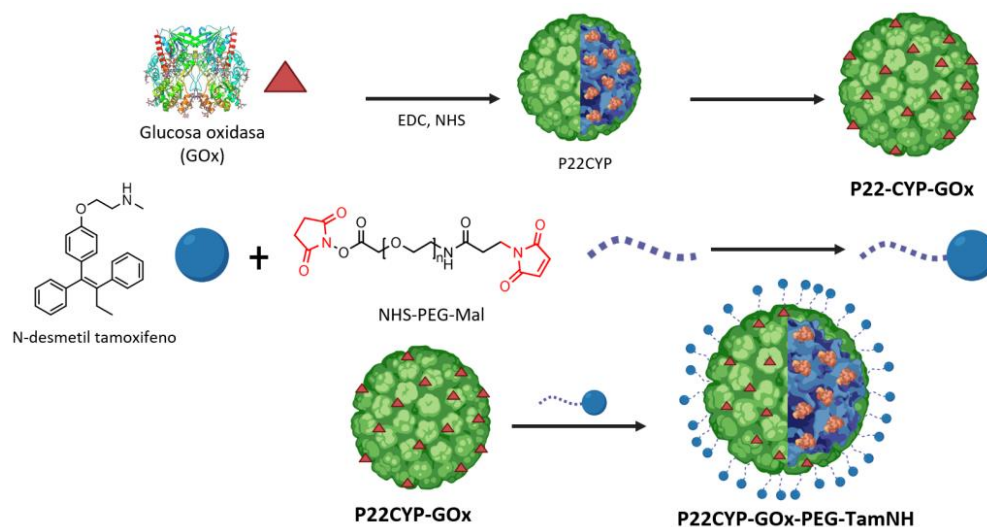
Con este volumen de CYP, la ocupación obtenida fue del 58 %.

$$\% \text{ ocupación} = \frac{(\text{Enzimas}_{\text{por cápside}})(V_{\text{enz}})}{(V_{\text{int}})} = \frac{(214)(150 \text{ nm}^3)(100)}{(55400 \text{ nm}^3)} = 58\% \quad (4)$$

## 3.3 Multifuncionalización y caracterización de los nanorreactores P22.

La estrategia de la funcionalización se observa esquema de la Figura 20, donde se utilizó el bacteriófago P22, encapsulando una peroxigenasa CYP<sub>BM3</sub>21B3 mejorada y funcionalizado con la glucosa oxidasa en la

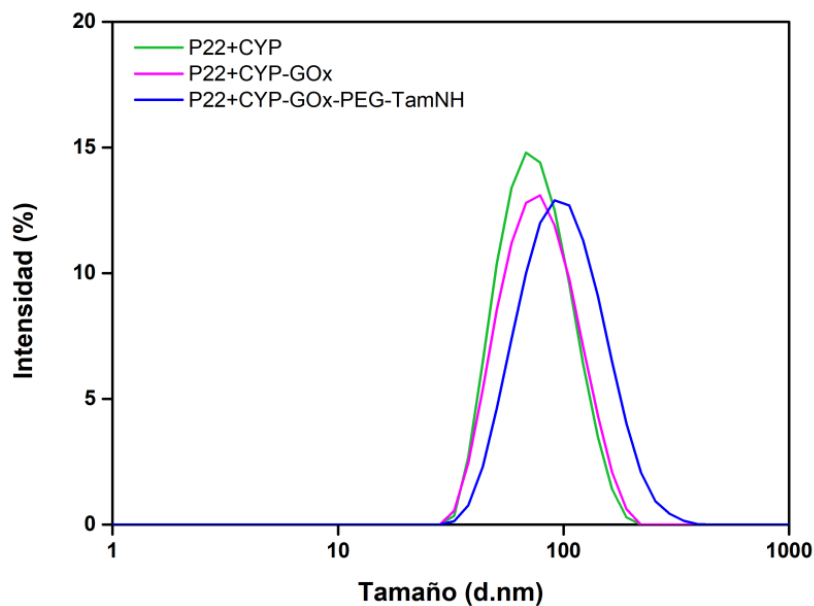
superficie de la cápside junto con un derivado de tamoxifeno modificado químicamente utilizando polietilenglicol como conector.



**Figura 20.** Diagrama esquemático de la multifuncionalización de los nanocompositos.

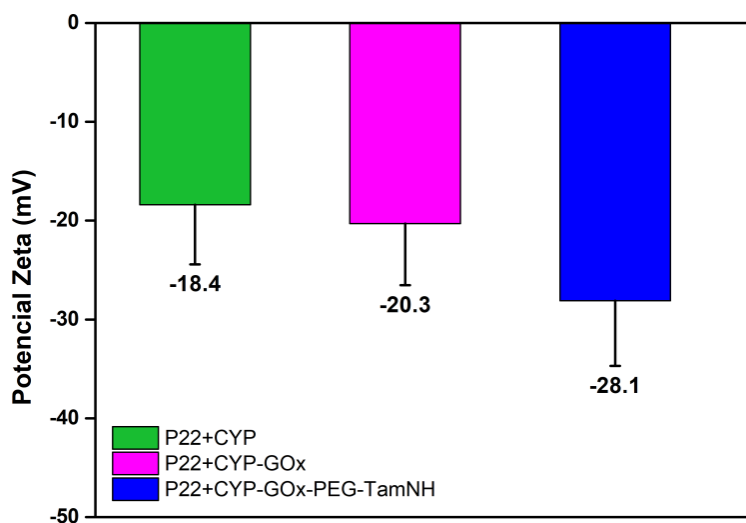
### 3.3.1 Dispersión de luz dinámica (DLS)

La distribución de tamaño de los NRs en agua desionizada se midió mediante dispersión dinámica de luz después de cada paso de funcionalización (Figura 21). En la distribución de intensidad de tamaño de los NRs se observa un aumento en el diámetro hidrodinámico de P22CYP era de 74.15 nm ( $\pm 18.35$ ), que aumentó con la funcionalización de la GOx a 81.64 nm ( $\pm 19.91$ ) y mientras que P22CYP-GOx-PEG-TamNH, el tamaño al funcionalizar con PEG-TamNH que era 94.71 nm ( $\pm 17.19$ ).



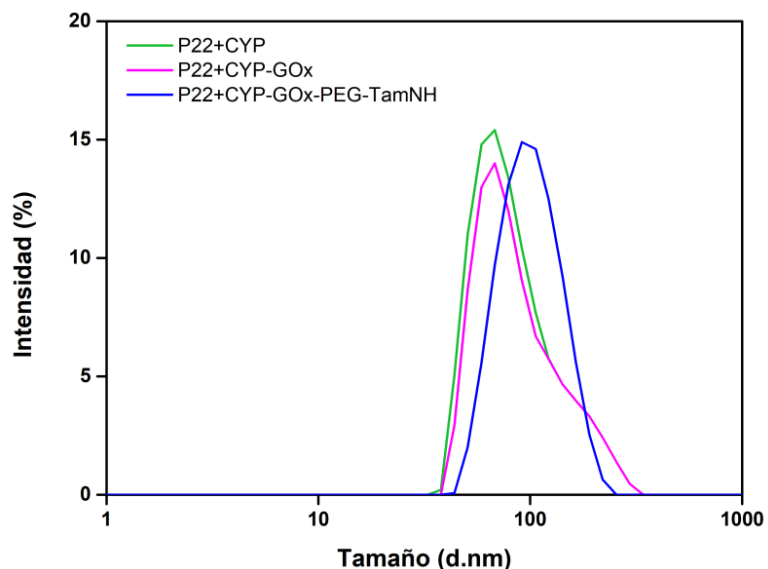
**Figura 21.** Distribución de tamaño de los NRs funcionalizados mediante el análisis de DLS. El diámetro hidrodinámico medio tiende a aumentar después de cada funcionalización.

Por otro lado, en la Figura 22 el potencial zeta muestra un aumento significativo en la carga negativa de la superficie de P22CYP ( $-18.4 \pm 9.2$  mV) a P22CYP-GOx ( $-20.3 \pm 8.43$ ) y de estos nanorreactores a la PEGilación de P22CYP-GOx-PEG-TamNH ( $-27.6 \pm 6.14$ ). La diferencia de potencial en los valores de la carga superficial representa una unión exitosa de los nanorreactores P22CYP-GOx a PEG-TamNH (Figura 22).



**Figura 22.** Variación de la carga superficial de los nanorreactores funcionalizados mediante potencial zeta.

Para comprobar la estabilidad de las NRs después de la funcionalización, se realizó un segundo análisis de DLS un mes después para comparar los resultados con los obtenidos inicialmente. Implica medir la distribución del tamaño (Figura 23).



**Figura 23.** Estabilidad de la distribución de tamaño de los NRs funcionalizados mediante el análisis de DLS un mes después de la multifuncionalización.

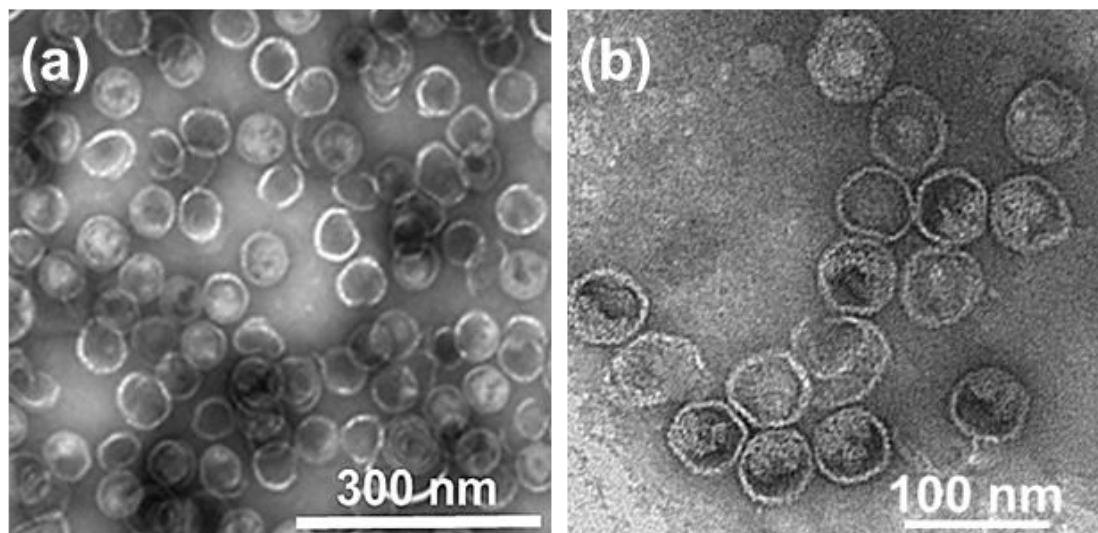
Este enfoque permitió evaluar los cambios en la distribución de tamaños y el potencial zeta, en el cual se almacenaron los NRs a 4°C. En la Tabla 3 se compara los datos obtenidos del análisis un mes después, en la distribución de tamaño P22CYP tiene una diferencia de 5.31 nm, en P22CYP-GOx tiene 3.7 nm y P22CYP-GOx-PEG-TamNH tiene 9.29 nm de diferencia. Los resultados indican que los NRs conservan su integridad sin demostrar señales de degradación, lo que destaca una excelente estabilidad de almacenamiento a una temperatura de 4°C y pH 7.4.

**Tabla 3.** Estabilidad de los NRs mediante DLS después de un mes de la funcionalización.

Muestra	Diámetro (nm)	
	Funcionalización	1 mes después
P22CYP-GOx-PEG-TamNH	94.71 ± 17.2	104 ± 14.2
P22CYP-GOx	81.64 ± 19.9	85.34 ± 21.6
P22CYP	74.15 ± 18.3	79.46 ± 17.4

### 3.3.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La morfología de los nanorreactores P22CYP-GOx y nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH se analizaron mediante TEM (Figura 24) operada a 200 kV.



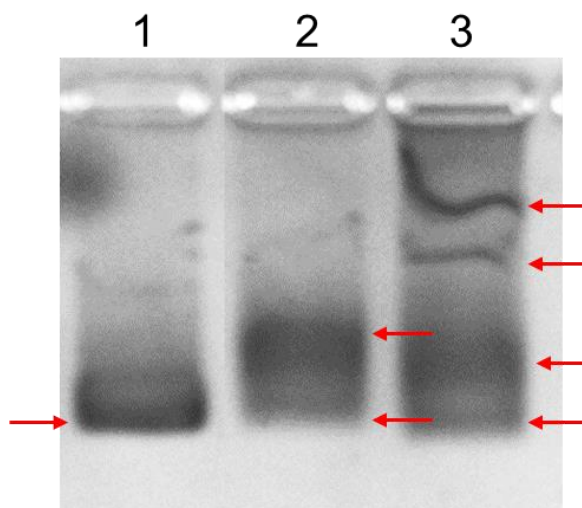
**Figura 24.** Micrografías TEM. a) Nanorreactores P22CYP-GOx y b) nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH.

Los análisis TEM mostraron que después de la funcionalización con PEG-TamNH mantienen su forma cuasiesférica y bien estructurada (Figura 24 (b)), que es consistente en reportes anteriores cuando utilizan el PEG como conector (Chauhan et al., 2018; Tapia-Moreno et al., 2017).

### 3.3.3 Gel de agarosa

El PEG (NHS-PEG4-Mal) es un polímero altamente hidrófilo con carga neutra que no es tóxico (peso molecular de 513 Da) y está aprobado por la FDA. La formación del nanocompósito P22CYP-GOx-PEG-TamNH se confirmó mediante un gel de agarosa, dado que el recubrimiento de ligando cambia la movilidad de los nanocompositos. La electroforesis en gel es un método eficaz para estudiar la química y la movilidad de la superficie de las nanopartículas y se ha demostrado que es una técnica altamente sensible para distinguir la unión de PEG en la superficie de los NRs. Sin embargo, no existe ningún método no destructivo para cuantificar la densidad del ligando de PEG en las superficies de los nanomateriales (Liu et al., 2015). En la Figura 25 se puede observar la migración entre cada nanorreactor es diferente debido al cambio de cargas y al aumento del tamaño molecular de los complejos, estos comportamientos han sido reportados anteriormente por (Chen et al., 2007).





**Figura 25.** Análisis de movilidad electroforética de los nanorreactores P22CYP (1), P22CYP-GOx (2) y los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH (3).

Aunque no se evidencian diferencias significativas en la electroforesis en el gel nativo, es posible observar la densidad de las bandas. Esta densidad es mayor en los nanorreactores P22CYP en comparación con los nanocompositos, lo que sugiere que la migración más lenta podría deberse al aumento del peso molecular. Comparando con el P22CYP, se aprecia una banda difuminada, y en los P22CYP-GOx, la migración es ligeramente más lenta. En el caso de P22CYP-GOx-PEG-TamNH, se observan múltiples bandas en la parte superior, lo cual se atribuye al cambio en el peso molecular o a la agregación de las VLPs debido a la estrategia de reticulación.

### 3.3.4 Espectroscopia UV-VIS

La reacción de PEG-TamNH utilizada para la multifuncionalización de los NRs fue tomada como base para determinar la cantidad de Tam-NH que tiene la superficie de los nanocompositos. Se analizó el espectro de esta reacción y se observó un pico fuerte en la longitud de onda máxima de 265 nm. Por lo tanto, se utilizó esa longitud de onda para tomar las absorbancias respectivas de cada muestra. En la Figura 26 podemos observar el espectro de las muestras de PEG-TamNH y el sobrenadante obtenido después de la funcionalización, a un rango de longitud de onda de 240-360 nm. Las absorbancias a 265 nm (línea punteada) de la reacción PEG-TamNH fue de 0.56973 y del sobrenadante fue de 0.3403.

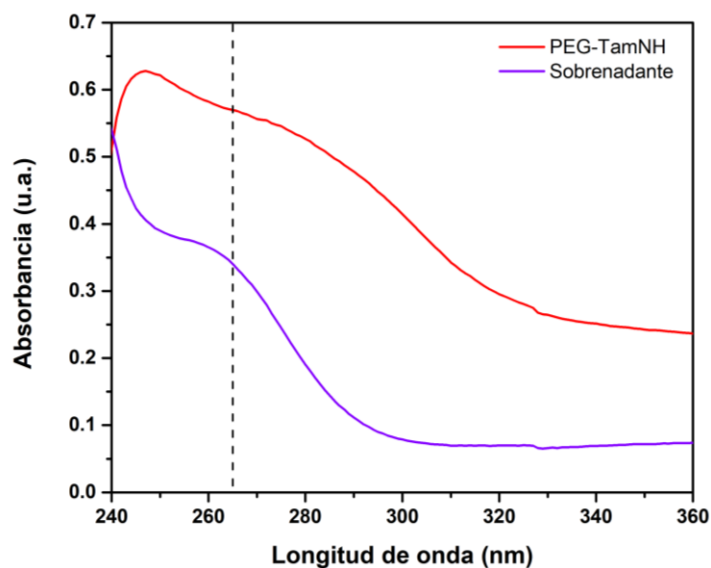


Figura 26. Espectro UV-VIS del PEG-TamNH (reacción) y el sobrenadante.

Con esto en cuenta, se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de la reacción de PEG-TamNH (23, 5.75, 2.875, 1.43  $\mu\text{g}$ ), tomando los datos de la absorbancia a una longitud de onda de 265 nm de todas las concentraciones y del sobrenadante (Figura 27). La absorbancia obtenida del sobrenadante fue de 0.3403.

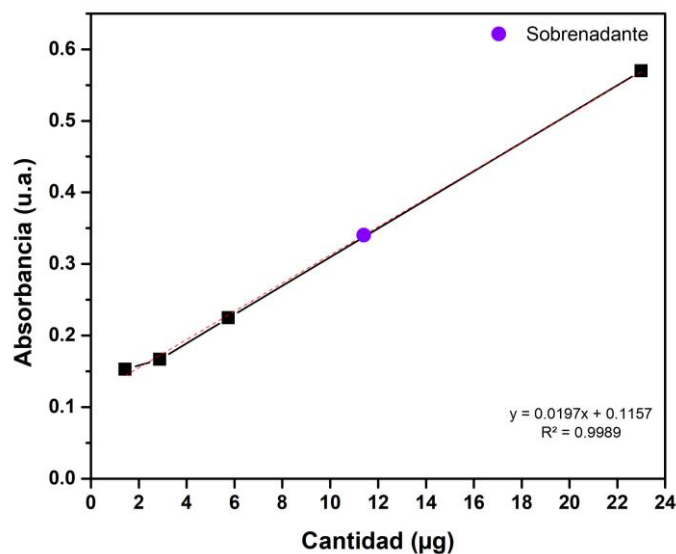


Figura 27. Curva de calibración del PEG-TamNH mediante UV-VIS.

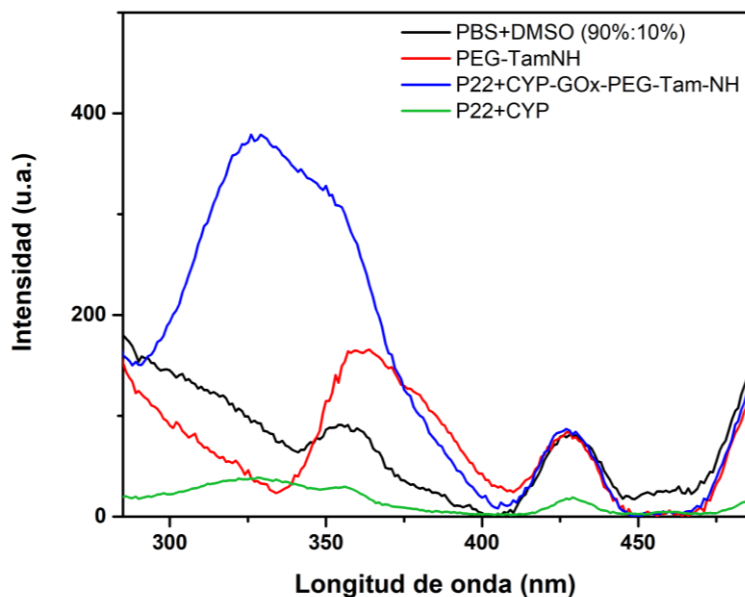
Con los datos obtenidos, en la Tabla 4 se muestra que el sobrenadante tiene una cantidad de 11.4  $\mu\text{g}$  de PEG-TamNH lo que corresponde al 49%, lo que se infiere que el resto corresponde a la multifuncionalización.

**Tabla 4.** Cantidad ( $\mu\text{g}$ ) de PEG-TamNH.

Muestra (2.5 mL)	Cantidad ( $\mu\text{g}$ )	Porcentaje (%)
PEG-TamNH (Reacción)	23	100
P22CYP-GOx-PEG-TamNH (Sobrenadante)	11.4	49.6
P22CYP-GOx-PEG-TamNH (Nanocompositos)	11.6	50.4

### 3.3.5 Espectroscopia de fluorescencia

La estabilidad del conjugado fármaco-polímero se verificó mediante fluorescencia, se utilizó la excitación del tamoxifeno a  $\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}}$  de 300 a 450 nm para obtener los espectros de fluorescencia. La Figura 28 muestra que la intensidad de fluorescencia de los nanocompositos aumenta drásticamente a comparación del P22CYP. Como nanoconjugado, la emisión del tamoxifeno mostró un cambio hacia el azul con una emisión mejorada a una concentración similar en comparación con el control (PEG-TamNH). De esta forma comprobamos que el tamoxifeno está en forma de conjugación y no libre. Anteriormente, se observó un comportamiento similar, en el cual el fluoróforo después de unirse a la proteína mostró un desplazamiento hacia el azul en el espectro de emisión (Chauhan et al., 2018).



**Figura 28.** Espectros de emisión de fluorescencia de PEG-TamNH (Reacción) y P22CYP-GOx-PEG-TamNH (nanocompositos) en la solución PBS+DMSO (90%:10%) y como referencia el P22CYP.

### 3.4 Ensayos de la actividad enzimática de los nanoreactores

El comportamiento de la cinética enzimática fue ajustado por la ecuación de Hill (5).

$$V = \frac{V_{max}[S]^n}{K' + [S]^n} \quad (5)$$

Donde  $v$  es la velocidad inicial de la reacción enzimática;  $V_{max}$  es velocidad máxima alcanzada cuando la enzima está saturada con sustrato;  $[S]$  es la concentración del sustrato;  $K'$  es la constante de afinidad y  $n$ = factor de Hill, que indica la cooperatividad de la enzima ( $n > 1$ : cooperatividad, positiva,  $n < 1$ : cooperatividad negativa,  $n=1$ : la ecuación de Hill se reduce a la ecuación de Michaelis-Menten) (Papamichael et al., 2019; Somvanshi y Venkatesh, 2013). En  $V_{max}$ , U representa la unidad enzimática, definida como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto.

#### 3.4.1 Actividad enzimática del citocromo P450

La cinética enzimática de los nanorreactores P22 fue evaluada mediante la actividad CYP, en el cual se variaron las concentraciones de DMP y al mismo tiempo se mantenía constante la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Los datos obtenidos se trataron en Excel para ajustar la ecuación de Hill (5) y calcular las constantes cinéticas (Tabla 5).

**Tabla 5.** Constantes cinéticas del CYP en nanorreactores P22CYP

Muestra	$V_{max}$ (mU/mg)	$K'$ (mM)	n
P22CYP	18.56	2.17	2.2

Finalmente, se analizó la actividad catalítica de las VLPs después de la modificación química, se determinó la actividad catalítica específica de CYP de P22CYP-GOx fue ~40.37 % de las nanopartículas P22CYP, mientras que las partículas PEGiladas, P22CYP-GOx-PEG-TamNH, mostraron ~72.85 % (Tabla 6).

**Tabla 6.** Actividad específica del CYP después de cada funcionalización.

Muestra	(mU/mg)	Actividad retenida (%)
P22CYP	19.3	100
P22CYP-GOx-PEG-TamNH	14.05	72.8

### 3.4.2 Actividad enzimática de la glucosa oxidasa (GOx)

La funcionalización con GOx fue corroborada mediante el ensayo de actividad enzimática GOx, se determinó la actividad catalítica de las VLPs después de la funcionalización, en el cual P22CYP-GOx fue ~6% de enzima libre GOx, y las PEGiladas, P22CYP-GOx-PEG-TamNH, mostraron ~8 %. (Tabla 7).

**Tabla 7.** Actividad específica de GOx después de cada funcionalización.

Muestra	(mU/mg)	Actividad retenida (%)
GOx	16.54	100
P22CYP-GOx	0.98	5.9
P22CYP-GOx-PEG-TamNH	1.3	7.8

### 3.4.3 Actividad enzimática combinada de CYP-GOx

La cinética enzimática combinada de los nanorreactores P22 fue evaluada mediante la transformación de DMP mediante la reacción en cascada mediada por glucosa (sustrato), en el cual se utilizaron diferentes concentraciones de glucosa y al mismo tiempo se mantenía constante la concentración de DMP. Esta actividad enzimática combinada es la más importante, ya que uno de los objetivos es lograr una reacción en cascada entre GOx y CYP mediada por la glucosa que se encuentra en exceso en los sitios de cáncer. Por lo tanto, se puede lograr una transformación del profármaco sensible al microambiente tumoral. Los datos obtenidos se trataron en Excel para ajustar la ecuación de Hill (5) y calcular las constantes cinéticas (Tabla 8). Los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH demostraron una velocidad máxima de 2.67 mU/mg siendo capaces de tener una cooperatividad positiva convirtiendo las moléculas de sustrato por minuto.

**Tabla 8.** Constantes cinéticas para la transformación de DMP.

Muestra	Vmax (mU/mg)	K' (mM)	n
P22CYP-GOx-PEG-TamNH	2.67	3.25	1.82

También se analizó la actividad catalítica de las VLPs y se determinó la actividad catalítica específica de mediante la transformación de DMP mediante la reacción en cascada mediada por glucosa de las PEGiladas P22CYP-GOx-PEG-TamNH fue ~91.24 % de las nanopartículas P22CYP-GOx (Tabla 9).

**Tabla 9.** Actividad combinada específica por la transformación del DMP en la reacción de cascada mediada por glucosa.

Muestra	(mU/mg)	Actividad retenida (%)
P22CYP-GOx	0.51	100
P22CYP-GOx-PEG-TamNH	0.46	91.2

Los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH muestran una actividad específica menor a los nanorreactores P22CYP-GOx, esto se puede atribuir a que la disminución de la actividad podría ser debido a que el recubrimiento ocasionado por las cadenas de PEG sobre la superficie de la cápsida, que impiden o hacen más complicado la difusión del sustrato y reduciendo la actividad catalítica (Tapia-Moreno, 2015).

Por otro lado, las células de cáncer de mama humano MCF-7, en ausencia de suministro de glucosa, tienen niveles de glucosa intracelular de  $2.69 \pm 1.47$  mM, y algunas de ellas pueden alcanzar concentraciones de

7.11 mM (Nascimento et al., 2016). Es ampliamente conocido que el tumor canceroso requiere concentraciones más altas para proliferar. A estas altas concentraciones de glucosa (>5.5 mM), los nanocompositos muestran una actividad específica combinada similar que los nanorreactores P22CYP-GOx.

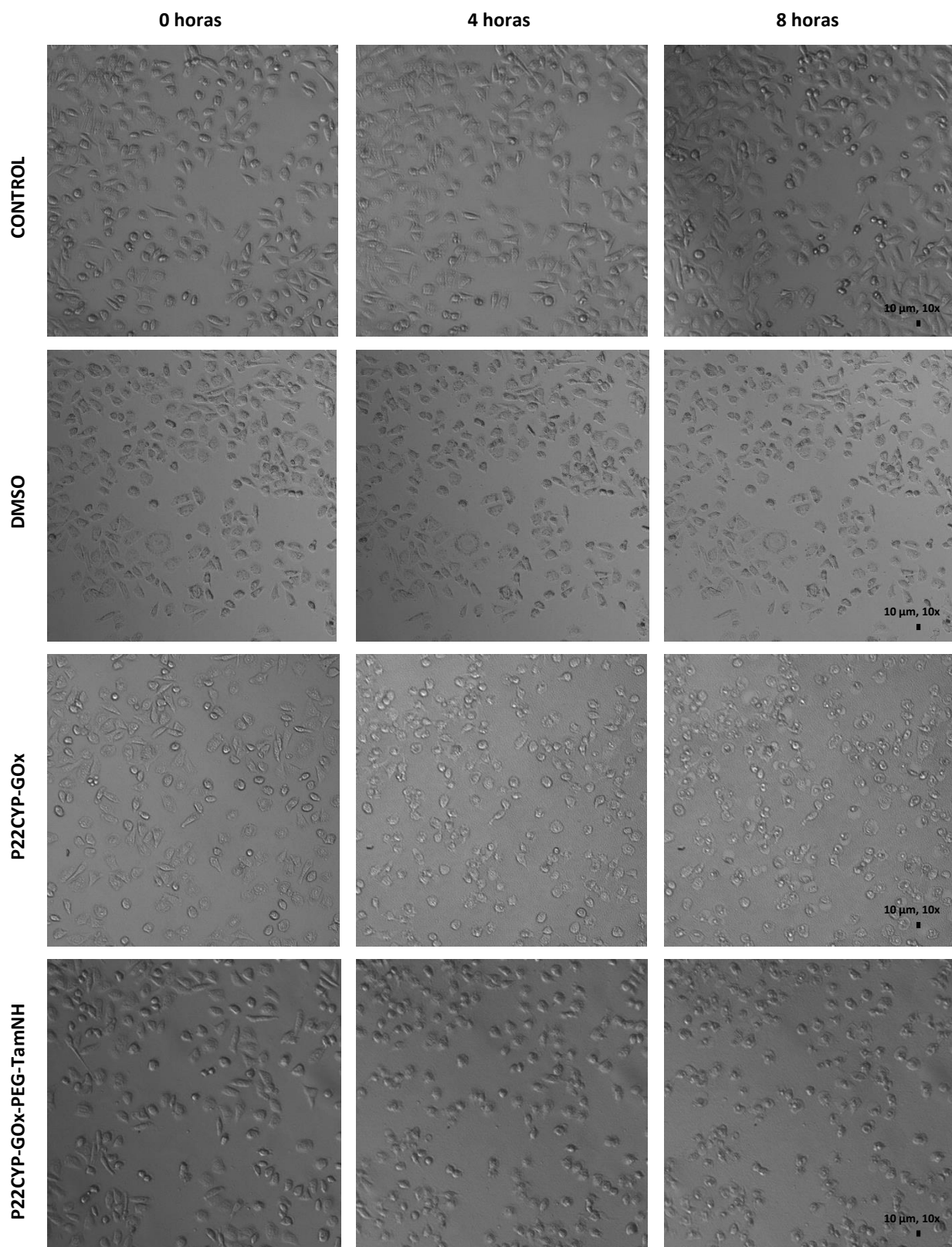
### **3.5 Ensayo *in vitro* para la internalización selectiva en líneas celulares**

#### **3.5.1 Establecimiento de protocolo**

Dado que GOx produce estrés oxidativo en las células en presencia de glucosa, lo que causa toxicidad celular, el efecto de las VLPs dirigidas y no dirigidas se determinó en ausencia de glucosa en el medio de cultivo celular. L

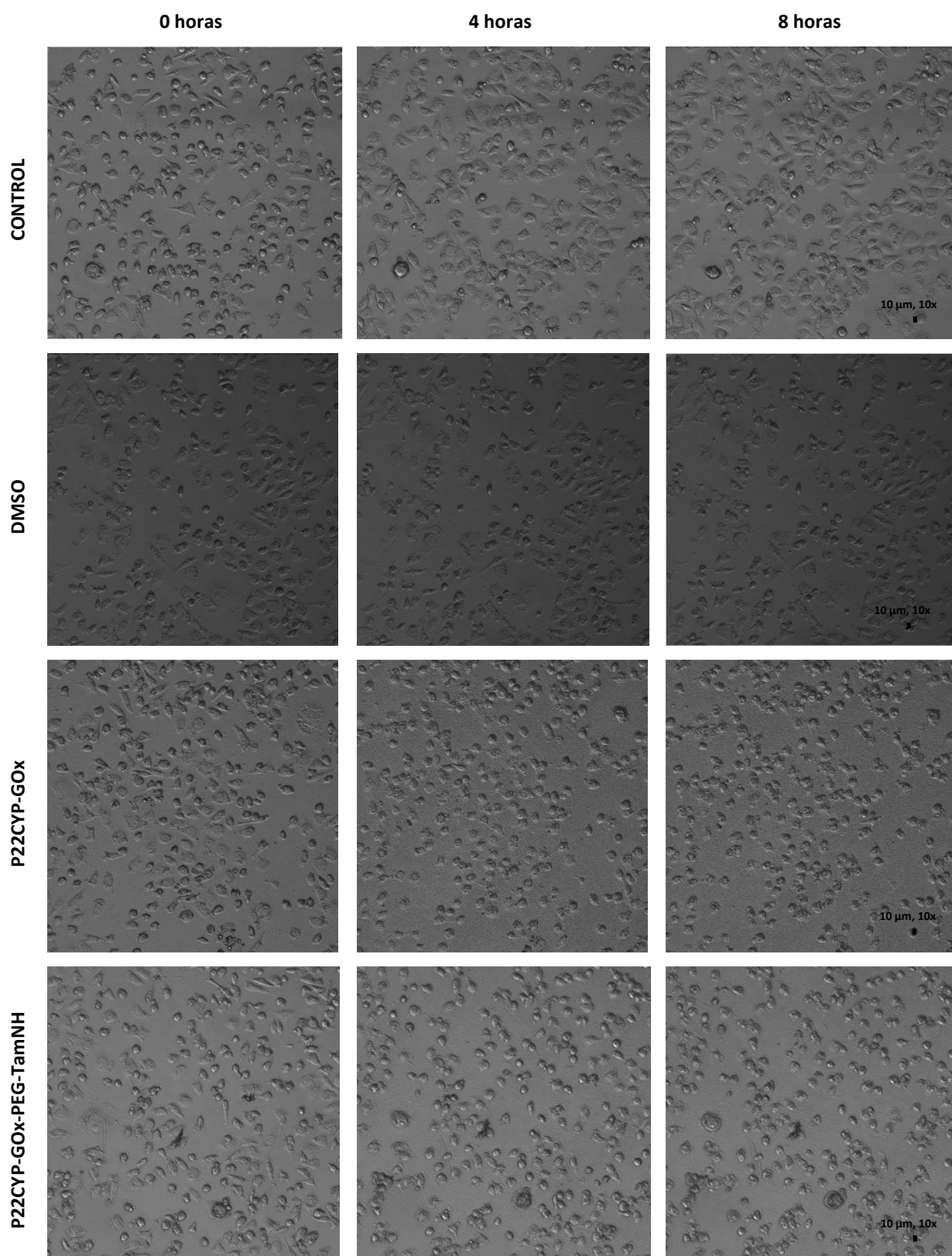
as células fueron incubadas con el tratamiento durante 24 horas siendo monitoreadas por el microscopio acoplado a la incubadora. Se obtuvieron los fotogramas mediante el software Lumaview, en el cual se tomaron las horas representativas de las células expuestas al tratamiento (Anexo B). Las imágenes se obtuvieron con el objetivo 10X. El objetivo de este estudio fue analizar el tiempo máximo de supervivencia celular en ausencia de glucosa junto con los tratamientos y respectivos controles. Las células mostraron una pérdida significativa de viabilidad después de 12 horas y murieron por completo después de 18 horas.

En la Figura 29 se muestra las imágenes de células MCF-7 y el efecto de los tratamientos a diferentes tiempos de exposición con los 3 tiempos más significativos. Por otro lado, en la Figura 30 también se muestra las imágenes de la exposición de los tratamientos en las células MDA-MB-231.



**Figura 29.** Comparación del tiempo de exposición de los tratamientos en células MCF-7 a 0, 4 y 8 horas de incubación en ausencia de glucosa. La barra de escala representa 10  $\mu\text{m}$ .





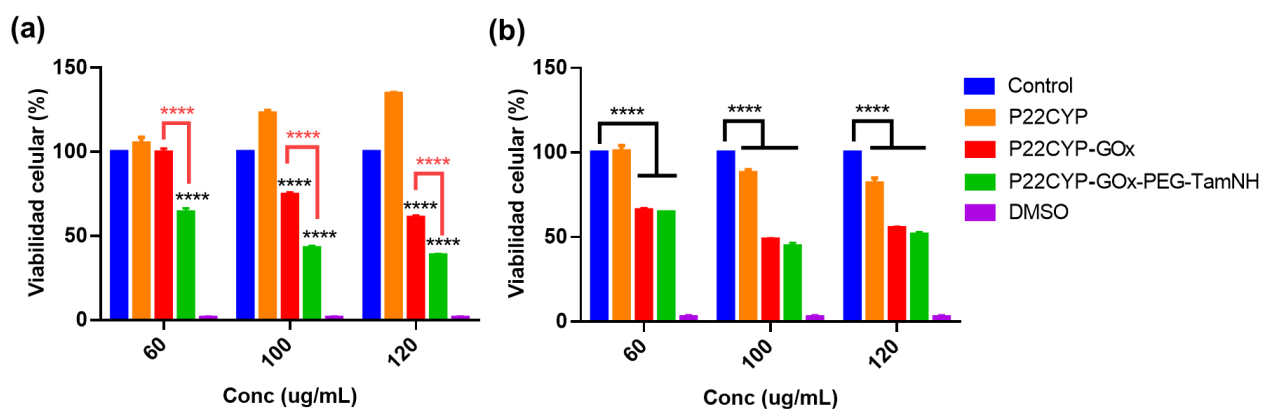
**Figura 30.** Comparación del tiempo de exposición de los tratamientos en células MDA-MB-231 a 0, 4 y 8 horas de incubación en ausencia de glucosa. La barra de escala representa 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.6 Ensayos de viabilidad celular en presencia de los nanorreactores P22

#### 3.6.1 Ensayo MTT

Para determinar los efectos en la viabilidad de las líneas celulares MCF-7 (estrógeno dependiente) y MDA-MB-231 (estrógeno independiente) tratadas con diferentes concentraciones de NRs y también con diferentes medios DMEM para comparar su comportamiento con y sin glucosa. Los ensayos se realizaron en tres réplicas independientes.

Los resultados se expresan como el porcentaje de supervivencia celular respecto al control sin tratar, que representa el 100% y DMSO como el control de muerte celular. La especificidad de los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH para unirse a las células MCF-7 (ER+) se determinó mediante 3 diferentes concentraciones (120,100 y 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y 2 tiempos de incubación (4 y 8 horas). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 31.



**Figura 31.** Viabilidad celular de la línea celular MCF-7 en medio sin glucosa expuestas con diferentes concentraciones de NRs. A) Incubación por 4 horas. B) Incubación por 8 horas. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD (n = 3). \*\*\*\*p < 0,0001 utilizando un ANOVA de dos factores con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Se analizó la toxicidad dependiente de las concentraciones de los NRs en ambas líneas celulares. En la

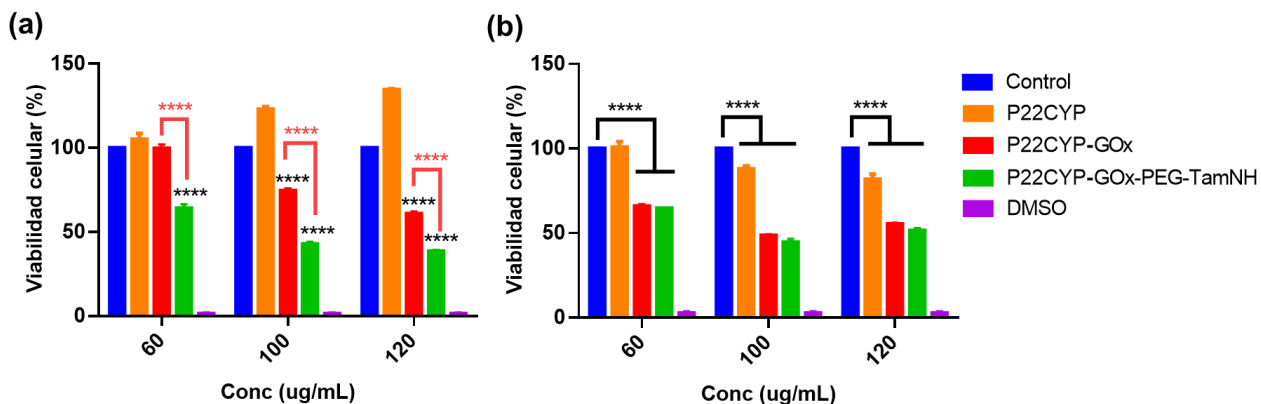
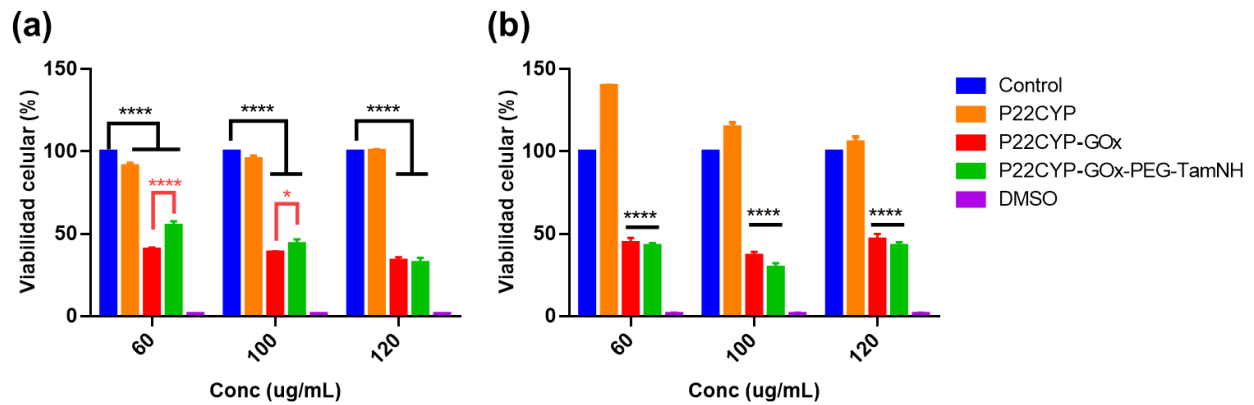


Figura 31, P22CYP (A) mostraron una viabilidad celular de ~108-134%, y a las 8 horas de incubación (B), no muestran una gran diferencia en la viabilidad celular por 8 horas de incubación, 81-98%.

Sin embargo, los nanorreactores P22CYP-GOx muestran una disminución de la viabilidad celular en las 3 concentraciones con respecto al tiempo (A y B), en 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ~60 a ~55%, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ~73 a ~48% y 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ~98 a ~65%. En el caso de los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH (A y B) el porcentaje de las células viables de 4 y 8 horas de incubación fue de 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ~38 y ~52% (respectivamente), 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ~42 y ~46% y 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ~66 y ~69%, este grado de citotoxicidad similar es debido a la especificidad dada desde el tiempo de incubación de 4 horas sin cambios significativos al tiempo de incubación de 8 horas. De manera interesante, las VLPs dirigidas (P22CYP-GOx-PEG-TamNH) mostraron una mayor internalización celular causando una toxicidad mayor comparada con las VLPs no dirigidas (P22CYP-GOx) a las 4 horas, mientras que en la incubación prolongada el grado de toxicidad fue similar en ambos casos. Por otra parte, para tener un punto de comparación de evaluar la especificidad de los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH se utilizaron las células MDA-MB-231 (ER-) con las mismas condiciones y parámetros, los resultados son presentados en la Figura 32.



**Figura 32.** Viabilidad celular de la línea celular MDA-MB-231 en medio sin glucosa expuestas con diferentes concentraciones de NRs. A) Incubación por 4 horas. B) Incubación por 8 horas. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*\*\*\* $p < 0,0001$  utilizando un ANOVA de dos factores con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

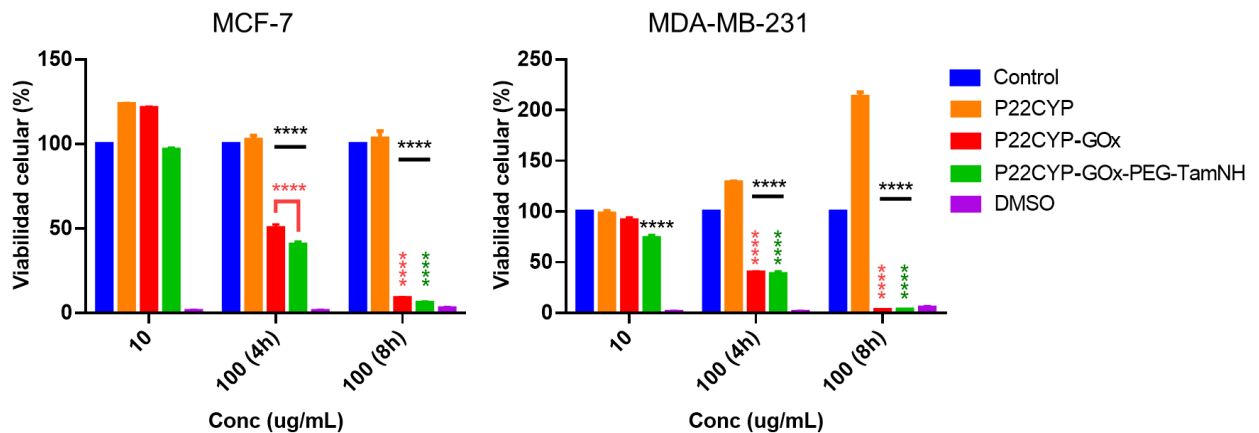
En la Figura 32, a las 4 y 8 horas de incubación (A), los nanorreactores P22CYP presentan una viabilidad celular de  $\sim 100$  y  $\sim 105\%$  de  $120 \mu\text{g/mL}$  (respectivamente), en  $100 \mu\text{g/mL}$  de  $\sim 96$  y  $114\%$ , y  $60 \mu\text{g/mL}$   $\sim 92$  y  $\sim 139\%$ , la viabilidad se mantiene alrededor del  $100\%$ , no obstante, parece tener un aumento en la viabilidad al incrementar el tiempo de exposición del tratamiento en las células, sin embargo, las concentraciones se mantienen por arriba del control a las 8 horas de incubación.

En los nanorreactores P22CYP-GOx se observa una tendencia a disminuir la viabilidad celular conforme aumenta la concentración a las 4 horas de incubación (A), y con respecto al tiempo de 4 a 8 horas de incubación (A y B) no se observa una diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad celular, de  $120 \mu\text{g/mL}$   $\sim 33$  a  $46\%$ , de  $100 \mu\text{g/mL}$   $\sim 39$  y  $36\%$  y de  $60 \mu\text{g/mL}$   $\sim 41$  y  $\sim 47\%$ , tienen una diferencia de  $\sim 13\%$ ,  $\sim 3\%$ ,  $\sim 6\%$ , respectivamente. Con respecto a los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH al igual que los nanorreactores P22CYP-GOx, también a las 4 horas de incubación (A) presentan una tendencia de disminución en la viabilidad celular a medida que la concentración aumenta; por otro lado se aprecia una variación significativa en la viabilidad celular a comparación de los nanorreactores P22CYP-GOx, esto en relación al periodo de incubación, de 4 a 8 horas de incubación (A y B, azul), en  $120 \mu\text{g/mL}$  de  $\sim 35$  a  $\sim 43\%$ ,  $100 \mu\text{g/mL}$  de  $\sim 43$  a  $\sim 29\%$  y  $60 \mu\text{g/mL}$   $\sim 53$  a  $\sim 42\%$ , tienen una diferencia de  $\sim 8\%$ ,  $\sim 14\%$ ,  $\sim 11\%$ , respectivamente.

En resultados anteriores se ha corroborado que estos nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH responden a la glucosa y que podrían tener la capacidad de activar la transformación del profármaco a través del CYP en condiciones del nivel de glucosa del TME. Es por ello que, se realizó el ensayo de MTT en

condiciones normales (es decir, con glucosa), para observar el comportamiento de la viabilidad celular ya que debido a la naturaleza agresiva de la GOx en un medio que contiene glucosa, no se puede lograr observar ninguna diferencia en la acción de las VLPs dirigidas y no dirigidas.

En la Figura 33, se muestra el ensayo de viabilidad celular, debido a ensayos anteriores se variaron las concentraciones de los NRs (100 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con un tiempo de incubación de 4 horas y solo la concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se evaluó durante 8 horas de incubación.



**Figura 33.** Viabilidad celular de ambas líneas celulares en medio con glucosa expuestas con diferentes concentraciones de nanorreactores. A) MCF-7. B) MDA-MB-231. El tiempo de incubación a 8 horas es resaltado con el patrón de relleno de líneas en las barras. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*\*\*\* $p < 0,0001$  utilizando un ANOVA de dos factores con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Los resultados obtenidos de los nanorreactores P22CYP demuestran que no causan algún efecto en la viabilidad celular en ambas líneas celulares (A y B) y además hay un aumento a  $\sim 217\%$  en la viabilidad celular en la concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en 8 horas de incubación. No hay una toxicidad dependiente de las concentraciones ni del tiempo de incubación de los NRs ya que las células proliferaron de un  $\sim 98$  a  $\sim 217\%$  con respecto al control. Esto se entiende ya que en este caso no hay tamoxifeno (citotóxico) en el medio y ni se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) por la ausencia de GOx.

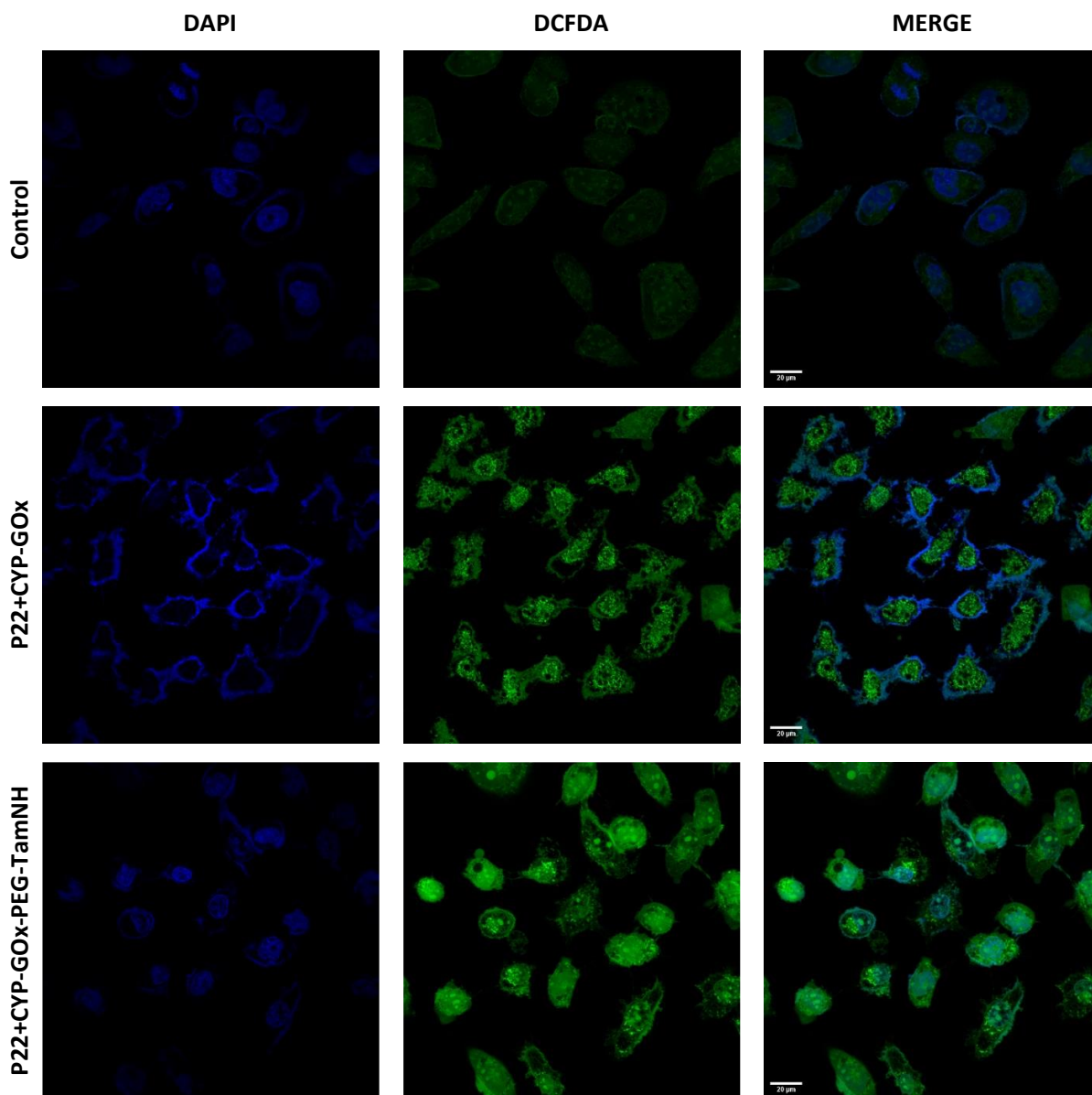
Cabe resaltar que tanto los nanorreactores P22CYP-GOx y los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH en ambas líneas celulares exhiben una tendencia de la disminución significativa en la viabilidad celular a medida que la concentración aumenta y además que por un tiempo más prolongado de 8 horas de incubación es del  $\sim 2-8\%$  en la viabilidad celular. Los nanorreactores P22CYP-GOx la comparación del

porcentaje de viabilidad celular entre cada línea celular (A y B) en el tiempo de incubación de 4 horas fue de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\sim 48$  a  $\sim 39\%$ , y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\sim 121$  a  $\sim 90\%$ , tienen una diferencia de  $\sim 9\%$ ,  $\sim 31\%$ , respectivamente siendo más alta la viabilidad celular en MCF-7; y en el tiempo de incubación por 8 horas (A y B) fue de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\sim 8$  a  $\sim 2\%$ , con una diferencia del  $\sim 6\%$ . Además, los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH siendo selectivos a las células MCF-7 muestran un mayor efecto citotóxico en las células MDA-MB-231 (A y B), la viabilidad celular es de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\sim 40$  a  $\sim 38\%$ , y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\sim 96$  a  $\sim 77\%$ , tienen una diferencia de  $\sim 2\%$ ,  $\sim 19\%$ , respectivamente, y también es notable la alta viabilidad celular en MCF-7; en el tiempo de incubación por 8 horas (A y B) fue de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\sim 6$  a  $\sim 3\%$ .

### **3.7 Internalización de los nanorreactores P22 en MCF-7 y MDA-MB-231**

También se evaluó la administración intracelular de los NRs en células MCF-7 (ER+) y MDA-MB-231 (ER-) en ausencia de glucosa mediante microscopia confocal y se detectó la eficiencia de producción de ROS intracelular sobre la base de la fluorescencia del producto verde de 2', 7'-dicloro-fluoresceína (DCF). Se utilizó el lente objetivo PLAPON 60X O NA:1.42 con magnificación de 60X para obtener una mayor solución. La fluorescencia se detectó en DAPI en excitación/emisión a 405/461 nm, respectivamente y para el DCFDA excitación/emisión a 488/510 nm, respectivamente. Con base en los resultados anteriores, se realizó este análisis con la concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de P22CYP-GOx y P22CYP-GOx-PEG-TamNH en medio sin glucosa y 4 horas de incubación.

En la Figura 34 se observa la capacidad de internalización celular de los NRs y nanocompositos en las células MCF-7 (ER+) y se utilizó como control las células sin tratamiento. La intensidad de la fluorescencia demostró claramente la internalización celular debido a la producción de ROS (DCFDA) y el notable cambio morfológico.

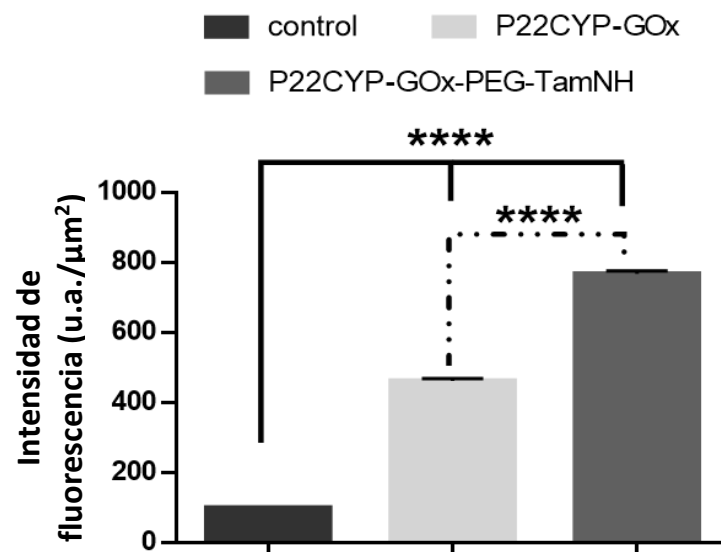


**Figura 34.** Imágenes de microscopía confocal. Internalización celular de los nanorreactores P22CYP-GOx y los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH en células MCF-7. Canal azul, corresponde al DAPI (núcleos), canal verde, corresponde DCFDA (producción de ROS) y merge, corresponde a la combinación de DAPI y DCFDA. La barra de escala representa 20  $\mu\text{m}$ .

En comparación de los tratamientos y el control, ambos tratamientos demuestran un gran cambio en la intensidad de la fluorescencia; sin embargo, para el caso de los nanorreactores P22CYP-GOx se observa un cambio drástico en la morfología celular, se distingue como el núcleo está fragmentado y es retenido en la periferia de la membrana plasmática; también se observa un encogimiento celular, formación de protuberancias dentro de la célula y la formación de burbujas en la membrana.

Por otro lado, los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH también exhiben un cambio morfológico, la disminución del tamaño celular donde se observan células más pequeñas que su estado normal (control); en la membrana tiene una apariencia con protuberancias similares a burbujas en la superficie de las células; también se observó una diferencia en el tamaño del núcleo.

Los análisis estadísticos se observan en la Figura 35, los resultados se expresan como la intensidad de fluorescencia normalizada media de la emisión verde por célula y se cuantificó mediante el software ImageJ (Shihan et al., 2021). Los resultados muestran que la funcionalización de Tam-NH mejoró significativamente la internalización celular de los nanocompositos en células ER+ donde, después de la internalización, las nanopartículas utilizaron la glucosa intrínseca y produjeron un color verde fluorescente asociado a una mayor producción de  $H_2O_2$  y por ende una mayor intensidad.

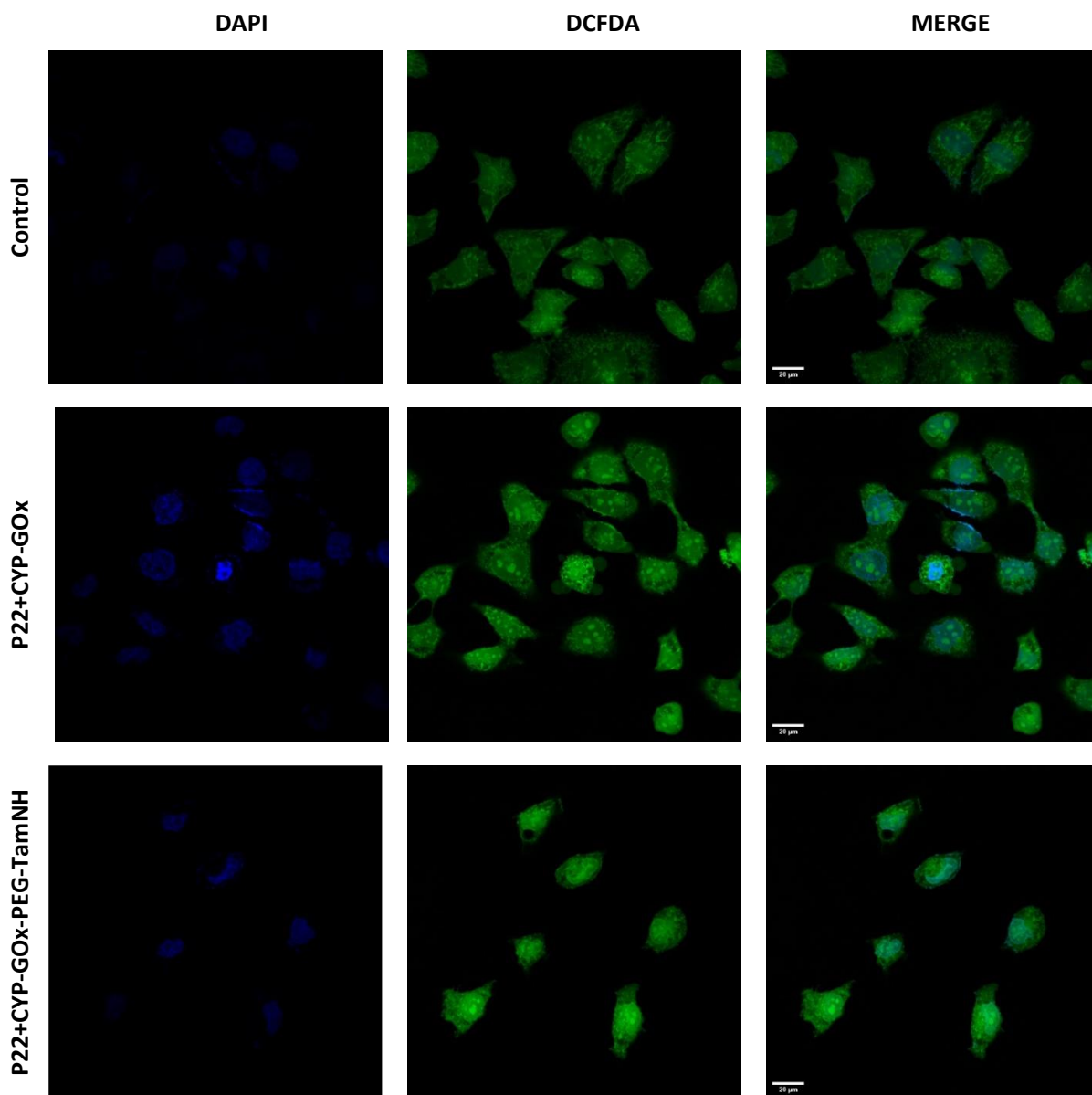


**Figura 35.** Comparación de la emisión verde del DCFDA correspondientes a P22CYP-GOx y P22CYP-GOx-PEG-TamNH en células MCF-7. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*\*\*\* $p < 0,0001$  utilizando un ANOVA de un factor con la prueba de Bartlett.

La fluorescencia de los nanorreactores P22CYP-GOx fue 4.6 veces mayor que la del control, mientras que para los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH fue de 7.7 veces más que la del control.

La internalización de los nanorreactores y nanocompositos en las MDA-MB-231 (ER-) se observó comparando la diferencia en la intensidad de la fluorescencia con el control de las células sin tratamiento y por otro lado el cambio en la morfología celular (Figura 36).



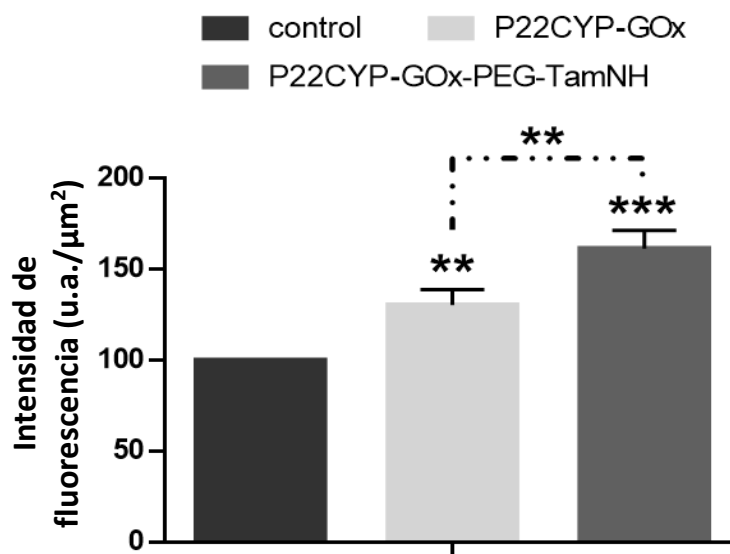


**Figura 36.** Imágenes de microscopía confocal. Internalización celular de los nanorreactores P22CYP-GOx y los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH en células MDA-MB-231. Canal azul, corresponde al DAPI (núcleos), canal verde, corresponde de DCFDA (producción de ROS) y merge, corresponde a la combinación de DAPI y DCFDA. La barra de escala representa 20  $\mu\text{m}$ .

La morfología celular es muy parecida en ambos tratamientos, se observa la formación de burbujas en la membrana plasmática y a comparación del control se aprecia una notable reducción del tamaño celular en ambos casos, pero aún más en los nanocompositos.

Los resultados estadísticos se expresaron como la intensidad de fluorescencia normalizada media de la emisión verde por célula (Shihan et al., 2021), en la Figura 37 se encontró que los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH y nanorreactores P22CYP-GOx también demostraron una internalización en las células

ER-. Sin embargo, en comparación con el control y P22CYP-GOx, los nanorreactores funcionalizados con Tam-NH mostraron una internalización celular significativamente mayor en las células ER+, mientras que la tendencia de la internalización en las células ER- fue similar para ambos nanorreactores y podría atribuirse al efecto EPR.



**Figura 37.** Comparación de la emisión verde del DCFDA correspondientes a P22+CYP-GOx y P22+CYP-GOx-PEG-TamNH en células MDA-MB-231. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  utilizando un ANOVA de un factor con la prueba de Bartlett.

La fluorescencia registrada en los nanorreactores P22CYP-GOx fue 1.3 veces mayor que la del control, mientras que para los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH fue de 1.6 veces mayor que la del control.

## Capítulo 4. Discusión

---

Las estrategias terapéuticas actuales se enfrentan a desafíos significativos debido a la heterogeneidad tumoral, al desarrollo de resistencia a los medicamentos y los efectos secundarios. En respuesta a estos problemas, los regímenes terapéuticos han incorporado terapias multimodales combinadas. En este contexto, la incorporación de agentes terapéuticos como nanodispositivos biocompatibles, incluidas nanopartículas poliméricas, liposomas, sistemas micelares, nanopartículas inorgánicas, nanotubos y dendrímero, han emergido como una estrategia claves. Estos agentes, muchos de los cuales han recibido la aprobación de la FDA o se encuentran en ensayos clínicos, ofrecen nuevas posibilidades para mejorar la eficacia terapéutica (Ediriwickrema y Saltzman, 2015). Las nanoplataformas multimodales, especialmente aquellas que son diseñadas con sistemas de entrega inteligente, representan la próxima generación de nanomedicinas con el potencial de mejorar la respuesta terapéutica (Chauhan et al., 2020). La combinación de nanoterapia que emplean las VLPs como nanoplataforma presenta una estrategia prometedora para abordar estos desafíos. En particular, las cápsides del bacteriófago P22 emergen como una opción prometedora para el desarrollo de un vehículo de entrega de carga como nanomateriales catalíticamente funcionales mediante la encapsulación de enzimas en su interior (Kang et al., 2010; Patterson et al., 2012). Esta estrategia ofrece nuevas posibilidades hacia el desarrollo tratamientos más efectivos y menos invasivos.

La entrega simultánea de profármacos y nanorreactores enzimáticos no ha sido previamente informada según nuestro conocimiento, por lo tanto, el objetivo de este proyecto es evaluar su uso potencial en la EPT mediante el desarrollo de nanocompósitos de P22 como nanofábricas terapéuticas. La sinergia resultante de la EPT se logra mediante una función combinada de actividad enzimática dual de la generación *in situ* de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para la activación de CYP y una liberación de fármacos desencadenada, lo que da como resultado una respuesta anticancerígena más potente, duradera y altamente específica contra el cáncer de mama por múltiples vías simultáneamente.

Considerando la heterogeneidad presente en los cánceres de mama y para garantizar una distribución óptima de los nanomateriales en los sitios tumorales, al mismo tiempo que se evita una administración sistémica, son aspectos fundamentales en el diseño de estrategias terapéuticas. La administración dirigida selectiva aumenta la afinidad de los nanomateriales hacia las células tumorales disminuye el riesgo de toxicidad para las células normales (Chauhan et al., 2016). Por lo tanto, la conjugación de las VLPs P22 con un derivado del tamoxifeno modificado químicamente utilizando como conector el polietilenglicol (PEG),

representa un enfoque terapéutico prometedor. El tamoxifeno, un profármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de cáncer de mama, ejerce su acción mediante la unión al sitio del receptor de estrógeno. La presencia de receptores estrógeno existen no solo intracelularmente sino también en la membrana celular. La unión del tamoxifeno al receptor de estrógeno desencadena la endocitosis, por lo que puede usarse como ligando dirigido a fármacos o sistemas de administración de fármacos en nanopartículas (Nelson et al., 2012). La conjugación específica de las VLPs P22 con el derivado del tamoxifeno, por lo tanto, no solo presenta una estrategia novedosa para la administración selectiva de fármacos, sino también una mejora potencial en la eficacia terapéutica contra el cáncer de mama.

La síntesis del derivado del tamoxifeno (Tam-NH) se llevó a cabo mediante una N-desalquilación selectiva de la amina terciaria del tamoxifeno. El Tam-NH obtenido fue caracterizado utilizando diversas técnicas analíticas para confirmar la formación del producto. El análisis por FTIR mostró un pico de intensidad media en  $3439.55\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la vibración de las aminas secundarias (Figura 13). En comparación con el precursor, la ausencia de este pico confirma la formación del producto, respaldando así los resultados obtenidos por Kumar y colaboradores en 2018. El de protones y carbono de RMN muestran un cambio notable en la posición y en el caso del espectro del carbono de intensidad de los picos correspondientes de los grupos metilo y metileno, indicando que la síntesis fue exitosa debida a la pérdida de un grupo metilo durante la síntesis (espectro de protones) y la disminución en la intensidad del pico de carbono correspondiente al grupo metilo confirma la pérdida de un grupo metilo durante la transformación química, mientras que otros picos de carbono aromático permanecen inalterados. Una caracterización adicional fue mediante HRMS, en el cual demuestra la obtención exitosa del producto, ya que se obtuvo un pico con intensidad moderada en 358.2195 que corresponde a TAM-NH (Figura 16). Los resultados obtenidos de las caracterizaciones evidencian que la síntesis del derivado del tamoxifeno (Tam-NH) fue exitosa.

Por otra parte, en este proyecto se utilizaron las cápsides P22 con CYP<sub>BM3</sub>21B3 debido a la alta concentración de citocromo encapsulado y su capacidad para transformar el tamoxifeno en sus metabolitos activos. Tras la lisis de los pellets bacterianos, las cápsides se purificaron mediante FPLC, obteniendo un perfil de elución con dos picos principales, el primer pico asociado a las cápsides virales P22 aberrantes y el segundo correspondiente a las cápsides virales P22 ensambladas correctamente (Pliego Sosa, 2020; Tapia-Moreno et al., 2017). La confirmación de la presencia del CYP en las VLPs se llevó a cabo mediante electroforesis SDS-PAGE, se cuantificó el número de proteínas de cubierta por proteína de andamiaje fusionada con CYP en las cápsides virales mediante un análisis densitométrico. Los resultados

detallan la obtención de nanorreactores P22CYP que encapsulan 214 moléculas de CYP, con una molaridad de confinamiento de 6.4 mM y una ocupación interna del 58%.

La funcionalización de la glucosa oxidasa (GOX) en la superficie de los nanorreactores P22CYP se llevó a cabo mediante un acoplamiento de carbodiimida, empleando EDC y NHS para la conjugación de aminas y ácidos carboxílicos en los residuos proteicos. Este proceso generó enlaces covalentes de tipo amida al activar los grupos carboxilo libres de GOX con carbodiimida y N-hidroxisuccinimida, acoplándolos a los grupos de amina expuestos en las cápsidas (González-Davis et al., 2020; Hermanson, 2013). Posteriormente, la conjugación covalente del Tam-NH en la superficie del P22CYP-GOX se llevó a cabo utilizando el PEG como conector mediante un enlace amida formando PEG-TamNH y con los grupos amina expuestos en la superficie de los nanorreactores P22CYP-GOX se obtuvieron nanocompositos, P22CYP-GOX-PEG-TamNH (Chauhan et al., 2018).

La evaluación de la actividad enzimática de los nanocompositos P22CYP-GOX-PEG-TamNH se determinó espectrofotométricamente mediante la oxidación de 2,6-DMP. Es importante señalar que estos nanocompositos requieren entre 5 y 10 minutos antes de que la transformación del sustrato sea notable. Este comportamiento se debe al hecho de que la GOX necesita producir suficiente peróxido de hidrógeno para alcanzar concentraciones catalíticas suficientes para iniciar la transformación de CYP. No obstante, la tasa de transformación máxima se midió a diferentes concentraciones de glucosa, el comportamiento de la cinética enzimática fue ajustado por la ecuación de Hill (González-Davis et al., 2020). Los nanocompositos exhibieron una velocidad máxima de 2.67 mU/mg, demostrando su capacidad para convertir moléculas de sustrato por minuto con una cooperatividad positiva. También muestran una actividad específica menor a los nanorreactores P22CYP-GOX, esto se puede atribuir a que la disminución de la actividad es debido a la difusión de los sustratos y productos es más limitada debido al recubrimiento del PEG sobre la superficie de las cápsidas y esto se ve reflejado en la reducción de la actividad catalítica (Gama et al., 2023; Tapia-Moreno, 2015). Para llevar a cabo la reacción en cascada, los nanocompositos utilizan la glucosa que es transformada en ácido glucónico y  $H_2O_2$  por la GOX, y es utilizada por el CYP presente, utilizando el  $H_2O_2$  generado para llevar a cabo su transformación biocatalítica de sustratos. La concentración típica de glucosa en las células es de alrededor de 5.5 mM; sin embargo, las células cancerosas requieren un suministro considerable de glucosa para mantener su crecimiento y proliferación. En el TME, se suelen observar niveles elevados de glucosa (>25-50 mM) (Chauhan et al., 2020). Los nanorreactores y nanocompositos mostraron actividad combinada en concentraciones de glucosa que normalmente se encuentra en células de cáncer de mama (Duan et al., 2014; Li et al., 2019).

La caracterización de los nanocompositos se llevó a cabo mediante TEM (Figura 24), se observan bien definidas y mantienen su forma aun después de la funcionalización con PEG-TamNH. Es importante destacar que en las micrografías de TEM no permite distinguir las cadenas de PEG en la superficie de las cápsides, se puede interpretar que estas cadenas que recubren casi por completo la superficie afectan el flujo de moléculas a través de los poros del nanocomposito, lo que explica la disminución en la actividad de las VLPs pegiladas (Tapia-Moreno, 2015). También se caracterizó mediante DLS, en el cual el diámetro hidrodinámico de P22CYP era de 74.15 nm ( $\pm 18.35$ ), que aumentó con la funcionalización de la GOx a 81.64 nm ( $\pm 19.91$ ); mientras que P22CYP-GOx-PEG-TamNH, el tamaño al funcionalizar con PEG-TamNH era 94.71 nm ( $\pm 17.19$ ). La GOx es una enzima de 160 kDa (16–25% en peso glicosilado) con un diámetro hidrodinámico de  $8.9 \pm 4$  nm (PrévotEAU et al., 2010), por lo tanto, después de la funcionalización tuvo un incremento en el diámetro de 7.49 nm. Y, para comprobar la estabilidad de los NRs, se realizó un segundo análisis un mes después para comparar los resultados (Tabla 3), resaltando que en ambos análisis los datos se encuentran dentro de un margen aceptable ya que los tamaños se mantienen relativamente constantes. Por otro lado, en el potencial z se observa un notable aumento en la carga negativa de la superficie, la diferencia de los valores representa una exitosa unión de la conjugación con PEG-TamNH. La estrategia de funcionalización de la superficie implica la unión de PEG-TamNH al terminal de amina de las VLPs, aumentando así la proporción de COOH:NH<sub>2</sub> libres en la superficie de las VLPs. Por otro lado, el tamoxifeno es una molécula cargada negativamente debido a la alta densidad de electrones  $\pi$  de sus tres anillos aromáticos. Estos factores podrían contribuir a la alta carga superficial de los nanocompositos finales.

A pesar de que en la electroforesis en el gel nativo no se logra apreciar una gran diferencia, se puede observar la densidad de las bandas, en donde la densidad es mayor en los nanorreactores a diferencia de los nanocompositos que es menor, y esto significa que la lenta migración podría deberse al incremento del peso molecular. En comparación con el P22CYP, se observa una banda con desvanecimiento y en los P22CYP-GOx hay una migración un poco más lenta mientras que en P22CYP-GOx-PEG-TamNH hay más bandas en la parte superior, todo debido a que se atribuye el cambio en el peso molecular o la agregación de las VLPs debido a la estrategia de reticulación.

Por otra parte, para corroborar la cantidad de Tam-NH de los nanocompositos se utilizó la espectroscopia UV-Vis a un rango de longitud de onda de 240-360 nm y obteniendo las absorbancias máximas a 265 nm de la reacción PEG-TamNH (sabiendo que contenían 23  $\mu$ g) y del sobrenadante. Luego se obtuvo una curva de calibración (Figura 27) con diferentes concentraciones de la reacción PEG-TamNH tomando los datos a la longitud de onda de 265 nm. En la Tabla 4 se muestra la cantidad en  $\mu$ g de PEG-TamNH que corresponden al sobrenadante, deduciendo que el porcentaje restante es de 50.43% que corresponde a

11.6  $\mu\text{g}$  de PEG-TamNH en 3.6  $\mu\text{g}$  de tamoxifeno/mg de proteína. En la literatura han reportado diferentes nanotransportadores de fármacos con una considerable carga del fármaco, por ejemplo; nanopartículas de lecitina/quitosano cargadas con citrato de tamoxifeno con una eficiencia de carga del 19%, nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  conjugadas con ácido fólico y cargadas con tamoxifeno tuvieron una eficiencia de carga del 49.1%, finalmente en un reporte estudiaron la eficacia de unión y carga de medicamentos contra el cáncer doxorubicina (DOX), tamoxifeno (TAM) y sus metabolitos 4-hidroxitamoxifeno (4-Hydroxytam) y endoxifeno (Endox) con varios polímeros sintéticos poli(etilenglicol) (PEG), poliamidoamina (mPEG-PAMAM-G3) y dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM-G4); en el cual la eficiencia de carga para los conjugados fármaco-polímero se determinó: PEG-6000 (DOX=30%, Tam=40%, 4-Hidroxitam=45%, Endox=43%), mPEG-PAMAMG3 (DOX=35%, Tam=45%, 4-Hidroxitam=50%, Endox=45%) y PAMAM-G4 (DOX=40%, Tam=50%, 4-Hidroxitam=55%, Endox=52%) (Barbieri et al., 2013; Heidari Majd et al., 2013; Sanyakamdhorn et al., 2017). Finalmente, se analizaron en espectroscopia de fluorescencia, estos muestran un incremento en la intensidad de fluorescencia a comparación de los nanorreactores P22CYP, lo que sugiere que los cambios de fluorescencia se deben a la unión del fármaco al polímero (Agudelo et al., 2013; Sanyakamdhorn et al., 2016). Un fenómeno similar fue observado en otros grupos de investigación, en el cual observan un cambio en la fluorescencia de los fluoróforos después de la unión de proteínas, en 2015 reportaron un nuevo fluoróforo de base de naftaleno en varias condiciones de solución, incluida su unión a proteínas de albúmina sérica humana y bovina, tanto en su estado nativo como desnaturalizado, los cambios en la fluorescencia del compuesto son controlados como parámetro de unión. Con el aumento de la concentración de albúminas séricas la intensidad de fluorescencia del compuesto aumenta y observaron un desplazamiento hacia el azul en el máximo de emisiones. Por lo tanto, los cambios en la fluorescencia del compuesto en presencia de proteínas transportan información no solo sobre la interacción sino también sobre el un efecto directo del entorno del sitio de unión en el cual demostraron un mayor rendimiento cuántico junto con un desplazamiento hacia el azul en presencia de proteína. En 2018, funcionalizaron VLPs (P22CYP) con un fotosensibilizador, protoporfirina IX (PpIX) y un ligando dirigido a base de estradiol, en el cual demostraron una exitosa conjugación del fotosensibilizador en la superficie de las VLPs comparando los resultados de PpIX y P22CYP-PpIX-PEG (EST) a la misma concentración general. Y el mismo fenómeno es observado debido a la disminución de la emisión de fluorescencia de la mezcla de P22-PpIX-PEG (EST) con el tinte sensible a ROS, 1,3-difenil isobenzofurano (DPBF) se irradió con UV365 nm en diferentes momentos, obteniendo un cambio hacia el espectro azul en presencia de la proteína (Chauhan et al., 2018; Pal et al., 2015).

Una posible aplicación de los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH es su uso en la terapia de activación enzimática de profármacos para tratar el cáncer de mama. En este caso, la glucosa presente en

las células de cáncer de mama se transformaría en ácido glucónico, produciendo  $H_2O_2$  que posteriormente será utilizado por el CYP para transformar el profármaco tamoxifeno en sus metabolitos activos. Este enfoque está respaldado por el trabajo de (Tapia-Moreno et al., 2017), donde utilizaron las mismas cápsidas virales P22CYP funcionalizadas con PEG y ácido fólico; informaron un incremento en la sensibilidad de las células MCF-7 cuando se trataron simultáneamente con tamoxifeno y los P22CYP. Además, informaron un aumento de 4.1 veces en la actividad de CYP después de la internalización de las cápsidas en células MCF-7. Los nanocompositos desarrollados en este trabajo también podrían usarse como terapia adyuvante de inanición y oxidación contra las células de cáncer de mama. La glucosa oxidasa es una enzima que cataliza la transformación de la glucosa utilizando  $O_2$  como aceptor de electrones y generando  $H_2O_2$ . La disminución subsiguiente en la concentración de glucosa y oxígeno conduce a una falla en el suministro de nutrientes y oxígeno, lo que disminuye el crecimiento de las células cancerosas y las priva de alimento. Además, la generación de  $H_2O_2$  aumenta el estrés oxidativo en las células, contribuyendo así a la terapia de oxidación (Fu et al., 2018; J. Yu et al., 2017).

Es por ello que se utilizaron las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 en el cual los nanorreactores P22CYP-GOx y los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH demostraron un efecto citotóxico, evidenciado por los notables cambios drásticos en la morfología celular en ambas líneas celulares (**iError! No se encuentra el origen de la referencia.**y Figura 30). El efecto de los tratamientos de los NRs y nanocompositos es observado durante 24 horas, y en ambos casos podemos observar una muerte celular significativa a las 8 horas de incubación. Después de 2 horas de tratamiento en presencia de NRs, la morfología de las células cambió drásticamente, tal vez debido al estrés oxidativo. Después de 4 horas, se observa la producción de burbujas dentro de las células en el caso de los nanorreactores P22CYP-GOx es más visible que en los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH, lo que sugiere una alta producción de peróxido de hidrógeno. Finalmente, al cabo de 8 horas las células están muy dañadas, y debido a estas características morfológicas se infiere que la muerte celular es mediada por apoptosis. Estas características de la GOx son similares a un informe anterior, en el cual describen que los tratamientos fueron monitorizados mediante microscopía de fluorescencia, en el cual la producción de burbujas aumenta y la fluorescencia continúa disminuyendo después de 3 horas y a las 4 horas la fluorescencia desapareció y la morfología celular fue altamente dañada (Gama et al., 2023).

Por otro lado, en los ensayos MTT se tomó en cuenta que la viabilidad debe reducirse al <70% para reconocer el potencial citotóxico de los materiales probados durante el contacto directo entre las células y los materiales (Podgórski et al., 2022). Estas pruebas están sujetas a la ISO- 10993 en evaluación biológica de dispositivos médicos; ensayos de citotoxicidad *in vitro* (IVAMI, 2009).



Los resultados de los ensayos de viabilidad de los nanorreactores y nanocompositos en la línea MCF-7 (Figura 31) en medio sin glucosa, las VLPs P22CYP mostraron una alta viabilidad celular en ambos tiempos de incubación, lo que demuestra que no tienen una toxicidad intrínseca para las células cancerosas ya que no contiene en este caso GOx o tamoxifeno que cause la toxicidad, en el caso de los nanorreactores P22CYP-GOx muestran una disminución de la viabilidad celular en las 3 concentraciones con respecto al tiempo, este efecto se puede atribuir al efecto citotóxico de la GOx se origina a partir de la producción de peróxido de hidrógeno que induce la muerte de las células en altas concentraciones mediante la activación de la apoptosis de las células tumorales dependiente del  $H_2O_2$ , causando daño oxidativo en las células, hipoxia debido a que agota el oxígeno y el consumo de glucosa que provoca la inanición en las células (Zhang et al., 2018; Zhao et al., 2017). Por otra parte, las VLPs dirigidas (P22CYP-GOx-PEG-TamNH), muestran una mayor toxicidad comparada con las VLPs no dirigidas (P22CYP-GOx), resaltando que la capacidad de funcionalizar el tamoxifeno para mejorar la internalización celular y la habilidad de mejorar la respuesta terapéutica mediante una acción rápida. Esto puede atribuir a que la línea MCF-7 presenta una expresión de receptores de estrógenos, andrógenos, progestágenos y glucocorticoides (Holliday y Speirs, 2011), lo cual permite que el tamoxifeno actúe con los receptores de estrógenos bloqueando la estimulación del crecimiento de las células tumorales por parte de los estrógenos. Esta internalización en la célula puede activar la cascada de señalización que promueve la muerte celular por apoptosis. 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).

En la línea celular MDA-MB-231 (Figura 32), los resultados sugieren que los nanorreactores P22CYP-GOx y los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH demostraron un comportamiento de agente inhibidor de la proliferación eficaz en la línea celular MDA-MB-231, logrando un efecto dosis respuesta dando como resultado una reducción de su viabilidad celular hasta un ~53%. Ya que los NRs tienen la capacidad de penetrar en las células mediante el efecto EPR, se observó este perfil de toxicidad similar en las células ER- con ambos NRs, a diferencia de lo que se observó en las células ER+ a las 4 horas. Aunque no se observó especificidad hacia las células ER+, los resultados demuestran la capacidad de ambos NRs que contienen GOx para suprimir las células triples negativas agresivas. En esta línea celular no existe una terapia dual debido a la falta de receptores, y esto se le puede atribuir solo a la terapia oxidativa.

Por otro lado, los resultados del ensayo de viabilidad en medio con glucosa de los nanorreactores y nanocompositos en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 (Figura 33), destacan que la concentración 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en ambas líneas celulares tienen una alta toxicidad celular en 8 horas de incubación, tanto en las VLPs dirigidas y las no dirigidas, estas exhiben una saturación que podría ser atribuido a que, cuando los



El grupo de investigación de Pober en el 2009, sugirieron que la hipoxia promueve la producción de ROS y el aumento de la generación de este en las células endoteliales lo que conduce a la apoptosis. Los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamN también presentaron un cambio morfológico en cuanto al tamaño, tanto al tamaño de la célula como del núcleo atribuido a la condensación de la cromatina en el núcleo de las células, es decir, que el ADN y las proteínas asociadas se compactan y se agrupan, dando una apariencia más densa en el núcleo de la célula vista al microscopio, esto induce a que alteraciones morfológicas e integridad del núcleo ocasionen daños en el ADN. Estas características sugieren que las células están pasando por un proceso de apoptosis, ya que están sometidas a múltiples formas de estrés (Lee et al., 2023). Es importante señalar que P22 tiene la capacidad de internalizarse en las células debido al efecto de permeabilidad y retención mejorada (Chauhan et al., 2018). Sin embargo, el estudio demuestra claramente la capacidad de administración dirigida de las VLPs funcionalizadas en la superficie, lo que puede mejorar la velocidad de internalización nanoterapéutica para lograr un tratamiento mejorado en un tiempo más corto. En la línea celular MDA-MB-231 ambos tratamientos tienen una morfología celular muy similar, y se infiere que las células están experimentando apoptosis debido al estrés oxidativo (Lee et al., 2023). Una morfología similar fue reportada en 2023 por Gama y colaboradores, en el cual estudiaron el efecto de nanorreactores de BMV (VLP-GOx) en la línea MDA-MB-231-GFP, observaron protuberancias (protrusiones) plasmáticas desde dentro de la célula, debido probablemente a la formación de burbujas de gas dentro de las células producidas por la producción metabólica de oxígeno por parte del sistema antioxidante (catalasa) que es inducida por el exceso de peróxido de hidrógeno producido por la actividad GOx. Este efecto citotóxico de GOx se origina en la producción de peróxido de hidrógeno, causando daño oxidativo en las células, hipoxia al consumir oxígeno y consumo de glucosa induce a la inanición de las células.

La distribución de la intensidad de las células MDA-MB-231 abarca toda la célula (Figura 36, merge); y a diferencia de las MCF-7 (Figura 34, merge) se aprecia perfectamente localizada el incremento la producción del DCFDA asociado a los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH, por lo cual se infiere que hay un incremento en la internalización en las MCF-7 debido a la administración dirigida activa del tamoxifeno que a comparación de las MDA-MB-231 que tienen una internalización similar atribuida al efecto EPR; esto puede ser asociado a un efecto de exceso en la producción de ROS, porque al requerir más glucosa están en estrés oxidativo mayor, entonces la fluorescencia puede ser asociada a esto e incrementar un poco la posible internalización, pero solo un poco, no todas las células responde igual (Shin y Koo, 2021). Los análisis estadísticos corroboran la afinidad de ambos tratamientos en las células con receptores de estrógeno y sobre todo de los nanocompositos P22CYP-GOx-PEG-TamNH, que demostraron una mayor internalización en comparación con el control y P22CYP-GOx, las VLPs dirigidas tienen una

significativa mejora en la internalización de las células ER+. En cuanto a las células ER-, se mantuvo una tendencia de internalización similar para ambos nanorreactores, la cual posiblemente se debió al efecto EPR.

Además, el tamoxifeno (profármaco), es metabolizado por la acción de la actividad del CYP en metabolitos antiproliferativos, que poseen una fuerte afinidad por el receptor de los estrógenos, desencadenando así el efecto quimioterapéutico deseado. Se tiene en cuenta que, las células MCF-7 tienen la capacidad de absorber el tamoxifeno y este aspecto es crucial, dado que el receptor de estrógenos alfa se encuentra principalmente en la superficie de la membrana celular.

El análisis *in vitro* destaca la eficiencia del tamoxifeno funcionalizado para mejorar la internalización celular, específicamente en células ER+, demostrando una alta selectividad. Es importante mencionar que no se encontraron diferencias en la toxicidad celular *in vitro* en ambos tipos de células debido al alto estrés oxidativo causado por la GOx. En ausencia de glucosa en el medio celular, se observaron indicios de una internalización celular específica y diferencias en la muerte celular en las células ER+ con los nanorreactores funcionalizados y no funcionalizados. Interesantemente, los NRs también tienen la capacidad de causar citotoxicidad en las células ER-, por lo que el sistema desarrollado puede ser altamente tóxico para las células ER+ y también tiene el potencial de inducir la muerte celular en las células ER-. Se espera que la administración dirigida activa conduzca a un tratamiento rápido a través de una rápida internalización por la acción veloz de GOx, y que las células restantes puedan ser eliminadas por la acción lenta de EPT al producir un fármaco activo *in situ* con el tiempo. Por lo tanto, será interesante estudiar el potencial de los nanorreactores desarrollados en estudios *in vivo* en el futuro.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

En conclusión, este estudio presenta una nueva clase de nanocompositos terapéuticos basados en partículas tipo virus P22 que combinan eficazmente las capacidades catalíticas de las enzimas CYP con la GOx para la transformación dirigida del profármaco tamoxifeno, un agente crítico para la terapia endocrina. El aspecto único de este enfoque radica en su capacidad para administrar conjuntamente el profármaco y las enzimas, superando los obstáculos previos de la terapia con profármacos enzimáticos planteados por las diferencias en su farmacocinética y farmacodinámica. El P22 que encapsula la enzima CYP se funcionalizó con GOx y un derivado del tamoxifeno, conservando la actividad enzimática individual y se caracterizó con éxito. Los nanorreactores mostraron una reacción en cascada en presencia de glucosa, lo que demuestra el potencial para activar el profármaco en altas concentraciones de glucosa que prevalecen en el microentorno tumoral. Los estudios *in vitro* han demostrado resultados prometedores, indicando una reducción sustancial en la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de mama ER+ y ER- debido al estrés oxidativo causado por GOx en presencia de glucosa. Mientras que, en ausencia de glucosa en el medio celular, se observó una internalización celular significativamente mayor en las células ER+, lo que sugiere el potencial del tamoxifeno para dirigir la terapia a las células ER+. Además, la morfología celular distintiva en las líneas celulares ER+ después de la funcionalización con tamoxifeno enfatiza el papel del tamoxifeno en la citotoxicidad. Esto también se corroboró con análisis de viabilidad celular, donde las VLPs dirigidas mostraron un mayor porcentaje en la muerte celular en solo 4 horas de incubación, mientras que las VLPs no dirigidas requirieron 8 horas para alcanzar una toxicidad similar. Por lo tanto, las VLPs dirigidas podrían ofrecer una acción terapéutica más rápida contra las células cancerosas.

Estos hallazgos preliminares sugieren que las VLPs funcionalizadas con tamoxifeno pueden trabajar sinérgicamente con el estrés oxidativo mediado por GOx y la EPT mediada por CYP. La administración conjunta de enzimas y del profármaco, junto con una mejor localización de las VLPs después de la funcionalización con tamoxifeno, tiene el potencial de superar los desafíos existentes en la EPT y mejorar los resultados terapéuticos al mismo tiempo que reduce los efectos secundarios. Es importante destacar que las condiciones *in vivo* son significativamente diferentes de las condiciones *in vitro*. El efecto terapéutico de la GOx debido al estrés oxidativo podría lograrse más rápido, pero las células cancerosas pueden volver a crecer, ya que el estrés oxidativo también podría favorecer el crecimiento celular canceroso. Por lo tanto, los estudios futuros implican el análisis de los nanorreactores desarrollados en estudios *in vivo*, y se espera que la acción terapéutica rápida de la GOx combinada con la acción lenta de la terapia con profármacos enzimáticos mediante generación *in situ* del fármaco activo pueda eliminar las

células cancerosas durante un período más prolongado sin la necesidad de múltiples dosis de medicamentos. Por lo tanto, este enfoque representa un avance significativo en la búsqueda de estrategias de tratamiento del cáncer de mama más efectivas y dirigidas.

## Literatura citada

- Afzal, M., Aameduzzafar, Alharbi, K. S., Alruwaili, N. K., Al-Abassi, F. A., Al-Malki, A. A. L., Kazmi, I., Kumar, V., Kamal, M. A., Nadeem, M. S., Aslam, M., y Anwar, F. (2021). Nanomedicine in treatment of breast cancer – A challenge to conventional therapy. *Seminars in Cancer Biology*, 69, 279-292. <https://doi.org/10.1016/j.semancer.2019.12.016>
- Agudelo, D., Sanyakamdhorn, S., Nafisi, S., y 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>
- Aguilar Guzmán, J. C. (2020). Preparación y caracterización de nanopartículas de tereftalato de polietileno (PET) y la evaluación de su toxicidad in vitro. [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.]
- American Cancer Society. (2023). Cancer Facts y Figures 2023. *Atlanta: American Cancer Society*. <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/2023-cancer-facts-figures.html>
- Barbieri, S., Sonvico, F., Como, C., Colombo, G., Zani, F., Buttini, F., Bettini, R., Rossi, A., y Colombo, P. (2013). Lecithin/chitosan controlled release nanopreparations of tamoxifen citrate: Loading, enzyme-trigger release and cell uptake. *Journal of Controlled Release*, 167(3), 276-283. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.02.009>
- Chauhan, K., Arun, A., Singh, S., Manohar, M., Chuttani, K., Konwar, R., Dwivedi, A., Soni, R., Singh, A. K., Mishra, A. K., y Datta, A. (2016). Bivalent Approach for Homodimeric Estradiol Based Ligand: Synthesis and Evaluation for Targeted Theranosis of ER(+) Breast Carcinomas. *Bioconjugate Chemistry*, 27(4), 961-972. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00024>
- Chauhan, K., Hernandez-Meza, J. M., Rodríguez-Hernández, A. G., Juárez-Moreno, K., Sengar, P., y Vazquez-Duhalt, R. (2018). Multifunctionalized biocatalytic P22 nanoreactor for combinatory treatment of ER+ breast cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0345-2>
- Chauhan, K., Olivares-Medina, C. N., Villagrana-Escareño, M. V., Juárez-Moreno, K., Cadena-Nava, R. D., Rodríguez-Hernández, A. G., y Vazquez-Duhalt, R. (2022). Targeted Enzymatic VLP-Nanoreactors with  $\beta$ -Glucocerebrosidase Activity as Potential Enzyme Replacement Therapy for Gaucher's Disease. *ChemMedChem*, 17(19). <https://doi.org/10.1002/cmdc.202200384>
- Chauhan, K., Sengar, P., Juárez-Moreno, K., Hirata, G. A., y Vazquez-Duhalt, R. (2020). Camouflaged, activatable and therapeutic tandem bionanoreactors for breast cancer theranosis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 580, 365-376. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.07.043>
- Chauhan, K., Zárate-Romero, A., Sengar, P., Medrano, C., y Vazquez-Duhalt, R. (2021). Catalytic Kinetics Considerations and Molecular Tools for the Design of Multienzymatic Cascade Nanoreactors. *ChemCatChem*, 13(17), 3732-3748. <https://doi.org/10.1002/cctc.202100604>

- Chen, J., Tian, B., Yin, X., Zhang, Y., Hu, D., Hu, Z., Liu, M., Pan, Y., Zhao, J., Li, H., Hou, C., Wang, J., y Zhang, Y. (2007). Preparation, characterization and transfection efficiency of cationic PEGylated PLA nanoparticles as gene delivery systems. *Journal of Biotechnology*, 130(2), 107-113. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.02.007>
- Cirino, P. C., y Arnold, F. H. (2003). A Self-Sufficient Peroxide-Driven Hydroxylation Biocatalyst. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(28), 3299-3301. <https://doi.org/10.1002/anie.200351434>
- Clemons, M., Danson, S., y Howell, A. (2002). Tamoxifen ('Nolvadex'): A review. *Cancer Treatment Reviews*, 28(4), 165-180. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(02\)00036-1](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(02)00036-1)
- Comellas-Aragonès, M., Engelkamp, H., Claessen, V. I., Sommerdijk, N. A. J. M., Rowan, A. E., Christianen, P. C. M., Maan, J. C., Verduin, B. J. M., Cornelissen, J. J. L. M., y Nolte, R. J. M. (2007). A virus-based single-enzyme nanoreactor. *Nature Nanotechnology*, 2(10), 635-639. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.299>
- DePorter, S. M., y McNaughton, B. R. (2014). Engineered M13 Bacteriophage Nanocarriers for Intracellular Delivery of Exogenous Proteins to Human Prostate Cancer Cells. *Bioconjugate Chemistry*, 25(9), 1620-1625. <https://doi.org/10.1021/bc500339k>
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., y Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-44. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>
- Din, F. U., Aman, W., Ullah, I., Qureshi, O. S., Mustapha, O., Shafique, S., y Zeb, A. (2017). Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 12, 7291-7309. <https://doi.org/10.2147/IJN.S146315>
- Dinda, S., Sarkar, S., y Das, P. K. (2018). Glucose Oxidase Mediated Targeted Cancer-Starving Therapy by Biotinylated Self-Assembled Vesicle. *Chemical Communications*, 52(1), 1-216. <https://doi.org/DOI:10.1039/C8CC03599G>
- Dreaden, E. C., Mwakwari, S. C., Sodji, Q. H., Oyelere, A. K., y El-Sayed, M. A. (2009). Tamoxifen-Poly(ethylene glycol)-Thiol Gold Nanoparticle Conjugates: Enhanced Potency and Selective Delivery for Breast Cancer Treatment. *Bioconjugate Chemistry*, 20(12), 2247-2253. <https://doi.org/10.1021/bc9002212>
- Duan, W., Shen, X., Lei, J., Xu, Q., Yu, Y., Li, R., Wu, E., y Ma, Q. (2014). Hyperglycemia, a Neglected Factor during Cancer Progression. *BioMed Research International*, 2014, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2014/461917>
- Ediriwickrema, A., y Saltzman, W. M. (2015). Nanotherapy for Cancer: Targeting and Multifunctionality in the Future of Cancer Therapies. *ACS Biomaterials Science y Engineering*, 1(2), 64-78. <https://doi.org/10.1021/ab500084g>
- Essus, V. A., Souza Júnior, G. S. E., Nunes, G. H. P., Oliveira, J. D. S., De Faria, B. M., Romão, L. F., y Cortines, J. R. (2023). Bacteriophage P22 Capsid as a Pluripotent Nanotechnology Tool. *Viruses*, 15(2), 516. <https://doi.org/10.3390/v15020516>



- European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). (2023a). *ECACC General Cell Collection: MCF7*. UK Health Security Agency. [https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86012803ycollection=ecacc\\_gc](https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86012803ycollection=ecacc_gc)
- European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). (2023b). *ECACC General Cell Collection: MDA-MB-231*. UK Health Security Agency. [https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=92020424ycollection=ecacc\\_gc](https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=92020424ycollection=ecacc_gc)
- Fu, L., Qi, C., Hu, Y., Lin, J., y Huang, P. (2019). Glucose Oxidase-Instructed Multimodal Synergistic Cancer Therapy. *Advanced Materials*, 31(21), 1808325. <https://doi.org/10.1002/adma.201808325>
- Fu, L.-H., Qi, C., Lin, J., y Huang, P. (2018). Catalytic chemistry of glucose oxidase in cancer diagnosis and treatment. *Chemical Society Reviews*, 47(17), 6454-6472. <https://doi.org/10.1039/C7CS00891K>
- Fuhrmann, G., Chandrawati, R., Parmar, P. A., Keane, T. J., Maynard, S. A., Bertazzo, S., y Stevens, M. M. (2018). Engineering Extracellular Vesicles with the Tools of Enzyme Prodrug Therapy. *Advanced Materials*, 30(15), 1706616. <https://doi.org/10.1002/adma.201706616>
- Gama, P., Cadena-Nava, R. D., Juárez-Moreno, K., Pérez-Robles, J., y Vazquez-Duhalt, R. (2021). Virus-Based Nanoreactors with GALT Activity for Classic Galactosemia Therapy. *ChemMedChem*, 16(9), 1438-1445. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000999>
- Gama, P., Juárez, P., Rodríguez Hernández, A., y Vazquez Duhalt, R. (2023). Glucose oxidase virus-based nanoreactors for smart breast cancer therapy. *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria En Nanociencia y Nanotecnología*, 9(16), 128. <https://doi.org/10.1002/biot.202300199>
- González-Davis, O., Chauhan, K., Zapian-Merino, S.-J., y Vazquez-Duhalt, R. (2020). Bi-enzymatic virus-like bionanoreactors for the transformation of endocrine disruptor compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, 415-421. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.272>
- Gonzalez-Davis, O., Kanchan, C., y Vazquez Duhalt, R. (2019). Biocatalytic Nanoreactors for Medical Purposes. En *Pharmaceutical Biocatalysis* (pp. 637-671). Jenny Stanford Publishing. <https://doi.org/10.1201/9780429295034-18>
- González-Davis, O., Villagrana-Escareño, M. V., Trujillo, M. A., Gama, P., Chauhan, K., y Vazquez-Duhalt, R. (2023a). Virus-like nanoparticles as enzyme carriers for Enzyme Replacement Therapy (ERT). *Virology*, 580, 73-87. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.01.017>
- Hansol, K. (2020). Developing versatile delivery nanoplatfoms using protein nanoparticles. [Tesis de Doctorado en Ciencias, Ulsan National Institute of Science and Technology]
- Hassett, M. J., O'Malley, A. J., Pakes, J. R., Newhouse, J. P., y Earle, C. C. (2006). Frequency and Cost of Chemotherapy-Related Serious Adverse Effects in a Population Sample of Women With Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 98(16), 1108-1117. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj305>
- He, T., Xu, H., Zhang, Y., Yi, S., Cui, R., Xing, S., Wei, C., Lin, J., y Huang, P. (2020). Glucose Oxidase-Instructed Traceable Self-Oxygenation/Hyperthermia Dually Enhanced Cancer Starvation Therapy. *Theranostics*, 10(4), 1544-1554. <https://doi.org/10.7150/thno.40439>

- Heidari Majd, M., Asgari, D., Barar, J., Valizadeh, H., Kafil, V., Abadpour, A., Moumivand, E., Mojarrad, J. S., Rashidi, M. R., Coukos, G., y Omid, Y. (2013). Tamoxifen loaded folic acid armed PEGylated magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy of cancer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 106, 117-125. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.051>
- Hermanson, G. T. (2013). *Bioconjugate Techniques* (3rd ed.). Elsevier Science. <https://www.sciencedirect.com/book/9780123822390/bioconjugate-techniques>
- Holliday, D. L., y Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13(4), 215. <https://doi.org/10.1186/bcr2889>
- Huttunen, K., Mahonen, N., Raunio, H., y Rautio, J. (2008). Cytochrome P450-Activated Prodrugs: Targeted Drug Delivery. *Current Medicinal Chemistry*, 15(23), 2346-2365. <https://doi.org/10.2174/092986708785909120>
- IVAMI. (2009). *Prueba de citotoxicidad in vitro*. Instituto Valenciano de Microbiología. <https://www.ivami.com/es/evaluacion-biologica-de-dispositivos-medicos/2072-pruebas-de-toxicologia-110-prueba-de-citotoxicidad-i-in-vitro-i-b-une-en-iso-10993-5-2009-evaluacion-biologica-de-productos-sanitarios-parte-5-pruebas-de-citotoxicidad-i-in-vitro-i-b-acreditada-por-enac-b#:~:text=EN%20ISO%2010993-5%3A%202009.%20Evaluaci%C3%B3n%20biol%C3%B3gica%20de%20productos,detectar%20la%20citotoxicidad%20in%20vitro%20de%20dispositivos%20m%C3%A9dicos.>
- Kang, S., Uchida, M., O'Neil, A., Li, R., Prevelige, P. E., y Douglas, T. (2010). Implementation of P22 Viral Capsids as Nanoplatforms. *Biomacromolecules*, 11(10), 2804-2809. <https://doi.org/10.1021/bm100877q>
- Koyani, R., Pérez-Robles, J., Cadena-Nava, R. D., y Vazquez-Duhalt, R. (2017). Biomaterial-based nanoreactors, an alternative for enzyme delivery. *Nanotechnology Reviews*, 6(5), 405-419. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2016-0071>
- Kumar, M., Sharma, G., Misra, C., Kumar, R., Singh, B., Katare, O. P., y Raza, K. (2018). N-desmethyl tamoxifen and quercetin-loaded multiwalled CNTs: A synergistic approach to overcome MDR in cancer cells. *Materials Science and Engineering: C*, 89, 274-282. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.03.033>
- Lee, E., Song, C.-H., Bae, S.-J., Ha, K.-T., y Karki, R. (2023). Regulated cell death pathways and their roles in homeostasis, infection, inflammation, and tumorigenesis. *Experimental y Molecular Medicine*, 55(8), 1632-1643. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01069-y>
- Li, W., Zhang, X., Sang, H., Zhou, Y., Shang, C., Wang, Y., y Zhu, H. (2019). Effects of hyperglycemia on the progression of tumor diseases. *Journal of Experimental y Clinical Cancer Research*, 38(1), 327. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1309-6>
- Lim, S. L., Ng, C. T., Zou, L., Lu, Y., Chen, J., Bay, B. H., Shen, H.-M., y Ong, C. N. (2019). Targeted metabolomics reveals differential biological effects of nanoplastics and nanoZnO in human lung cells. *Nanotoxicology*, 13(8), 1117-1132. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1640913>
- Liu, H., Doane, T. L., Cheng, Y., Lu, F., Srinivasan, S., Zhu, J.-J., y Burda, C. (2015). Control of Surface Ligand Density on PEGylated Gold Nanoparticles for Optimized Cancer Cell Uptake. *Particle y Particle Systems Characterization*, 32(2), 197-204. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201400067>

- Liu, J. L., Zabetakis, D., Breger, J. C., Anderson, G. P., y Goldman, E. R. (2020). Multi-Enzyme Assembly on T4 Phage Scaffold. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 571. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00571>
- Loredo García, E. (2023). Virus como nanovehículos de moléculas anticancerígenas hidrófobas. [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.]
- Makin, G., y Dive, C. (2001). Apoptosis and cancer chemotherapy. *Trends in Cell Biology*, 11 (11), 22-26. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02124-9](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02124-9)
- Martin, H., Lázaro, L. R., Gunnlaugsson, T., y Scanlan, E. M. (2022). Glycosidase activated prodrugs for targeted cancer therapy. *Chemical Society Reviews*, 51(23), 9694-9716. <https://doi.org/10.1039/D2CS00379A>
- MCF-7 Cells. (2023). *MCF-7 Cells Culture*. MCF-7 Cells. <https://mcf7.com/>
- Medina, P., Favre, G., y Poirot, M. (2004). Multiple Targeting by the Antitumor Drug Tamoxifen: A Structure-Activity Study. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 4(6), 491-508. <https://doi.org/10.2174/1568011043352696>
- Merck. (2023a). *Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína*. Merck. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/d6883>
- Merck. (2023b). *Protocolo del análisis de la viabilidad y la proliferación celulares con MTT*. Merck. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>
- Mikhed, Y., Daiber, A., y Steven, S. (2015). Mitochondrial Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Damage and Their Role in Age-Related Vascular Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15918-15953. <https://doi.org/10.3390/ijms160715918>
- Mishra, D. K., Yadav, K. S., Prabhakar, B., y Gaud, R. S. (2018). Nanocomposite for cancer targeted drug delivery. En *Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery* (pp. 323-337). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813741-3.00014-5>
- Mukerabigwi, J. F., Ge, Z., y Kataoka, K. (2018). Therapeutic Nanoreactors as In Vivo Nanoplatfoms for Cancer Therapy. *Chemistry – A European Journal*, 24(59), 15706-15724. <https://doi.org/10.1002/chem.201801159>
- Nankali, E., Shaabanzadeh, M., y Torbati, M. B. (2020). Fluorescent tamoxifen-encapsulated nanocapsules functionalized with folic acid for enhanced drug delivery toward breast cancer cell line MCF-7 and cancer cell imaging. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 393(7), 1211-1219. <https://doi.org/10.1007/s00210-020-01825-1>
- Nascimento, R. A. S., Özel, R. E., Mak, W. H., Mulato, M., Singaram, B., y Pourmand, N. (2016). Single Cell "Glucose Nanosensor" Verifies Elevated Glucose Levels in Individual Cancer Cells. *Nano Letters*, 16(2), 1194-1200. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b04495>
- Nayak, A. K., y Hasnain, M. S. (Eds.). (2021). *Biomedical Composites: Perspectives and Applications*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-33-4753-3>

- Nelson, D. J., Shagufta, y Kumar, R. (2012). Characterization of a tamoxifen-tethered single-walled carbon nanotube conjugate by using NMR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(3), 771-776. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6181-6>
- Noh, I. (Ed.). (2018). *Biomimetic Medical Materials: From Nanotechnology to 3D Bioprinting* (Vol. 1064). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0445-3>
- Pal, U., Pramanik, S. K., Bhattacharya, B., Banerji, B., y Maiti, N. C. (2015). Binding interaction of a novel fluorophore with serum albumins: Steady state fluorescence perturbation and molecular modeling analysis. *SpringerPlus*, 4(1), 548. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1333-8>
- Papamichael, E. M., Stamatis, H., Stergiou, P.-Y., Foukis, A., y Gkini, O. A. (2019). Enzyme Kinetics and Modeling of Enzymatic Systems. En *Advances in Enzyme Technology* (pp. 71-104). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00003-0>
- Patterson, D. P., Prevelige, P. E., y Douglas, T. (2012). Nanoreactors by Programmed Enzyme Encapsulation Inside the Capsid of the Bacteriophage P22. *ACS Nano*, 6(6), 5000-5009. <https://doi.org/10.1021/nn300545z>
- Pérez Sánchez, J. E. (2019). Cápsides del BMV como nanovehículos de fármacos hidrofóbicos. [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.]
- Pliego Sosa, D. de J. (2020). Design and characterization of multimodality P22 bacteriophage for combinatory therapy of breast cancer. [Tesis de Licenciatura en Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México]
- Pober, J. S., Min, W., y Bradley, J. R. (2009). Mechanisms of Endothelial Dysfunction, Injury, and Death. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4(1), 71-95. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092155>
- Podgórski, R., Wojasiński, M., y Ciach, T. (2022). Nanofibrous materials affect the reaction of cytotoxicity assays. *Scientific Reports*, 12(1), 9047. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13002-w>
- PrévotEAU, A., Courjean, O., y Mano, N. (2010). Deglycosylation of glucose oxidase to improve biosensors and biofuel cells. *Electrochemistry Communications*, 12(2), 213-215. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.11.027>
- Qazi, S., Liepold, L. O., Abedin, M. J., Johnson, B., Prevelige, P., Frank, J. A., y Douglas, T. (2013). P22 Viral Capsids as Nanocomposite High-Relaxivity MRI Contrast Agents. *Molecular Pharmaceutics*, 10(1), 11-17. <https://doi.org/10.1021/mp300208g>
- Quester, K., Juarez-Moreno, K., Secundino, I., Roseinstein, Y., Alejo, K. P., Huerta-Saquero, A., y Vazquez-Duhalt, R. (2017). Cytochrome P450 Bioconjugate as a Nanovehicle for Improved Chemotherapy Treatment. *Macromolecular Bioscience*, 17(5). <https://doi.org/10.1002/mabi.201600374>
- R. A. Olofson, Jonathan T. Martz, Jean-Pierre Senet, Marc Piteau, y Thierry Malfroot. (1984). A new Reagent for the Selective, High-Yield n-Dealkylation of Tertiary Amines: Improved Syntheses of Naltrexone and Nalbuphine. *Journal of Organic Chemistry, American Chemical Society*, 49(11). [https://doi.org/doi:10.1021/JO00185A072/ASSET/JO00185A072.FP.PNG\\_V03](https://doi.org/doi:10.1021/JO00185A072/ASSET/JO00185A072.FP.PNG_V03)

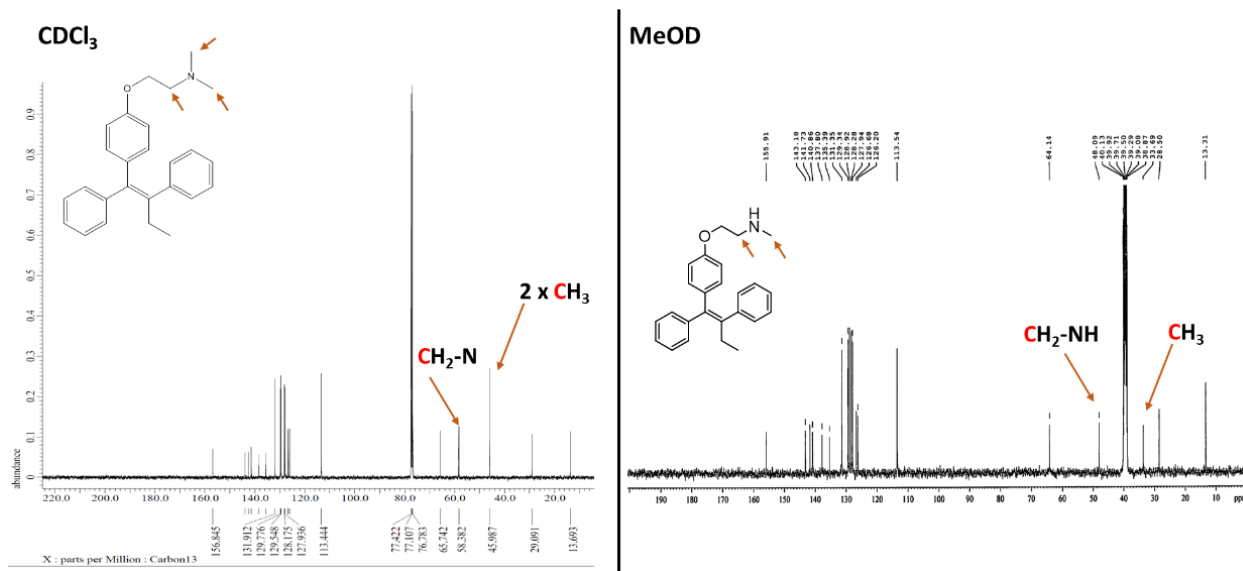
- Ranji-Burachaloo, H., Reyhani, A., Gurr, P. A., Dunstan, D. E., y Qiao, G. G. (2019). Combined Fenton and starvation therapies using hemoglobin and glucose oxidase. *Nanoscale*, *11*(12), 5705-5716. <https://doi.org/10.1039/C8NR09107B>
- Rashid, N., Koh, H. A., Baca, H. C., Li, Z., Malecha, S., Abidoye, O., y Masaquel, A. (2015). Clinical Impact of Chemotherapy-Related Adverse Events in Patients with Metastatic Breast Cancer in an Integrated Health Care System. *Journal of Managed Care y Specialty Pharmacy*, *21*(10), 863-871b. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2015.21.10.863>
- Sánchez-Sánchez, L., Cadena-Nava, R. D., Palomares, L. A., Ruiz-Garcia, J., Koay, M. S. T., Cornelissen, J. J. M. T., y 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>
- Sánchez-Sánchez, L. P. y Rafael Vazquez Duhalt. (2018). *CYP-P22 biocatalytic nanoparticles with cytochrome P450 activity for prodrug activation*. <https://patents.google.com/patent/US20180327780A1/en#citedBy>
- Sánchez-Sánchez, L. P., y Vazquez-Duhalt, R. (2014). Cápsides virales como nanoacarreadores enzimáticos para quimioterapia. *Revista digital inversitaria (UNAM)*, *15*(8). <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num8/art61/>
- Sánchez-Sánchez, L., Tapia-Moreno, A., Juarez-Moreno, K., Patterson, D. P., Cadena-Nava, R. D., Douglas, T., y Vazquez-Duhalt, R. (2015). Design of a VLP-nanovehicle for CYP450 enzymatic activity delivery. *Journal of Nanobiotechnology*, *13*(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0127-z>
- Sanyakamdhorn, S., Agudelo, D., Bekale, L., y 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>
- Sanyakamdhorn, S., Agudelo, D., y Tajmir-Riahi, H. A. (2017). Review on the targeted conjugation of anticancer drugs doxorubicin and tamoxifen with synthetic polymers for drug delivery. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *35*(11), 2497-2508. <https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1222971>
- Sergio Picazo-Vela y Luis Ricardo Hernández. (2020). *Technology, Science, and Culture: A Global Vision, Volume II*. <https://www.intechopen.com/books/10151>
- Sharifi, M., Sohrabi, M. J., Hosseinali, S. H., Hasan, A., Kani, P. H., Talaei, A. J., Karim, A. Y., Nanakali, N. M. Q., Salihi, A., Aziz, F. M., Yan, B., Khan, R. H., Saboury, A. A., y Falahati, M. (2020). Enzyme immobilization onto the nanomaterials: Application in enzyme stability and prodrug-activated cancer therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*, *143*, 665-676. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.064>
- Shende, P., y Shah, P. (2021). Carbohydrate-based magnetic nanocomposites for effective cancer treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*, *175*, 281-293. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.044>
- Shihan, M. H., Novo, S. G., Le Marchand, S. J., Wang, Y., y Duncan, M. K. (2021). A simple method for quantitating confocal fluorescent images. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *25*, 100916. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100916>

- Shin, E., y Koo, J. S. (2021). Glucose Metabolism and Glucose Transporters in Breast Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 728759. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.728759>
- Shukla, S., Hu, H., Cai, H., Chan, S.-K., Boone, C. E., Beiss, V., Chariou, P. L., y Steinmetz, N. F. (2020). Plant Viruses and Bacteriophage-Based Reagents for Diagnosis and Therapy. *Annual Review of Virology*, 7(1), 559-587. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-010720-052252>
- Singh, P., Youden, B., Yang, Y., Chen, Y., Carrier, A., Cui, S., Oakes, K., Servos, M., Jiang, R., y Zhang, X. (2021). Synergistic Multimodal Cancer Therapy Using Glucose Oxidase@CuS Nanocomposites. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 13(35), 41464-41472. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c12235>
- Somvanshi, P. R., y Venkatesh, K. V. (2013). Hill Equation. En *Encyclopedia of Systems Biology* (pp. 875-876). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7\\_325](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7_325)
- Tafoya Romo, P. (2017). Diseño de nanopartículas virales con actividad citocromo P450 con NADPH como fuente de electrones. [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.]
- Tapia-Moreno, A., Juarez-Moreno, K., Gonzalez-Davis, O., Cadena-Nava, R. D., y Vazquez-Duhalt, R. (2017). Biocatalytic virus capsid as nanovehicle for enzymatic activation of Tamoxifen in tumor cells. *Biotechnology Journal*, 12(6), 1600706. <https://doi.org/10.1002/biot.201600706>
- Tapia-Moreno, A. (2015). Funcionalización y direccionamiento de partículas tipo virus del bacteriófago P22 con actividad citocromo P450. [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.]
- Tejeda-Rodríguez, J. A., Núñez, A., Soto, F., García-Gradilla, V., Cadena-Nava, R., Wang, J., y Vazquez-Duhalt, R. (2019). Virus-Based Nanomotors for Cargo Delivery. *ChemNanoMat*, 5(2), 194-200. <https://doi.org/10.1002/cnma.201800403>
- Tian, G., Zhang, X., Gu, Z., y Zhao, Y. (2015). Recent Advances in Upconversion Nanoparticles-Based Multifunctional Nanocomposites for Combined Cancer Therapy. *Advanced Materials*, 27(47), 7692-7712. <https://doi.org/10.1002/adma.201503280>
- Tran, P., Lee, S.-E., Kim, D.-H., Pyo, Y.-C., y Park, J.-S. (2020). Recent advances of nanotechnology for the delivery of anticancer drugs for breast cancer treatment. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 50(3), 261-270. <https://doi.org/10.1007/s40005-019-00459-7>
- Vivo-Llorca, G., Morellá-Aucejo, Á., García-Fernández, A., Díez, P., Llopis-Lorente, A., Orzáez, M., y Martínez-Mañez, R. (2022). Horseradish Peroxidase-Functionalized Gold Nanoconjugates for Breast Cancer Treatment Based on Enzyme Prodrug Therapy. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 17, 409-422. <https://doi.org/10.2147/IJN.S323802>
- Walther, R., Rautio, J., y Zelikin, A. N. (2017). Prodrugs in medicinal chemistry and enzyme prodrug therapies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 118, 65-77. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.06.013>
- Wang, C., Yang, J., Dong, C., y Shi, S. (2020). Glucose Oxidase-Related Cancer Therapies. *Advanced Therapeutics*, 3(10), 2000110. <https://doi.org/10.1002/adtp.202000110>

- Wang, M., Wang, D., Chen, Q., Li, C., Li, Z., y Lin, J. (2019). Recent Advances in Glucose-Oxidase-Based Nanocomposites for Tumor Therapy. *Small*, 15(51), 1903895. <https://doi.org/10.1002/sml.201903895>
- Wilkerson, J. W., Yang, S.-O., Funk, P. J., Stanley, S. K., y Bundy, B. C. (2018). Nanoreactors: Strategies to encapsulate enzyme biocatalysts in virus-like particles. *New Biotechnology*, 44, 59-63. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.04.003>
- World Health Organization. (2022). *Cancer*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- World Health Organization. (2023). *WHO launches new roadmap on breast cancer*. World Health Organization. <https://www.who.int/news/item/03-02-2023-who-launches-new-roadmap-on-breast-cancer#:~:text=WHO%20launches%20new%20roadmap%20on%20breast%20cancer%203,2.5%20million%20lives%20from%20breast%20cancer%20by%202040.>
- Wu, Y., Yang, H., y Shin, H.-J. (2013). Viruses as self-assembled nanocontainers for encapsulation of functional cargoes. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 30(7), 1359-1367. <https://doi.org/10.1007/s11814-013-0083-y>
- Xu, G., y McLeod, H. L. (2001). Strategies for Enzyme/Prodrug Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 7, 3314–3324.
- Yu, J., Qian, C., Zhang, Y., Cui, Z., Zhu, Y., Shen, Q., Ligler, F. S., Buse, J. B., y Gu, Z. (2017). Hypoxia and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Dual-Sensitive Vesicles for Enhanced Glucose Responsive Insulin Delivery. *Nano Letters*, 17(2), 733-739. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b03848>
- Yu, X., Weng, Z., Zhao, Z., Xu, J., Qi, Z., y Liu, J. (2022). Assembly of Protein Cages for Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 14(12), 2609. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122609>
- Yu, Z., Zhou, P., Pan, W., Li, N., y Tang, B. (2018). A biomimetic nanoreactor for synergistic chemiexcited photodynamic therapy and starvation therapy against tumor metastasis. *Nature Communications*, 9(1), 5044. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07197-8>
- Zhang, R., Feng, L., Dong, Z., Wang, L., Liang, C., Chen, J., Ma, Q., Zhang, R., Chen, Q., Wang, Y., y Liu, Z. (2018). Glucose y oxygen exhausting liposomes for combined cancer starvation and hypoxia-activated therapy. *Biomaterials*, 162, 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.02.004>
- Zhao, W., Hu, J., y Gao, W. (2017a). Glucose Oxidase–Polymer Nanogels for Synergistic Cancer-Starving and Oxidation Therapy. *ACS Applied Materials y Interfaces*, 9(28), 23528-23535. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b06814>
- Zhao, W., Hu, J., y Gao, W. (2017b). Glucose Oxidase–Polymer Nanogels for Synergistic Cancer-Starving and Oxidation Therapy. *ACS Applied Materials y Interfaces*, 9(28), 23528-23535. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b06814>

## Anexos

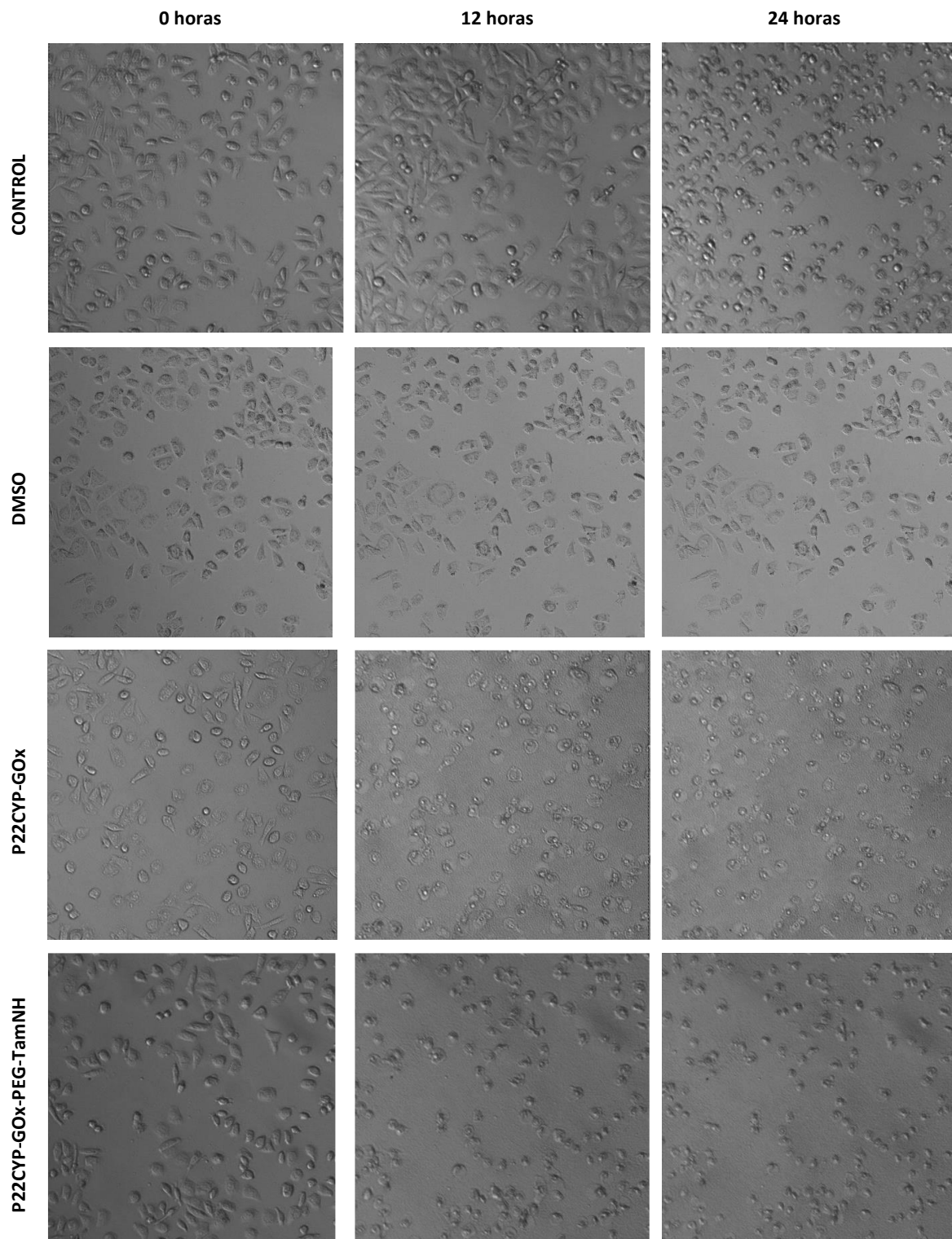
### Anexo A



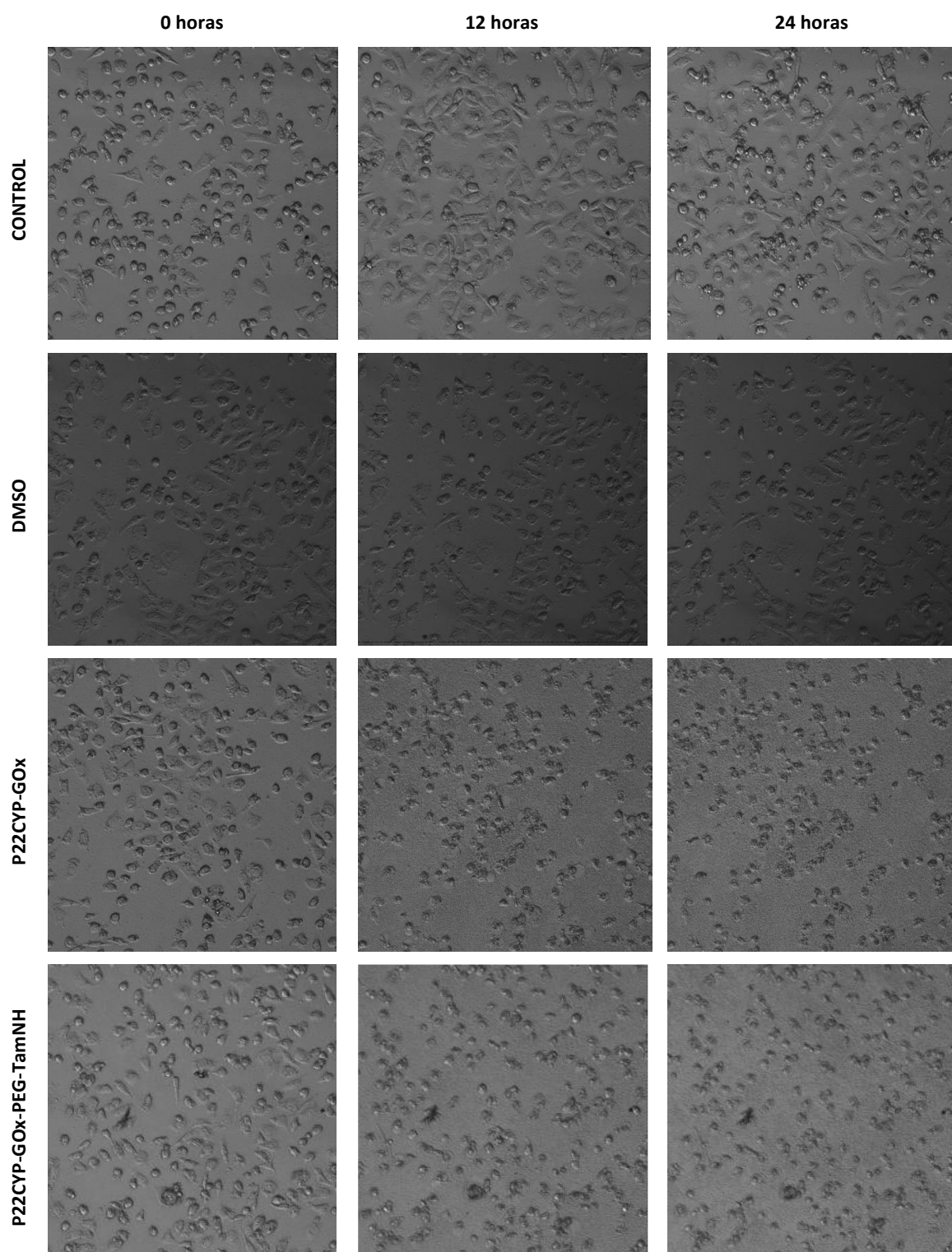
**Figura 38.** Espectro RMN de carbono. Comparación del espectro del tamoxifeno y el producto desmetilado (TamNH). Se ha resaltado C en rojo, ya que se muestra las posiciones máximas del carbono.



## Anexo B



**Figura 39.** Comparación del tiempo de exposición de los tratamientos en células MCF-7 a 0, 12 y 24 horas de incubación en ausencia de glucosa.



**Figura 40.** Comparación del tiempo de exposición de los tratamientos en células MDA-MB-231 a 0, 12 y 24 horas de incubación en ausencia de glucosa.