

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 SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

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**

**VLP's que contienen nanopartículas mesoporosas de sílice con
moléculas quimioterapéuticas: ATRA y ChMAP-28**

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

Presenta:

Milton Daniel Naranjo Mendoza

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Milton Daniel Naranjo Mendoza

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Director de tesis

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier

Dr. José Manuel Romo Herrera



Dra. Catalina López Bastidas
Coordinadora del Posgrado en Nanociencias

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Milton Daniel Naranjo Mendoza** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

**VLP's que contienen nanopartículas mesoporosas de sílice con moléculas quimioterapéuticas:
ATRA y ChMAP-28**

Resumen aprobado por:

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Director de tesis

La leucemia promielocítica aguda (LPA) es un subtipo de leucemia mieloide aguda que, hasta el siglo pasado, era uno de los cánceres más agresivos y con mayor morbilidad. Aunque actualmente este tipo de cáncer puede ser curable, su tratamiento sigue presentando desafíos clínicos y económicos. Uno de los principales problemas es la aparición del síndrome del ácido retinoico, un efecto secundario del tratamiento con *ácido holo-trans-retinoico* (ATRA), que a menudo debe administrarse en dosis elevadas para mejorar la respuesta terapéutica. A diferencia de otros tipos de cáncer, la LPA no permite tratamientos localizados, ya que el tumor es líquido y hay pocos tratamientos dirigidos disponibles. En este trabajo de investigación se desarrolló un sistema nanométrico (nanosistema) híbrido basado en partículas tipo virus (VLP) a partir de la proteína de cápside (CP) del virus del mosaico del bromo (BMV) y nanopartículas de sílice mesoporosa (MSN) para el transporte de ATRA. También se probó que las partículas híbridas (VLP-MSN) pueden ser modificadas superficialmente para mejorar su selectividad hacia las células de LPA mediante la funcionalización con el péptido ChMAP-28 demostrando que la cobertura con proteína de cápside del BMV tiene la ventaja de actuar como una plataforma para realizar modificaciones superficiales en el nanosistema. Para el desarrollo de este nanovehículo se sintetizaron partículas MSN de 20 nm, a partir un método sol-gel modificado con un alto rendimiento de nanopartículas monodispersas (0.5 mg/mL). Además, se reporta por primera vez la síntesis de VLP's con MSN como cargo, logrando su encapsidación y generando partículas tipo virus con un rango de tamaño entre 19 y 36.5 nm, con un tamaño promedio de 28 nm, similar al virus nativo. Así también, se demostró que las VLP-MSN cargadas con ATRA pueden liberarlo de manera prolongada en medio salino pH 7.4 a 36°C *in vitro*, mostrando un mecanismo de liberación bifásica. La síntesis de este nanosistema y los resultados obtenidos en este trabajo de investigación abren la oportunidad para futuros estudios que guíen al posible uso terapéutico.

Palabras clave: Nanopartícula tipo virus, Leucemia promielocítica aguda, Virus de mosaico del bromo, Liberación prolongada, Péptido anticancerígeno

Abstract of the thesis presented by **Milton Daniel Naranjo Mendoza** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

VLP's containing mesoporous silica nanoparticles with chemotherapeutic molecules: ATRA and ChMAP-28

Abstract approved by:

Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Thesis Director

Acute promyelocytic leukemia (APL) is a subtype of acute myeloid leukemia that, until the last century, was one of the most aggressive and high-morbidity cancers. Although this type of cancer is now potentially curable, its treatment still poses clinical and economic challenges. One of the main issues is the occurrence of retinoic acid syndrome, a side effect of treatment with all-trans retinoic acid (ATRA), which often requires high doses to enhance therapeutic response. Unlike other types of cancer, APL does not allow localized treatments as the tumor is liquid, and few targeted treatments are available. This research developed a nanometric system (nanosystem) based on virus-like particles (VLP) derived from the capsid protein (CP) of brome mosaic virus (BMV) and mesoporous silica nanoparticles (MSN) for transporting ATRA. It was also demonstrated that the hybrid particles (VLP-MSN) can be surface modified to enhance their selectivity toward APL cells through functionalization with the ChMAP-28 peptide. This modification shows that the capsid protein of BMV serves as a platform to perform superficial nanosystem adjustments. To develop this nanocarrier, MSN particles of 20 nm were synthesized using a modified sol-gel method with a high yield of monodisperse nanoparticles (0.5 mg/mL). Additionally, this research reports for the first time the synthesis of VLPs with MSN as cargo, achieving encapsidation and generating virus-like particles ranging in size from 19 to 36.5 nm, with an average size of 28 nm, similar to the native virus. Furthermore, it was demonstrated that VLP-MSN loaded with ATRA could release the drug in a prolonged manner in saline medium at pH 7.4 and 36°C *in vitro*, exhibiting a biphasic release mechanism. The synthesis of this nanosystem and the findings of this research pave the way for future studies that could lead to its therapeutic application.

Keywords: Virus Like Nanoparticle, Acute promyelocytic leukemia, Brome mosaic virus, Extended release, Anticancer peptide

Dedicatoria

A mi madre por estar ahí para guiarme, acompañarme y motivarme. A mi familia, en especial a todos mis sobrinitos; Paloma, Santiago, Nicolás, Valentín, Bruno, Jesús, Gael, Adrián, Alondra, Julián. La ciencia que hago pretende iluminar el camino a un mundo mejor en el que puedan vivir. A mis hermanos por todo lo bueno y malo que conlleva la fraternidad. A Mitzi especialmente por lo anterior descrito y porque es un recordatorio constante que existe gente bondadosa y noble en el mundo. A la humanidad porque la ciencia siempre ha buscado mejorar la vida de las personas.

Agradecimientos

Agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por el apoyo económico brindando durante estos dos años a través del programa de becas nacionales PNPB.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por haberme aceptado como estudiante de maestría en su institución y por permitirme realizar parte de mis experimentos en su departamento de Innovación Biomédica.

Al Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM, por facilitarme sus instalaciones durante la realización de este proyecto de tesis y por el apoyo a través del proyecto UNAM DGAPA PAPIIT: IT101822 y IV100124.

A mi director de tesis, el Dr. Rubén Cadena, quien me brindó su dirección, conocimiento y valiosas discusiones y portaciones.

Al Dr. Óscar González Davies y la M.C Itandehui Betanzo por su valioso apoyo técnico.

A mis compañeros de laboratorio, Mariana, Oscar, Manuel, Ely, Carlos, el Dr. Oscar Davies, Kim, Matías y Marlon por hacer la estancia llevadera y convertirse en amistades que espero perduren en el tiempo.

A Jaime “el Chino” por refugiarnos en su mesita y darnos café y postres.

A mi hermano Alfonso por su interés en mi proyecto y por compartir el tiempo durante mi etapa en la maestría. A Kyoshi por llenar de paz la casa. A mi madre por todo el esfuerzo que hizo para que yo llegara a este punto.

A Benito Antonio Martínez Oasio por acompañarme en los ratos de trabajo y poner el ambiente. Por sus sabias palabras siempre.

Al arte y el deporte. A Naruto y a Cristiano que me han inspirado desde que soy niño y ha forjado en mí gran parte de mi personalidad y me ha enseñado el valor de la perseverancia y de nunca renunciar a mi palabra.

Y por último y no menos importante: A mí mismo por lograr realizar este proyecto de tesis en condiciones desafiantes. Por no rendirme y superar mis límites.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Cánceres sanguíneos.....	1
1.2 Leucemia promielocítica aguda.....	3
1.3 Efectos secundarios de los tratamientos y las vías de administración convencionales	3
1.4 Péptidos anticancerígenos	5
1.5 Sílice mesoporosa como biomaterial	6
1.6 Virus del mosaico del bromo y sus aplicaciones biomédicas.....	7
1.7 Antecedentes	9
1.7.1 Leucemia promielocítica aguda y hematopoyesis	9
1.7.2 Quimioterapias para cánceres hematológicos.....	11
1.7.3 Nanopartículas de sílice mesoporosa para la entrega de agentes quimioterapéuticos ...	13
1.7.4 Encapsidación de nanopartículas.....	14
1.7.5 Catelicidinas y su actividad citotóxica	14
1.8 Justificación	15
1.9 Hipótesis.....	16
1.10 Objetivos	16
1.10.1 Objetivo general.....	16
1.10.2 Objetivos específicos.....	16

Capítulo 2.	Metodología	17
2.1	Síntesis y caracterización de MSN.....	17
2.1.1	Caracterización de nanopartículas mesoporosas de sílice.....	17
2.2	Cargado de nanopartículas mesoporosas de sílice	18
2.3	Producción y purificación del virus de mosaico del bromo (BMV)	18
2.4	Purificación de la proteína de cápside del BMV.....	21
2.5	Ensamble de VLP's con núcleo de sílice mesoporosa	22
2.6	Funcionalización de VLP'S	22
2.7	Cinética de liberación de VLP-MSN@ATRA.....	23
Capítulo 3.	Resultados.....	24
3.1	Síntesis y caracterización de MSN.....	24
3.2	Cargado de nanopartículas mesoporosas de sílice	26
3.3	Producción y purificación del virus de mosaico del bromo (BMV)	27
3.4	Purificación de la proteína de cápside del BMV.....	28
3.5	Ensamble de nanopartículas	28
3.6	Funcionalización de VLP's	31
3.7	Cinética de liberación	33
Capítulo 4.	Discusión	35
Capítulo 5.	Conclusiones.....	40
	Literatura citada	41
	Anexos	53

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Casos de leucemia reportados en niños y adolescentes a nivel mundial. Elaborado a partir de los datos de GLOBOCAN (2022).	2
Figura 2. Supervivencia relativa a 5 años para cánceres hematológicos malignos por tipo de cáncer. Elaborado con datos de U.S Cancer Statistics, (2024).....	2
Figura 3. Mecanismos de acción de péptidos catiónicos anticancerígenos..	6
Figura 4. Plantas de cebada infectadas con BMV.	19
Figura 5. Esquema gráfico del proceso de extracción de virus.	21
Figura 6. Micrografía TEM de nanopartículas mesoporosas de sílice.....	25
Figura 7. Tamaño de nanopartículas mesoporosas de sílice.	26
Figura 8. Caracterización de tamaño y arreglo de poro de las MSN-20.....	26
Figura 9. Cargado de ATRA en MSN.	27
Figura 10. Tamaño del virus de mosaico del bromo.	27
Figura 11. Micrografías TEM del Virus de mosaico del bromo.	28
Figura 12. VLP's-MSN.	29
Figura 13. Tamaño de VLP's-MSN.	30
Figura 14. Tamaño de VLP's-MSN cargadas con ATRA.....	30
Figura 15. Espectro de absorbancia del virus nativo y VLP's.	31
Figura 16. Cambios en el potencial Z y movilidad electroforética de las nanopartículas conjugadas..	32
Figura 17. Radio hidrodinámico de las partículas funcionalizadas.	33
Figura 18. Micrografía de las partículas funcionalizadas.	33
Figura 19. Perfil de liberación de ATRA.....	34
Figura 20. Degradación de ATRA liberado en medio salino.....	34
Figura 21. Formación de VLP-MSN.....	53

Lista de tablas

Tabla

Página

Tabla 1. Relaciones de masa para conjugación del ChMAP-28..... 23

Tabla 2. Comparativa de métodos de síntesis para nanopartículas mesoporosas de sílice de 20 nm. 25

Capítulo 1. Introducción

1.1 Cánceres sanguíneos

Los cánceres sanguíneos son un conjunto de enfermedades metabólicas caracterizadas por la pérdida de la homeostasis, la resistencia a la apoptosis y el control en la división celular en los linajes hematopoyéticos como glóbulos blancos y plaquetas (Abbas et al., 2018; Swerdlow et al., 2017). Estas enfermedades incluyen leucemias, linfomas, mielomas y algunos otros tipos de afecciones que categóricamente se encuentran ligadas a lesiones genéticas. Al igual que en cualquier otro tipo de cáncer, la interacción de los factores genéticos e inmunológicos con el ambiente es crucial para la aparición de los trastornos metabólicos y la pérdida de homeostasis celular (Gui et al., 2022; Swerdlow et al., 2017).

Frecuentemente se refiere a las células que han perdido la capacidad de atender a la apoptosis e invadir tejidos cercanos o diseminarse como células “malignas”. La agresividad de un cáncer es dependiente en gran medida de la gravedad y la cantidad de las lesiones genéticas que las células malignas presenten (Swerdlow et al., 2017). Algunas de las lesiones genéticas más frecuentes llevan al desarrollo de diferentes tipos en las leucemias (Méndez-Ferrer et al., 2020). Actualmente, las leucemias ocupan el 4% de los nuevos casos de cáncer (Siegel et al., 2023) en individuos de todas las edades y sexos, sin embargo, en los últimos años, se han posicionado como la principal causa de mortalidad en niños provocada por cáncer a nivel mundial (Vicente-Deñás et al., 2020). En la población pediátrica, las leucemias representan el grupo de cánceres hematológicos más diversos y con mayor incidencia como se muestra en la Figura 1 (Globocan, 2020).

Dentro del grupo de las leucemias, se ha asociado a la leucemia mieloide aguda (LMA) con una prognosis negativa teniendo un 64% de remisión y una esperanza de vida de 5-10 años, comparado con el <90% de remisión y una esperanza de vida más larga en leucemias linfocíticas agudas (ALL) (J. Chen et al., 2019). La Sociedad Americana Contra el Cáncer (ACS) estimó que hubo más 23,000 casos detectados LMA durante el 2023, así como más de 11,000 muertes provocadas por LMA, siendo el tipo de cáncer hematológico con menor tasa de supervivencia relativa a 5 años (Figura 2). Las leucemias mieloides agudas a su vez presentan diferentes subtipos que se clasifican de acuerdo en las células afectadas.

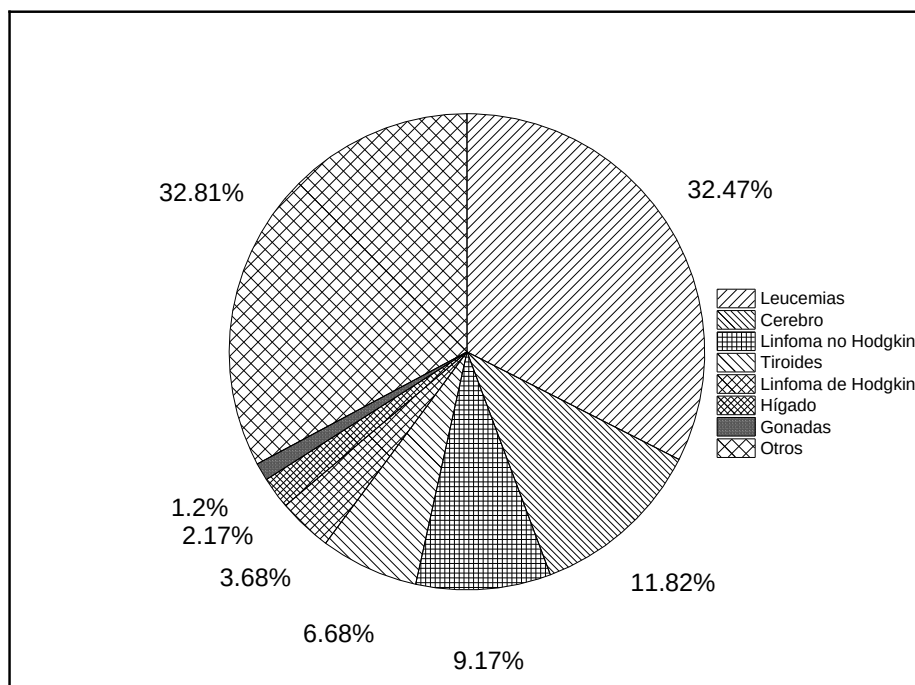


Figura 1. Casos de leucemia reportados en niños y adolescentes a nivel mundial. Elaborado a partir de los datos de GLOBOCAN (2022) para casos pediátricos (1-14 años).

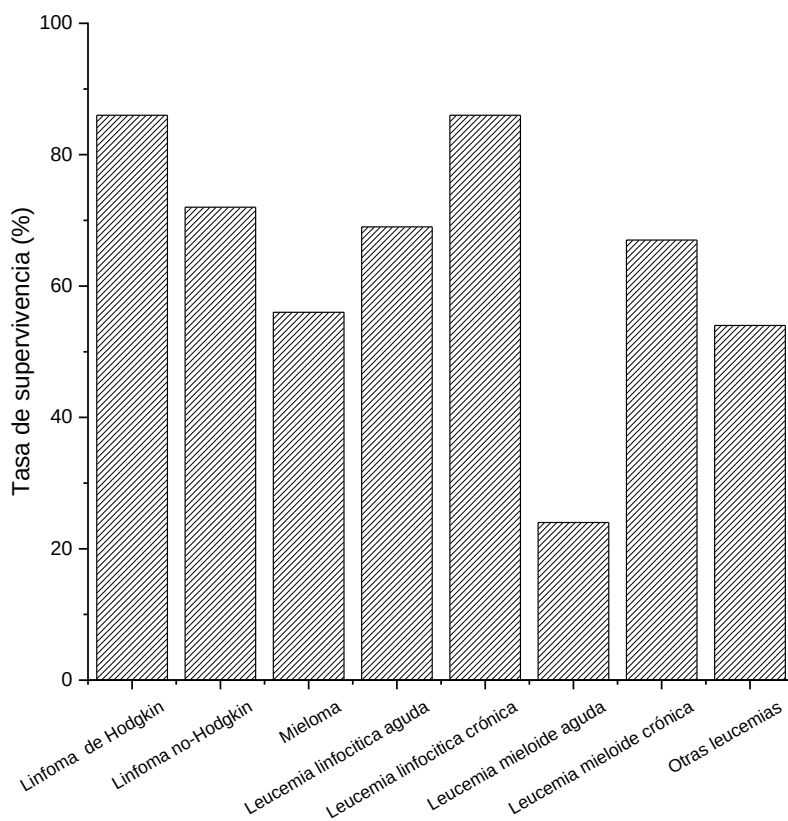


Figura 2. Supervivencia relativa a 5 años para cánceres hematológicos malignos por tipo de cáncer. Las leucemias mieloides agudas presentan la menor tasa de supervivencia con 24%. Elaborado con datos de U.S Cancer Statistics, (2024).

1.2 Leucemia promielocítica aguda

La leucemia promielocítica aguda (LPA) es un subtipo distintivo de las leucemias mieloides agudas (LMA) que ha mostrado un alarmante aumento a nivel mundial en los últimos años (Dong et al., 2020) y resulta especialmente preocupante en México donde se estima una incidencia 35-40%. En México, la incidencia de LPA supera al menos tres veces la registrada en poblaciones caucásicas (Gómez-Almaguer et al., 2017; Ruiz-Argüelles et al., 2004).

En el 98% de los casos de LPA se presenta una mutación característica derivada de la fusión genética entre el gen RARA que codifica para el receptor de ácido retinoico α implicado en la maduración de los promielocitos en glóbulos blancos de manera dependiente de ligando y el gen PML funciona como factor de transcripción y supresor tumoral mediando la respuesta apoptótica. La proteína PML además forma estructuras llamadas “cuerpos de PML”, estructuras nucleares que actúan como sitios de acumulación de proteína que son transcritas en respuesta al estrés celular (Liquori et al., 2020). El resultado del nuevo gen de fusión PML-RARA es una proteína homónima de categoría mutante quimérica con funciones oncogénicas, que favorece la proliferación celular y la permanencia en estado indiferenciado de los promielocitos (De Braekeleer et al., 2014). El uso de El ácido *holo-trans-retinoico* también conocido como ATRA (Acrónimo del inglés; All Trans Retinoic Acid), desde su aprobación por la FDA, se ha convertido en el fármaco principal para el tratamiento de LPA, logrando alcanzar con gran éxito tasas de remisión entre 85%-90% en terapias combinadas (Gallagher, 2002). Anualmente las terapias de LPA generan un gasto aproximado de 24,000 dólares por paciente en China, mientras que en los Estados Unidos puede ascender hasta 136,170 dólares (gastos que incluyen el uso de instalaciones y servicios hospitalarios) complicando el acceso a la terapia debido a sus altos costos, además del rezago que estos tratamientos representan para los pacientes en cuanto a comodidad y calidad de vida (Tallman et al., 2015).

1.3 Efectos secundarios de los tratamientos y las vías de administración convencionales

Dentro de la célula ATRA presenta dos funciones, la primera es suprimir y degradar la proteína quimérica PML-RARA a la vez que promueve la transcripción de los genes silenciados para lograr guiar la diferenciación de los promielocitos controlando la modelación de la cromatina reclutando represores de cromatina como N-CoR/SMRT (Noguera et al., 2019; Tomita et al., 2013).

A pesar de la eficacia del tratamiento con ATRA, su uso presenta dos grandes retos: baja solubilidad en medios acuosos y el rápido desarrollo de resistencia al fármaco. La baja solubilidad del ATRA limita su entrada a la célula por lo tanto la biodisponibilidad es deficiente y los tratamientos administrados requieren altas dosis de este fármaco, lo que guía a el desarrollo del síndrome de diferenciación cuyos efectos secundarios que pueden ser letales. Por otro lado, altos niveles de ATRA inducen a la expresión de citocromo P450 y CYP26A1, ambas, enzimas capaces de metabolizar y degradar el ATRA cuando está libre, reduciendo su actividad terapéutica y generando el efecto de resistencia, por lo que el tratamiento tiene que ser suspendido. Otros mecanismos de resistencia al fármaco sugieren que algunas variantes de la mutación PML-RARA presentan una estructura diferente, lo que impide que ATRA se una adecuadamente a la proteína quimérica. Otra hipótesis sugiere que la biodisponibilidad de ATRA es baja y su entrada a las células es realmente reducida (Gallagher, 2002; Noguera et al., 2019).

En algunos casos la resistencia a la molécula ATRA se supera con un incremento en la dosis, no obstante, el incremento de dosis se asociado con incremento de las enzimas hepáticas y daño renal, así como aumento en efectos colaterales, lo que conlleva a la interrupción de la terapia (Z.-L. Xu & Huang, 2020). Por estos motivos se han buscado estrategias que no suspendan el tratamiento del paciente.

La combinación de terapias es una respuesta bastante popular en los casos de cánceres más agresivos. Generalmente se acompaña la quimioterapia con radioterapia, sin embargo, esto agrava los efectos adversos del tratamiento. Otros tratamientos optan por la inmunoterapia para activar o incrementar la respuesta inmune o bien, incrementar los efectos de la quimioterapia al mejorar la administración del fármaco, sin embargo, aplicar estas estrategias en cánceres sanguíneos supone un reto superior en comparación a aquellos cánceres donde el tumor es sólido, pues los tumores líquidos se encuentran esparcidos en todo el cuerpo y están en constante circulación. Este hecho dificulta el monitoreo del tratamiento, imposibilita la extirpación quirúrgica, el campo de radioterapia tendría que ser total y por lo tanto más agresivo para el paciente, y de la misma manera también limita la administración de fármacos quimioterapéuticos, por ejemplo, no es posible aplicar una inyección intra-tumoral, ya que los tumores líquidos no están confinados a un órgano en específico (J. Chen & Cong, 2023; Lanier et al., 2022; Majeed et al., 2022).

Algunas estrategias modernas usan alternativas nanotecnológicas para tratar los cánceres sanguíneos y de esta manera aumentar la eficiencia de la terapia maximizando los efectos quimioterapéuticos, por ejemplo, con el uso de nanopartículas se incrementa la superficie de contacto, a la vez es posible modificar nanopartículas con moléculas que mejoren la especificidad y alcanzar la entrega dirigida del fármaco a una

célula blanco (Ahmad et al., 2015). A su vez, los nanomateriales pueden ser diseñados para liberar medicamentos de manera prolongada y controlada en blancos terapéuticos, lo que minimiza los efectos secundarios y maximiza la eficacia del tratamiento (Kong et al., 2017).

1.4 Péptidos anticancerígenos

Debido al desarrollo de resistencia de los cánceres a los tratamientos citotóxicos convencionales surge la imperante necesidad de nuevos agentes quimioterapéuticos con mecanismos innovadores que evadan las vías que llevan a la resistencia quimioterapéutica de los cánceres. En esta búsqueda se han explorado una gran variedad de moléculas naturales con actividad citotóxica. Entre los nuevos candidatos, se destacan los péptidos antimicrobianos (PAM). Los PAM se han convertido en una de las alternativas más novedosas y de gran potencial por su alta selectividad citotóxica (Chu et al., 2015; Emelianova et al., 2018; Hoskin & Ramamoorthy, 2008). A diferencia de algunos fármacos citotóxicos, los PAM son polímeros catiónicos constituidos por aminoácidos que actúan a nivel de membrana, la mayoría de PAM anticancerígenos presentan una estructura alfa-hélice y actúan como formadores de poro por la interacción de cargas eléctricas péptido-membrana (Gaspar et al., 2013).

Las células neoplásicas usualmente expresan una gran cantidad de proteoglicanos y otras moléculas de membrana que le otorgan una carga negativa a la cara exterior de la membrana celular (Figura 3), algo similar ocurre con las membranas de bacterias (Gaspar et al., 2013; Hancock & Lehrer, 1998). Esta complementariedad de cargas les permite a los péptidos ser altamente selectivos por las células neoplásicas, y no tanto hacia células normales. No obstante, la mayoría de los péptidos catiónicos son extremadamente susceptibles a la degradación enzimática y a otras tantas condiciones en el medio como el pH y grupos químicos por lo que históricamente no han sido considerados para el desarrollo de fármacos (Choi & Mookherjee, 2012; Gaspar et al., 2013; Mahmoud et al., 2022).

A pesar de estas limitantes, estudios recientes han logrado implementar estrategias para proteger la integridad y función de péptidos. Algunos de estos trabajos optan por conjugar los péptidos a diferentes polímeros o partículas lo que les brinda cierta protección ante los factores antes mencionados, a la vez que puede brindar selectividad a las células cancerosas (Gaspar et al., 2013; Tornesello et al., 2020; Hulla et al., 2015).

Los péptidos parecen ser excelentes candidatos como moléculas quimioterapéuticas, no obstante, debido a la susceptibilidad a ser degradados por enzimas, agentes químicos o hidrólisis, es un hecho que requieren del uso de nanovehículos que los transporte, los proteja y mantenga su funcionalidad.

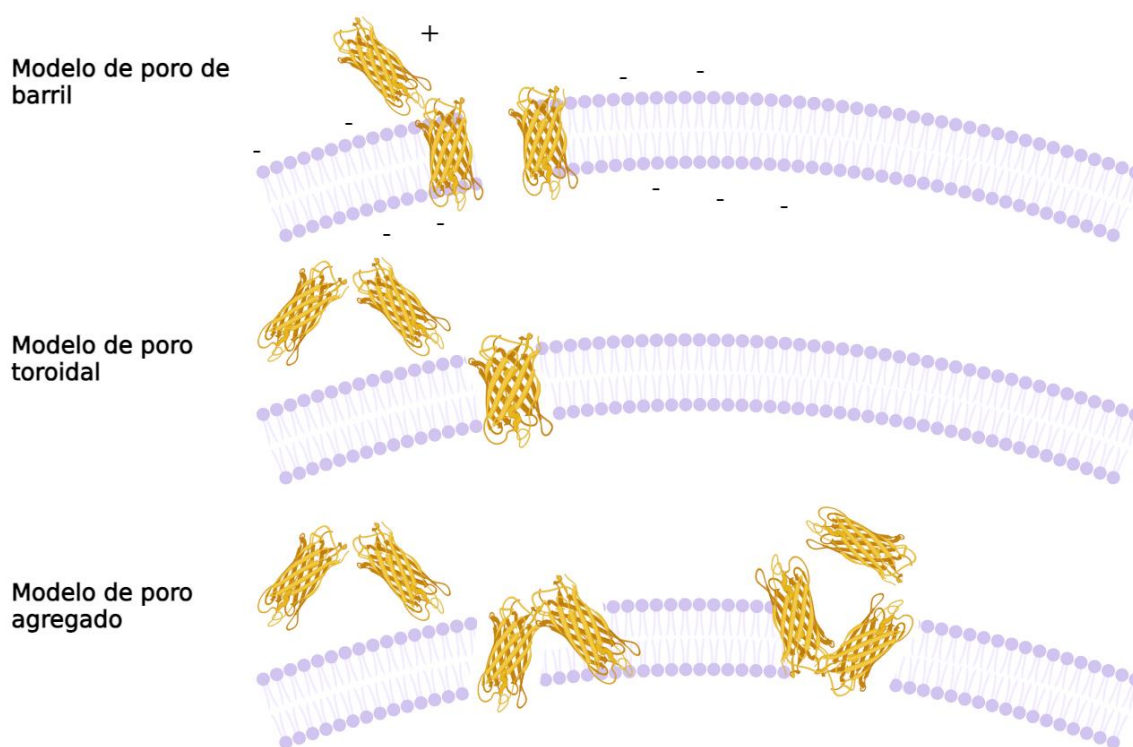


Figura 3. Mecanismos de acción de péptidos catiónicos anticancerígenos. El péptido catiónico (carga positiva) es atrapado en la membrana lipídica de una célula maligna que presenta una carga altamente negativa. El atrapamiento del péptido le permite incrustarse en la membrana y formar diferentes tipos de poros y daños en la membrana celular.

1.5 Sílice mesoporosa como biomaterial

Las nanopartículas mesoporosas de óxido de sílice (SiO_2) o MSN (por sus siglas en inglés; Mesoporous Silica Nanoparticles) son un tipo de nanopartículas biocompatibles y biodegradables cuya síntesis y aplicaciones biomédicas de las MSN representan un campo de estudio amplio en años recientes (Jimenez et al., 2016; Kankala et al., 2022; Watermann & Brieger, 2017). El especial interés en este biomaterial resulta en su capacidad para transportar una gran variedad de cargos terapéuticos (Li et al., 2012a). La incorporación de moléculas de interés tecnológico y biomédico en MSN es independiente de las características electroquímicas, pues ocurre por adsorción y depende principalmente del tamaño de las moléculas que se desean cargar en los poros de la MSN. La modificación del tamaño del poro y ordenamiento de estos es entonces, crucial para incorporar un agente terapéutico. Otros estudios han reportado que las partículas

con diámetros inferiores a 50 nm tienen una mayor capacidad para penetrar en las células y alcanzar el núcleo, lo que las convierte en candidatas óptimas para terapias diseñadas con efectos intracelulares como lo es la terapia con ATRA (Pan et al., 2012). Con el fin de garantizar la retención de la molécula cargada en MSN, se emplean diversos métodos de recubrimiento que funcionen como compuerta para abrir y cerrar los poros en respuesta a un estímulo externo (Q. He & Shi, 2014; Li et al., 2012a). Gracias a estas características de las MSN en diversos estudios se ha reportado con éxito su uso para transportar y mejorar la dosificación de agentes quimioterapéuticos (Chou et al., 2017; Kong et al., 2017; Pan et al., 2012; Popat et al., 2012).

El tamaño de poro de una MSN puede ser ajustado durante la síntesis de la nanopartícula, así como el tamaño de esta. La liberación del fármaco se puede adaptar a través de varios sistemas de control que son, por ejemplo, sensibles al pH o las reacciones de óxido-reducción (Kong et al., 2017; Nie et al., 2020; Popat et al., 2012). En términos de especificidad, las MSN pueden entrar en los tumores de forma pasiva por la permeabilidad mejorada, pero también es posible modificar la superficie una gran variedad de ligandos específicos durante la síntesis (Morelli et al., 2011; Rosenholm et al., 2010). Actualmente, el uso de MSN como transportadores de fármacos se encuentra aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA). Más de 100 formulaciones de MSN se han sometido a estudios preclínicos, cada una de estas con aplicaciones diferentes donde se destacan principalmente estudios de imagen y administración oral de fármacos hidrofóbicos. Dentro de las formulaciones aprobadas se destacan GastroMARK™; umirem® (una formulación del tipo núcleo-coraza de partículas magnéticas recubiertas con óxido de silicio) para estudios de imagen, generalmente aplicado a tumores y NanoTherm® (una formulación núcleo-coraza de óxido de hierro recubierto con aminosilano) para el tratamiento de abrasión de tumores, ambas formulaciones que se encuentran en el mercado. Entre otras formulaciones destacadas se encuentran MSN para la administración de Cornell dots, ibuprofeno y simvastatin (Kirla et al., 2023; Lin et al., 2023; Meola et al., 2021; Phillips et al., 2014; Tan et al., 2014). Estos estudios han probado que las nanopartículas de sílice son seguras para el uso humano.

1.6 Virus del mosaico del bromo y sus aplicaciones biomédicas

El virus de mosaico del bromo (BMV; Brome Mosaic Virus) es un virus que infecta a la planta de cebada, su cápside es de geometría icosaédrica T=3, constituida por 180 proteínas idénticas de 189 aminoácidos cada una, agrupadas en 12 pentámeros y 6 hexámeros que logran la geometría icosaédrica. Las

proteínas de cápside protegen el material genético al ensamblarse alrededor del genoma viral de ARN con carga negativa. Esta capacidad de auto ensamblaje ocurre principalmente por la interacción de cargas electroestáticas entre el material genético de carga negativa y el N-terminal de los residuos de la proteína de cápside de carga positiva (G. He et al., 2021).

Los avances recientes en nanotecnología han mostrado la plasticidad de los virus para ser utilizados para crear plataformas de nanovehículos (Nuñez-Rivera et al., 2020; Schwarz et al., 2017; Shahrivarkevishahi et al., 2022). A partir de las cápsides de virus es posible sintetizar nanopartículas tipo virus (VLP's, por las siglas del inglés: Virus-Like Particle), estas se forman por el ensamblaje de proteínas de su cápside que se organizan en estructuras idénticas a la geometría nativa del virus (Fietze et al., 2016; K. G. Patel & Swartz, 2011; Tejeda-Rodríguez et al., 2019).

Las VLP's generadas a partir de virus de plantas no suponen ningún riesgo para la salud humana y de la misma forma, las VLP's son un transportador óptimo que evita la degradación prematura de fármacos y protege la función de estos (Blandino et al., 2015; Lacasse et al., 2008; Masarapu et al., 2017; Nuñez-Rivera et al., 2020).

Las capacidades de autoensamble de los virus han sido ampliamente estudiadas. Derivado de estos estudios se ha reportado la encapsulación de nanopartículas metálicas (Bognár et al., 2022a, 2022b; Dragnea et al., 2003; Xie et al., 2021). Estos estudios han remarcado que las proteínas de cápside viral pueden ensamblarse alrededor de núcleos con carga negativa, sin importar si estos son moléculas orgánicas o nanopartículas.

Los nano vehículos como las MSN y las VLP's mejoran la biodisponibilidad de los fármacos. Sin embargo, también presentan limitaciones, por ejemplo, las MSN requieren cubiertas protectoras para evitar la degradación temprana por hidrólisis o erosión derivando en ácidos silícicos y asegurar la liberación del cargo solo en su destino. En el caso de las VLP's, solo son capaces de transportar cargos de naturaleza electroestática negativa, por lo las VLP's tienen una gama limitada de moléculas que puede ser encapsuladas (Jolley et al., 2011; Rajagopal et al., 2018; Xie et al., 2021). En la búsqueda para alcanzar mejores opciones terapéuticas, se ha optado por combinar las diferentes estrategias de cada nano vehículo.

Las proteínas de cápside de los virus de plantas se han utilizado para encapsidar o cubrir varios tipos de moléculas y nanopartículas coloidales, sin embargo, no se tiene registro hasta el día de hoy del

encapsulado de MSN. Este trabajo propone utilizar la proteína de cápside del BMV como recubrimiento para nanopartículas mesoporosas de sílice cargadas con ATRA. Además, se pretende aprovechar este recubrimiento para conjugar el péptido catiónico ChMAP-28, que ha demostrado actividad antitumoral selectiva, resultando en la producción de una VLP de sílice mesoporosa conjugada con ChMAP-28

1.7 Antecedentes

1.7.1 Leucemia promielocítica aguda y hematopoyesis

El tejido hematopoyético ha sido ampliamente descrito y el estudio de las enfermedades que lo afectan se ha profundizado a lo largo de los años (Abbas et al., 2018; Swerdlow et al., 2017). A través de estos estudios se ha logrado dilucidar y conocer algunos de los procesos de diferenciación de células de linaje hematopoyético al que se le conoce como hematopoyesis. La hematopoyesis abarca procesos específicos de maduración celular de una célula troncal hematopoyética (CTH) que se convertirá principalmente en una célula de los siguientes tres grupos de células: plaquetas que se originan del proceso de trombopoyesis, glóbulos rojos resultado de la eritropoyesis y glóbulos blancos que se derivan de la linfopoyesis, monocitopoyesis y la granulopoyesis (Abbas et al., 2018; Doulatov et al., 2012).

El proceso de diferenciación es único para cada tipo de célula y es guiado por las marcas epi-genéticas, las interacciones en su microambiente y factores de crecimiento como citocinas y hormonas. Es importante entender que todas las células que conforman a un individuo presentan el mismo genoma, pero la diferencia entre las células gira en torno al conjunto de genes que expresa, a su vez, estos genes pueden ser “encendidos” o “apagados” por diferentes señales del microambiente como citocinas, hormonas o señales fisicoquímicas de células vecinas a las que la célula receptora puede responder con la transcripción de genes (Abbas et al., 2018; Park & Bejar, 2020).

Una CTH inicialmente se diferencia en dos grupos de células pluripotenciales; Los precursores comunes mieloides y los precursores comunes linfoides. Algunas células precursoras comunes linfoides se diferencian directamente en células dendríticas, pero otras se diferencian en linfoblastos los cuales maduraran para convertirse en linfocitos B, linfocitos T o células natural killer. Todas las células que resultan de la diferenciación de los precursores comunes linfoides están comprometidas con funciones del sistema inmune. En la otra línea, los precursores mieloides se diferencian inicialmente a megacarioblastos,

promieloblastos y mieloblastos. Los megacarioblastos darán origen a las plaquetas, y los promieloblastos a los glóbulos rojos, mientras que los mieloblastos pasan a ser monoblastos o promielocitos. Los monoblastos sólo dan origen a mielocitos, pero los promielocitos que pueden dar origen a tres tipos diferentes tipos de células: basófilos, eosinófilos o neutrófilos (Abbas et al., 2018; Scott F. Gilbert, 2013). La LPA se origina cuando los promielocitos son incapaces de continuar con su proceso de diferenciación y se dividen de manera descontrolada, dando origen a un tumor en la médula.

Durante la década de 1950, los hematólogos Jean Bernard y Marcel Bessis se dedicaron a estudiar lo que consideraban una nueva variante de la LMA, que resultaba ser más agresiva. Los cuadros clínicos de la LPA se caracterizaban por ser más graves que los de LMA, con síntomas de sangrado anormal y alteraciones en la coagulación. Estos síntomas eran tan agresivos que, durante los primeros meses, la enfermedad presentaba una alta tasa de mortalidad.

No obstante, a los avances de Bernard y Bessis, no fue hasta 1957 cuando se reportó por primera vez de manera distintiva la LPA en la revista *acta medica escandinava* (Hillestad, 1957). Hillestad se había dedicado a estudiar la morfología celular y su trabajo demarcaba una alta cantidad de promielocitos atípicos provenientes de la médula ósea. Dos años más tarde Bernard publicó una descripción clínica más detallada sobre la enfermedad analizando 20 casos clínicos (Bernard et al., 1959). Posteriormente en 1977 Janet Rowley describió la presencia de la mutación de traslocación recíproca $t(15;17)$, distintiva de LPA. Este descubrimiento implicó la participación de causas genéticas este tipo de leucemia.

Hacia 1990, se identificó el gen RARA en el locus 17q21 y al gen PML en el locus 15q22 como los genes involucrados en la traslocación previamente descrita por Rowley (Borrow et al., 1992; Brand et al., 1988). El gen RARA codifica la proteína del receptor de ácido retinoico-alfa, el cual es el segundo receptor de ácido retinoico identificado en humanos. Este receptor es crucial para el proceso de hematopoyesis ya que la proteína RARA se une al complejo correpresor nuclear (N-CoR) formando heterodímeros y controlando la transcripción de genes. La proteína RARA libera al complejo N-CoR en respuesta al ATRA, permitiendo la transcripción de los genes que lideran la diferenciación de los promielocitos (Busby & Burris, 2012; Z. Chen & Chen, 1992).

Por otro lado, las funciones del gen PML permaneció incierta en los inicios de la enfermedad. A inicios del siglo XXI se confirmó que PML codifica para una proteína supresora de tumores y a la vez, PML es un proto-oncogen involucrado en la división celular como parte de la familia de proteínas TRIM (Ferbeyre et al., 2000; Fogal, 2000; Zhong et al., 2000). PML también juega un papel importante en la apoptosis celular

vía p53, capturando la proteína en los cuerpos nucleares de PML y regulando la estabilidad, así como la activación de la proteína junto con Mdm2. Esta activación de p53 ocurre en los eventos de daño al material genético, la activación transcripcional de p53 y en la inducción de genes diana de p53 como *Bax* y *P21*.

La formación del gen de fusión PML-RARA impide el funcionamiento correcto de los dos genes implicados, en su lugar genera una proteína quimérica oncogénica que como consecuencia pierde la capacidad de liberar el complejo N-CoR, impidiendo la transcripción de genes que lideran la diferenciación de los promielocitos (Alcalay et al., 1992; Z. Chen & Chen, 1992). Al mismo tiempo, la fusión provoca que sea imposible cuerpos nucleares de PML, confiriendo resistencia a la apoptosis a las células con la mutación (Fogal, 2000; Zhong et al., 2000). Como consecuencia de la mutación, eventualmente se crea una acumulación de estas células inmaduras en la médula ósea que deriva en un tumor bastante agresivo.

1.7.2 Quimioterapias para cánceres hematológicos

El surgimiento de la quimioterapia es uno de los mayores hitos en la lucha contra el cáncer que ha permitido reducir la mortalidad de una gran variedad de cánceres, sobre todo aquellos en los que la extirpación del tumor resulta difícil o no es factible (Galmarini et al., 2012; Swerdlow et al., 2017). El surgimiento de los compuestos quimioterapéuticos fue de alguna manera accidentado: A inicios del siglo XX se descubrieron, sintetizaron y emplearon diversos compuestos químicos derivados de la aminopterina y el gas mostaza de nitrógeno con propósitos bélicos, no obstante, a mitad de siglo estos compuestos se pudieron adaptar para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades (Galmarini et al., 2012; Goodman et al., 1946).

En 1946, Louis Goodman y Alfred Gilman se enfocaron a estudiar los compuestos derivados del gas mostaza nitrógeno y de la aminopterina. Probaron los compuestos en linfoma de Hodgkin, linfosarcoma y en las leucemias del tipo mieloide aguda, linfocítica aguda y linfoblástica. Encontraron que los compuestos eran citotóxicos, y además también inhibían el crecimiento celular (Goodman et al., 1946)

Los compuestos probados por Goodman y Gilman son la primera aplicación quimioterapéutica para cánceres, a la vez que son la primera aplicación quimioterapéutica para cánceres sanguíneos. A partir de entonces, otras moléculas fueron exploradas a lo largo del siglo buscando efectos de citotoxicidad e inhibición de crecimiento en tumores (Hannun, 1997). Desde el siglo pasado se han realizado esfuerzos en investigación farmacológica que como consecuencia han logrado ampliar el repertorio de moléculas

quimioterapéuticas y en la actualidad existe una gran variedad de tratamientos quimioterapéuticos para cánceres sanguíneos (Galmarini et al., 2012; Hannun, 1997).

Muchos de los agentes quimioterapéuticos son generalistas, es decir, son utilizados para diversos tipos de cáncer. La doxorubicina es uno de los agentes quimioterapéuticos recetados para leucemias, linfomas y otros tipos de cáncer de tumor sólido como cáncer de mama, cáncer de hígado y cáncer de pulmón. Su función es la de una antraciclina que impide la replicación del ADN actuando como agentes intercalantes, inhibiendo la función de la topoisomerasa para desenrollar las cadenas de ADN impidiendo de esta manera la replicación del material genético o la transcripción de genes (A. G. Patel & Kaufmann, 2012; Speth et al., 1988). También se ha observado que las antraciclinas aumentan la cantidad de radicales libres de especies reactivas del oxígeno, lo que genera daño directo al ADN y a proteínas (Beretta & Zunino, 2007; Galmarini et al., 2012). Otros de los compuestos quimioterapéuticos ampliamente utilizados en el tratamiento de leucemias son los taxanos (Budman et al., 1997; Ireland & Pittman, 1995; Rowinsky et al., 1989), moléculas cuyo mecanismo antiproliferativo se centra en desestabilizar los microtúbulos que forman el citoesqueleto, impidiendo la división celular y provocando que la célula entre en apoptosis al incrementar el estrés celular, aunque también puede inducir la apoptosis vía activación del receptor Toll-Like Receptor 4 (Lim et al., 2022; Rajput et al., 2013).

En la LPA el principal agente quimioterapéutico es el trióxido de arsénico (ATO, del inglés, arsenic trioxide). Este compuesto ha sido utilizado con propósitos medicinales al menos desde la dinastía Zhou (1046-256 a.c) y como agente quimioterapéutico para leucemias desde 1930, cuando Forkner y McNair reportaron su eficacia terapéutica para el tratamiento de Leucemia mieloide crónica. El ATO actúa como un inhibidor no competitivo a GTP que se une a la tubulina uniéndose a dos residuos de cisteína y de manera subsecuente se activa una cascada de transcripción de genes apoptóticos es activada (Mahinpour et al., 2009). En APL, ATO se une a la proteína mutante PML-RARA generando cambios conformacionales que guían a las proteínas mutantes a formar oligómeros que son degradados vía SUMOización y ubiquitinación (Zhang et al., 2010). La actividad quimioterapéutica del ATO se reportó desde 1970, no obstante, la FDA aprobó su uso para LPA hasta el año 2000 (Y. Chen et al., 2012).

Desde su uso combinado con ATRA, el ATO ha logrado una remisión superior al 90% en los pacientes con LPA, no obstante, en pacientes denominados de alto riesgo el tratamiento no presenta la misma eficacia. Para tratar a los pacientes de LPA de alto riesgo se ha complementado el tratamiento estándar de ATRA-ATO con gemtuzumab ozogamicin (GO), un anticuerpo-fármaco que se une al receptor CD33, lo que mejora la especificidad a la vez que el ozogamicin se une al ATO como agente quimioterapéutico (Lancet

et al., 2020). Aunque los agentes quimioterapéuticos han mejorado el tratamiento de los cánceres aún existen oportunidades de mejora (Q. He & Shi, 2014; Lancet et al., 2020). En el caso de la LPA es valioso buscar nuevas moléculas o estrategias que mejoren el efecto quimioterapéutico y la selectividad a células cancerosas.

1.7.3 Nanopartículas de sílice mesoporosa para la entrega de agentes quimioterapéuticos

Las nanopartículas de sílice mesoporosa (MSN) fueron por primera vez reportadas en 1967 por el grupo de De Vries, logrando una patente tres años más tarde. Dos décadas después, en Japón se sintetizaron partículas mesoporosas de sílice de manera convergente (Yanagisawa et al., 1990). No obstante, la explotación de este tipo de partículas ocurrió en los laboratorios de la empresa Mobil, buscando la creación de nuevos tipos de aceite para motores de autos. Mobil rebautizó las nanopartículas como MCM-41, acrónimo de los laboratorios dónde se sintetizaron (Mobil Composition Matter) y el número 41, el número de ensayo. Durante las décadas siguientes las nanopartículas de sílice fueron utilizadas como vehículos para transportar diferentes tipos de fármacos (Iturrioz-Rodríguez et al., 2019; Li et al., 2012b; Morelli et al., 2011).

El diseño de estos vehículos para moléculas de interés biomédico debe incorporar características importantes como la biocompatibilidad, la liberación del fármaco y la especificidad. Las MSN reúnen todas las características deseadas para un sistema de transporte de fármacos; son biodegradables, son biocompatibles, pueden modificarse en toda la superficie para ser específicas. Durante el diseño se puede manipular características de la partícula como el tamaño de poro o diámetro para lograr una liberación controlada, así como también pueden ser sintetizadas con recubiertas sensibles a estímulos como el cambio de pH para reducir efectos secundarios y además presentan carga superficial (Argyó et al., 2014; Watermann & Brieger, 2017).

Una gran diversidad de sistemas para la entrega de fármacos quimioterapéuticos utiliza MSN por sus características y relativamente sencilla manipulación. Recientemente Kong (2017) sintetizó partículas de sílice mesoporosa, de 140-200 nm para co-encapsular dos agentes quimioterapéuticos; ATRA y doxorubicina (DOX) junto con interleucina-2, una proteína ligada a la estimulación del sistema inmune. Se evaluó la capacidad del sistema para liberar los cargos terapéuticos *in vitro* por separado y co-

encapsulados a pH 7.4 y p.H 6.8. Este tabajo demostró la que las MSN lograron una liberación controlada del ATRA, así como el resto de los cargos terapéuticos en respuesta al pH.

1.7.4 Encapsidación de nanopartículas

Las partículas tipo virus o VLP's son básicamente proteínas de la cápside viral capaces de auto ensamblarse alrededor de una partícula o moléculas de interés biotecnológico. Dragnea et al. (2003) aprovecharon los principios de autoensamblaje de las proteínas de la cápside del BMV para encapsidar nanopartículas aniónicas de oro de 2.5-4.5 nm.

Años más tarde Jolley et al. (2011), lograron la encapsidación de partículas de TiO_2 que también presentan carga negativa y años después, se reportó la encapsidación nanopartículas plasmónicas de oro de hasta 40 nm utilizando virus del moteado clorótico del caupí (CCMV)(Durán-Meza et al., 2020) el cual es un virus de geometría icosaédrica con características semejantes al BMV. Todos estos trabajos demuestran que las cápsides de virus icosaédricos que infectan plantas son útiles para encapsidar moléculas que presentan carga negativa. Como se mencionó previamente, las MSN poseen todas las características de las nanopartículas coloides encapsidadas, sin embargo, aún no se ha reportado VLP's con MSN.

1.7.5 Catelicidinas y su actividad citotóxica

Las catelicidinas son un grupo de péptidos catiónicos con actividad lítica para diferentes tipos de células. Las catelicidinas forman parte del sistema inmune de mamíferos donde fueron identificadas por primera vez en las células mieloides de la médula ósea. Las catelicidinas forman poros en la membrana celular y provocan la muerte de las células. La actividad citotóxica de las catelicidinas se ha evaluado en células eucariotas y se ha asociado a la inducción de necrosis.

Las catelicidinas han sido utilizadas en tratamientos para cáncer como agentes citotóxicos y de soporte al sistema inmune, regulando procesos como la inflamación (Choi & Mookherjee, 2012). La actividad anticáncer de estos péptidos ha sido evaluada en diferentes tipos de cáncer con resultados prometedores. Niemirowicz y colaboradores (2015) diseñaron un sistema con nanopartículas magnéticas para mejorar el contacto del péptido LL-37 a células de cáncer de colon, logrando una mejora considerable en la inducción apoptosis.

Recientemente se ha reportado que otra catelicidina, la CATH-1, proveniente del pollo, presenta actividad citotóxica para líneas celulares de cáncer de mama y colon (Mahmoud et al., 2022).

Así también, Emelianova et al. (2018) reportaron la actividad citotóxica y altamente selectiva a células cancerígenas de la catelicidina proveniente de la cabra ChMAP-28. En los ensayos *in vitro* realizados sobre la línea HL-60 de leucemia promielocítica aguda, ChMAP-28 mostró una citotoxicidad ampliamente selectiva a las células cancerígenas en comparación a las células control utilizadas (fibroblastos HEF) y un bajo nivel de hemólisis ($\leq 10\%$) en concentraciones menores a 10 μM . El estudio también reveló que el mecanismo por el cual el ChMAP-28 induce la muerte celular es la necrosis, la cual se produce por la formación de poros en la membrana celular. Con estos resultados, ChMAP-28 se posiciona como un péptido prometedor para su uso terapéutico en cáncer.

1.8 Justificación

El tratamiento estándar de la leucemia promielocítica aguda es la quimioterapia con ATRA. Este tratamiento conlleva a efectos secundarios y en muchos casos se desarrolla resistencia al tratamiento. Una manera de disminuir los efectos secundarios es el uso de nano vehículos que permiten la entrega dirigida y la liberación controlada a células blanco. El uso de nanopartículas mesoporosas de sílice permite transportar una mayor cantidad de moléculas y, al mismo tiempo, asegura una liberación prolongada dentro de la célula. El recubrimiento con proteína de cápside viral pretende proteger la integridad de la nanopartícula cargada con las moléculas ATRA, evitar la liberación prematura del fármaco y además de proporcionar una plataforma para conjugar el péptido ChMAP-28, facilitando la entrega dirigida a las células malignas. Asimismo, se aprovecha la capacidad de este péptido para formar poros en la membrana celular, lo que puede guiar a la lisis celular en las células malignas o bien, facilitar la entrada de la VLP a la célula.

Este proyecto de investigación tiene como objetivo desarrollar un modelo de entrega dirigido, buscando la liberación prolongada de ATRA para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda. La producción de VLP's de sílice mesoporosa con actividad quimioterapéutica, específicamente ATRA y ChMAP-28, representa un avance significativo en el diseño de nanosistemas innovadores para el tratamiento del cáncer.

1.10 Hipótesis

La proteína de cápside del virus de mosaico del bromo atrapará a las nanopartículas de sílice mesoporosa cargadas con *ácido holo-trans-retinoico* (ATRA) para formar partículas tipo virus que podrán ser conjugadas superficialmente con el péptido catiónico ChMAP-28 en la superficie de la VLP.

1.11 Objetivos

1.11.1 Objetivo general

Desarrollar un sistema de nanopartículas tipo virus de sílice mesoporosa cargadas con ATRA y conjugadas con el péptido anticancerígeno ChMAP-28 diseñado para el potencial tratamiento de la leucemia promielocítica aguda.

1.11.2 Objetivos específicos

Producir, purificar y caracterizar el virus de mosaico del bromo (BMV)

Sintetizar y caracterizar nanopartículas de sílice mesoporosa cargadas con *ácido holo-trans retinoico* (ATRA)

Purificar proteína de cápside del virus del bromo (BMV)

Recubrir las nanopartículas de sílice mesoporosa con proteína de cápside

Identificar los límites físicos de la proteína de cápside para recubrir nanopartículas

Analizar la eficiencia de liberación de ATRA del sistema de nanopartículas

Conjugar el péptido ChMAP-28 en la superficie de la VLP

Capítulo 2. Metodología

2.1 Síntesis y caracterización de MSN

Para la síntesis de las MSN se probaron 3 protocolos para la síntesis de nanopartículas con un tamaño de ≈ 20 nm. Para seleccionar uno de los métodos probados se consideró su rendimiento, uniformidad de partícula y tamaño de partícula. El primer protocolo utilizó Tetratilosilicato (TEOS) $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich) como precursor de silicio, y la síntesis se realizó a temperatura ambiente con una fase previa de disolución de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) 0.2 mM $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich), en una solución de hidróxido de amonio (NH_2OH) 0.02 mM a 30°C por 30 min. La reacción de síntesis se realizó a temperatura ambiente por 24 h a 550 rpm (Jimenez et al., 2016). En el segundo método de síntesis se agregó CTAB como plantilla 55 mM y se utilizó tetrametilosilicato (TMOS) 1mM $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich) como fuente de silicio, administrado por goteo y trietanolamina 2 mM $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich), la reacción de síntesis se realizó a 90°C por 2.5 h a 1500 rpm (Urata et al., 2009). El tercer método también utilizó TMOS 15 mM $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich) ya que ha mostrado ser un precursor más estable para formar partículas pequeñas (Ma et al., 2013; Nandy et al., 2014; Yamada et al., 2013) y se agregó CTAB 11 mM, con el objetivo de aumentar la porosidad de las partículas se utilizó trietilamina $\geq 98\%$ (Sigma Aldrich) a 25 mM (Nandy et al., 2014) cambiando la temperatura de reacción así como el tiempo de síntesis propuestos por Jiménez y Urata a 60°C durante al menos 12 h y 600 rpm. Todas las síntesis utilizaron CTAB para la formación de micelas que sirven de andamio para la formación de la membrana mesoporosa de SiO_2 . Para remover la plantilla de CTAB de todas las síntesis realizadas se llevaron a cabo lavados por diálisis contra una solución de etanol (EtOH) 50% v/v y ácido acético 0.7% v/v por tres días o hasta obtener una lectura de potencial Z negativa superior a -20 mV cambiando la solución diariamente por una solución fresca. Las partículas fueron filtradas utilizando papel filtro Whatman® no.1 y posteriormente recuperadas y almacenadas en EtOH 50%.

2.1.1 Caracterización de nanopartículas mesoporosas de sílice

El tamaño y carga de las partículas obtenidas fueron determinadas por dispersión dinámica de luz y medición de potencial Z con el equipo Malvern Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments Ltd.) y observadas en microscopio electrónico de transmisión (TEM) Hitachi H-7500. El rendimiento de la síntesis se calculó a partir del peso seco de nanopartículas lavadas y se dividió entre el volumen de síntesis inicial (100 mL). La

concentración de partículas por mililitro se estimó usando la herramienta de calculadora de utilidades de concentración del software Malvern Zetasizer (Malvern Instruments Ltd.) (Nobbmann, 2022). Las micrografías obtenidas fueron analizadas con el software ImageJ[®] para conocer su diámetro. Las partículas que mostraron tamaño y formas deseadas, mayor monodispersidad, bajos índices de agregación, así como mejor rendimiento fueron seleccionadas para determinar su tamaño poro por absorción de nitrógeno utilizando el método Brunauer-Emmett-Teller (BET) y también se les realizó un análisis de difracción de rayos x en polvo (XDR) (Philips X'pert MPD) para conocer el ordenamiento de los poros de la muestra.

2.2 Cargado de nanopartículas mesoporosas de sílice

Para el cargado de las partículas mesoporosas con *ácido holo-trans-retinoico* (ATRA) $\geq 98\%$ (MedChemExpress) se agregó 2.5 mg de las nanopartículas en una solución super saturada de ATRA en 7 mg/mL disuelto EtOH 50% v/v y DMSO ($\geq 98\%$ Sigma Aldrich) 50% v/v, se llevó a sonicación en baño por 3 horas cubierta de la luz y posteriormente se incubó durante toda la noche en agitación rotatoria. La purificación de las partículas se realizó por extracción liquido-liquido agregando un volumen de agua y posteriormente se centrifugó a 8000xg para precipitar los agregados de ATRA y recuperar el sobrenadante con las nanopartículas cargadas. Los excesos de DMSO, así como de remanentes de ATRA fueron eliminados por diálisis contra una solución de agua desionizada y EtOH 50% usando una membrana con corte de 14kDa por 4 h.

La cantidad de ATRA cargada se determinó por espectroscopía de luz visible utilizando un espectrofotómetro Lambda 25 (Perkin Elmer[®]). Para los cálculos se consideró el área bajo la curva de los espectros obtenidos. La eficiencia de cargado se determinó a partir del ATRA residual por la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de cargado} = \frac{\text{Masa alimentada} - \text{Masa residual}}{\text{Masa alimentada}} \times 100 \quad (1)$$

2.4 Producción y purificación del virus de mosaico del bromo (BMV)

La producción de BMV se realizó por medio de infección en plantas de la cebada (*Hordeum vulgare*) por herida física. Las plantas fueron cultivadas en macetas y regadas con 50 mL de agua destilada cada tercer día cuidando mantener un nivel de humedad uniforme en cada maceta. La infección de las plantas se realizó transcurridas tres semanas de crecimiento a partir de la cosecha, donde se provocaron heridas mecánicas a por abrasión con una fibra metálica superfina hasta el nivel de la epidermis en las hojas. En cada herida formada se depositó y distribuyó suavemente 20 μ L de una solución de inoculación que contenía fosfato monosódico (NaH_2PO_4) 0.01 M y cloruro de magnesio (MgCl_2) 0.01 M a pH 6.0 previamente preparada a una concentración de 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BMV. En los días siguientes se monitoreó meticulosamente el estado de salud de las hojas. Una vez que las hojas mostraban manchas amarillas y/o hojas pálidas características de la clorosis (Figura 4), las hojas fueron recolectadas cortando cuidadosamente desde la base del peciolo evitando lastimar la yema axilar y posteriormente se pesaron para almacenarse a -20°C .



Figura 4. Plantas de cebada infectadas con BMV. Patrón clorótico en plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) tras quince días de inoculación del virus de mosaico del bromo (BMV). Se observan manchas amarillas y decoloración en las hojas infectadas.

Para la extracción del virus se preparó una solución amortiguadora de extracción a partir de 500 mL de una mezcla compuesta por acetato de magnesio ($\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) 10 mM, acetato de sodio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$) 0.25 M y cloruro de magnesio (MgCl_2) 10 mM. A esta solución se le agregó una cantidad de 70 μL de β -

mercaptoetanol $\geq 99.0\%$ (Bio-Rad) completamente disuelta a en agua estéril, pH 5.5 (ajustado con ácido acético).

La maceración se realizó en licuadora procesando 250 g de hojas infectadas con 500 mL de la solución de extracción previamente enfriada a 4°C. El proceso de maceración en licuadora se realizó por tandas, en la primera tanda se agregaron 50 g de hojas y 250 mL de solución amortiguadora y molió por pulsos de 30 segundos para evitar el calentamiento hasta obtener una mezcla mayormente acuosa, el resto de las hojas y solución amortiguadora fueron incorporados en tandas de 50 g de hoja y 50 mL de solución amortiguadora. La mezcla obtenida se filtró con una gasa para separar los residuos sólidos. Sobre el líquido recolectado se añadió 200 mL de cloroformo frío y se dejó en agitación por 10 min para separar la clorofila y la fase orgánica. La mezcla con cloroformo se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min a 4 °C en una centrifuga Beckman, JXN-26 con el rotor JA-14. El sobrenadante fue recolectado y centrifugado a las mismas condiciones para eliminar residuos sólidos. Tras la segunda centrifugación se recuperó el sobrenadante y se dejó en agitación por 12-16 h con 0.02 M de NaCl y 10% de PEG-8000 (p/v) a 4 °C. Transcurrido el tiempo de agitación se tomó la solución y se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min a 4 °C en la centrifuga Beckman, JXN-26 con el rotor JA-14 donde se obtuvo un botón de virus precipitado por el PEG-8000 y fue resuspendido en 50 mL de solución amortiguadora de acetatos SAMA: Acetato de magnesio ($\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) 8 mM y acetato de sodio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$) 0.05 M, pH 4.6 ajustado con ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$).

Una vez totalmente disuelto el pellet, la solución se dividió en volúmenes de 25 mL en tubos open top thickwall 38 mL para ultracentrífuga Beckman Optima XPN-100. A los tubos se les añadió 4 mL de sacarosa al 10% al fondeo del tubo para ser usado como colchón, posteriormente se balancearon las muestras y se centrifugó en el rotor SW-32 Ti a 32,000 rpm durante 2 horas y 30 min a 4 °C. Al finalizar, el pellet obtenido fue recuperado y resuspendido con 10 mL de solución amortiguadora SAMA en cada tubo y posteriormente fraccionado en tubos de micro centrifuga para cuantificar la concentración por espectroscopía de luz visible considerando la absorbancia obtenida a 260 nm de los ácidos nucleicos y posteriormente almacenar el virus.

La concentración y pureza del virus se cuantificó por espectrofotometría UV-Vis a 260 para el RNA y 280 nm para las proteínas con ayuda del Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) y dividiendo los valores entre el coeficiente de extinción del virus (5.15). El almacenamiento se realizó en ultracongelación a -80°C . Este proceso se muestra en la Figura 5.

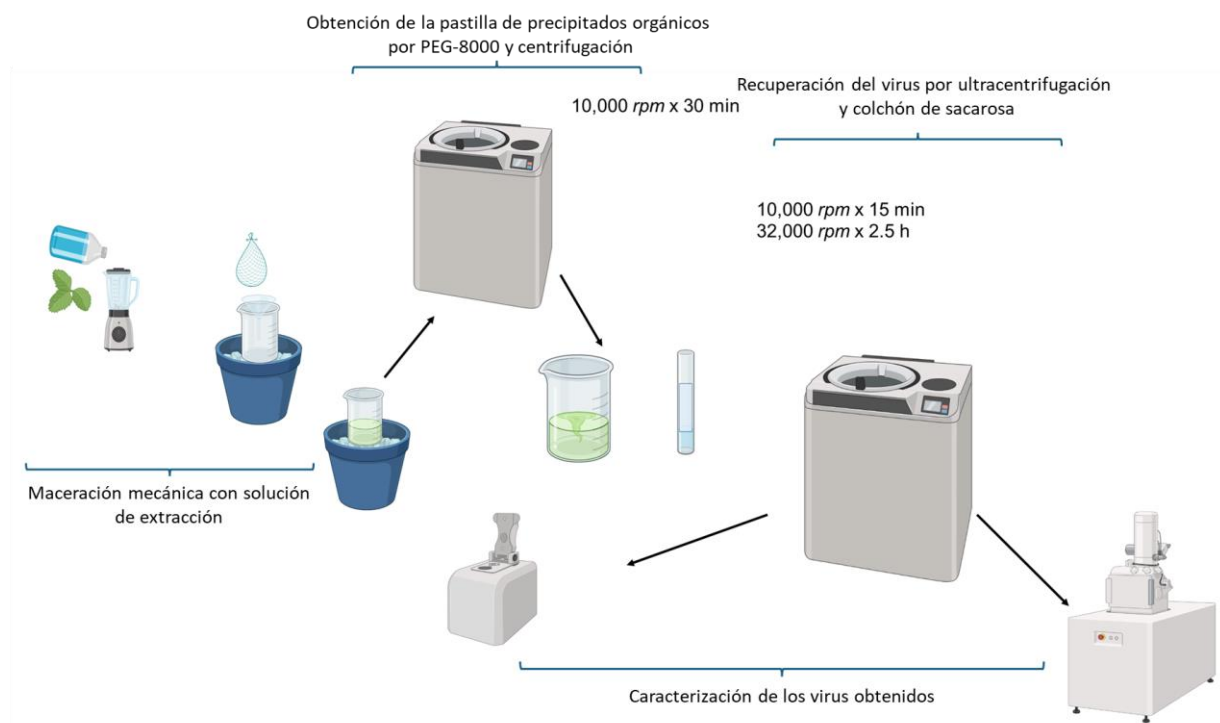


Figura 5. Esquema gráfico del proceso de extracción de virus. Las hojas infectadas con BMV se molieron en solución de extracción, se filtraron los residuos sólidos con gasa y el filtrado fue transferido a vasos de precipitado donde se añadió PEG-8000 para lograr la precipitación de los compuestos orgánicos por centrifugación. Una vez obtenida una pastilla de compuestos orgánicos fue resuspendida y se recuperó el virus mediante ultracentrifugación utilizando un colchón de sacarosa. Finalmente se caracterizaron los virus obtenidos.

2.5 Purificación de la proteína de cápside del BMV

Para la obtención y purificación de la proteína de cápside se desensambló el virus nativo por diálisis contra una solución amortiguadora de desensamble cloruro de calcio (CaCl_2) 0.5 M + Tris 10 mM, pH 7.4 por 24 h a 4 °C hasta que se mostrase una fase lechosa correspondiente al material genético precipitado por la concentración de sales. Con intención de separar el material genético, de la fase acuosa que contenía la proteína de cápside la muestra fue posteriormente centrifugada a 12,000 rpm por 10 min en centrifuga de mesa MicroCL 17 (Thermo Scientific™), se recuperó la fase acuosa que contenía la proteína de cápside y posteriormente esta fue ultra centrifugada en utilizando el rotor a 90-Ti a 44,000 rpm en ultracentrífuga XPN-100 por 2 horas y posteriormente se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la concentración y pureza de la proteína. La concentración se cuantificó por espectrofotometría UV-Vis y se consideró el coeficiente extinción de la proteína (0.82) a 280 nm y la pureza se obtuvo dividiendo los valores de absorbancia a 260/280 nm.

2.6 Ensamble de VLP's con núcleo de sílice mesoporosa

Inicialmente se ensamblaron las MSN vacías obtenidas de las 3 síntesis para seleccionar una de estas candidatas para posteriormente ser cargadas con ATRA y ensambladas. Para lograr el ensamble de las nanopartículas de sílice mesoporosa vacías y cargadas con ATRA se mezcló en un tubo la proteína de cápside y las nanopartículas en suspensión utilizando una relación de masa 30:1 (proteína de cápside-MSN), la mezcla posteriormente se dializó durante la noche en una solución amortiguadora de ensamble: cloruro de sodio (NaCl) 50 mM, cloruro de potasio (KCl) 10 mM, cloruro de magnesio (MgCl_2) 5 mM, DTT 1 mM y Tris-HCl 50 mM, pH 7.2. Después se realizó una segunda diálisis contra una solución amortiguadora ácida de acetatos SAMA (50 mM acetato de sodio, 8 mM acetato de magnesio, pH 4.6) durante 8 horas y finalmente se realizó una nueva diálisis de la muestra contra solución amortiguadora de ensamble. Todos los experimentos de diálisis se realizaron a una temperatura de 4 °C utilizando una membrana de diálisis con un límite de corte de 14 kDa. Para confirmar la formación de VLP's se hicieron mediciones en DLS y se tomaron micrografías de los productos obtenidos. La concentración de ATRA en las VLP-MSN@ATRA se determinó por espectroscopía de luz visible a una longitud de onda de 343, para confirmar que la señal obtenida era del ATRA se realizó una deconvolución del espectro de absorbancia de las VLP-MSN@ATRA.

Tras el proceso de ensamblaje se observaron las muestras en el microscopio de transmisión electrónica y las micrografías obtenidas fueron analizadas con el software ImageJ[®].

2.7 Funcionalización de VLP'S

El protocolo convencional de funcionalización de virus utiliza la activación de los grupos carboxilos expuestos en el exterior de la cápside (Herrera-Hernández, 2023; Wen et al., 2012),, sin embargo, debido a que la carga positiva del péptido (responsable de su actividad citotóxica) se encuentra mayormente en el extremo N-Terminal la funcionalización de VLP's con ChMAP-28 se realizó con un protocolo preferencial para la activación del C-Terminal de péptido. Esta reacción es de unión directa y consta de dos partes: parte 1) activación de los grupos C-Terminal y parte 2) el anclaje químico del péptido con la cápside. La superficie de la cápside presenta de 6 a 11 sitios aminos disponibles para la bioconjugación por proteína de cápside (Running et al., 2012a). Inicialmente se funcionalizaron dos grupos considerando una relación de exceso molar 1 o 2 moléculas de péptido por proteína de cápside del virus nativo y de la VLP-MSN@ATRA. Para la activación del extremo C-Terminal del péptido se realizó en una mezcla de reacción con los reactivos 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), en

solución amortiguadora PBS de pH 7.4 y se dejó conducir la reacción en agitación rotatoria durante 30 min protegida de la luz a 4 °C. Posteriormente se añadió 1 mg de BMV o de VLP resuspendido en PBS (pH 7.4) con 10% de DMSO. La nueva mezcla fue puesta en agitación rotatoria cubierta de la luz por 3 horas más a 4°C. El volumen final se consideró para que el virus permaneciera a concentración de 0.3 mg/mL de virus nativo o VLP. Transcurrido el tiempo de reacción se diluyó rápidamente la muestra para disminuir el porcentaje total de DMSO a 2.5%. Finalmente, los virus funcionalizados se recuperaron por ultrafiltración utilizando un filtro Amicon (Merck) de 100 kDa. Como productos de esta reacción se obtuvieron las VLP's: VLP-MSN@ATRA-ChMAP-28. Las relaciones másicas de los reactivos se describen en la Tabla 1. Para confirmar la funcionalización se realizó un ensayo de movilidad electroforética en líquido en PBS pH 7.4 y se midió cambios en el potencial Z con el equipo Malvern Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments Ltd). Para descartar que las partículas sufrieran degradación durante el proceso de funcionalización se tomaron micrografías TEM de las muestras.

Tabla 1. Relaciones de masa para conjugación del ChMAP-28.

Reactivo	Tasa molar 1:1 (180 péptidos)	Tasa molar 1:2 (360 péptidos)
ChMAP-28	70 µg	140 µg
EDC	3.8 µg	7.6 µg
NHS	2.25 µg	4.5 µg
BMV o VLP-MSN@ATRA	500 µg	500 µg

2.8 Cinética de liberación de VLP-MSN@ATRA

La cinética de liberación de las VLP's se realizó por difusión pasiva en medio PBS a 37 °C con una agitación a 100 rpm. Los resultados fueron evaluados por espectroscopía de luz visible a 343 nm utilizando espectrofotómetro Lambda 25 (PerkinElmer®) en 5 diferentes puntos hasta cumplir las 8 h. El perfil de liberación se determinó por una regresión lineal con el coeficiente de correlación R^2 y los resultados obtenidos se compararon y ajustaron con modelos descritos en la literatura. Adicionalmente, se observó la degradación del fármaco liberado en la solución amortiguadora de fosfatos salinos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), en un cromatógrafo Agilent serie 1200 a una longitud de onda de 343 nm, correspondiente al pico máximo del ATRA, para detectar esto se empleó un método isocrático descrito para ácidos retinoicos (Tashtoush et al., 2007) utilizando una columna Supelco Ascentis C-18.

Capítulo 3. Resultados

A continuación, se presentan los resultados obtenidos acorde a los objetivos establecidos, así como el análisis de datos que responden las preguntas de investigación planteadas.

3.1 Síntesis y caracterización de MSN

Los tres métodos probados lograron la síntesis de nanopartículas mesoporosas de sílice (Figura 6). No obstante, todos los métodos dieron como resultado tamaños y rendimientos diferentes (Tabla 2). El tamaño de partículas obtenidas por el método de Urata medidas por dispersión dinámica de luz (DLS: Dynamic Light Scattering) encontró un diámetro hidrodinámico promedio de 44.5 ± 14.12 nm, mientras que por TEM se observó que las partículas tenían un rango de tamaño entre 18-80 nm con un tamaño promedio de 50 ± 11.81 nm, cuando lo que se esperaba eran partículas de 20 nm, el índice de polidispersidad (PDI) de estas partículas resultó en 0.05, el rendimiento obtenido en esta síntesis fue de 0.1mg/mL. Las partículas obtenidas por el método de Jiménez mostraron tener un diámetro hidrodinámico promedio de 23.51 ± 10.1 nm, sin embargo, esta medición no correspondía al tamaño observado en las micrografías TEM de 8.23 ± 1.1 y un IDP= 0.02, el rendimiento de esta síntesis resultó en 0.3 mg/mL. Las partículas sintetizadas por el método diseñado para este trabajo obtuvieron un rendimiento superior a los métodos anteriores de 0.5 mg/mL. La consecuente caracterización de las MSN por dispersión dinámica de luz (DLS: Dynamic Light Scattering) encontró un diámetro hidrodinámico promedio de 23.2 ± 5.49 nm y un índice de polidispersidad (IDP) igual a 0.05, mientras que las micrografías de transmisión electrónica mostraron que las partículas tienen un diámetro promedio de 22.06 ± 6.09 nm y un IDP=0.07 (Figura 7). Las partículas se denominaron de acuerdo al tamaño que presentaban como MSN-50, MSN-20 o MSN-8. Las MSN-20 fueron seleccionadas para caracterizar su tamaño de poro por BET y el ordenamiento de los poros por XDR, ya que presentaron una mayor uniformidad de forma y tamaño, así como buena monodispersidad y el radio hidrodinámico era bastante similar con el tamaño encontrado analizando las micrografías TEM. El tamaño de poro obtenido por BET resultó ser de 2.3 nm, mientras que el patrón obtenido por XDR se ajustó a un patrón típico de partícula mesoporosa (Ebrahimi et al., 2022; Mohseni et al., 2015) (Figura 8).

Tabla 2. Comparativa de métodos de síntesis para nanopartículas mesoporosas de sílice de 20 nm

	Jiménez et al.,	Urata et al.,	Método sol-gel modificado
Plantilla	CTAB	CTAB	CTAB
Precursor	TEOS	TMOS	TMOS
Dosificación del precursor	Directo	Goteo	Fluido
Catalizador	Hidróxido de amonio	Trietanolamina	Trietilamina
Temperatura de reacción	Temperatura ambiente (~25°C)	90°C	60°C
Tiempo de síntesis	24 h	2 h	12 h
Tamaño promedio de partícula obtenida	8 nm	50 nm	23 nm
Rendimiento de síntesis (mg/mL)	0.3	0.1	0.5

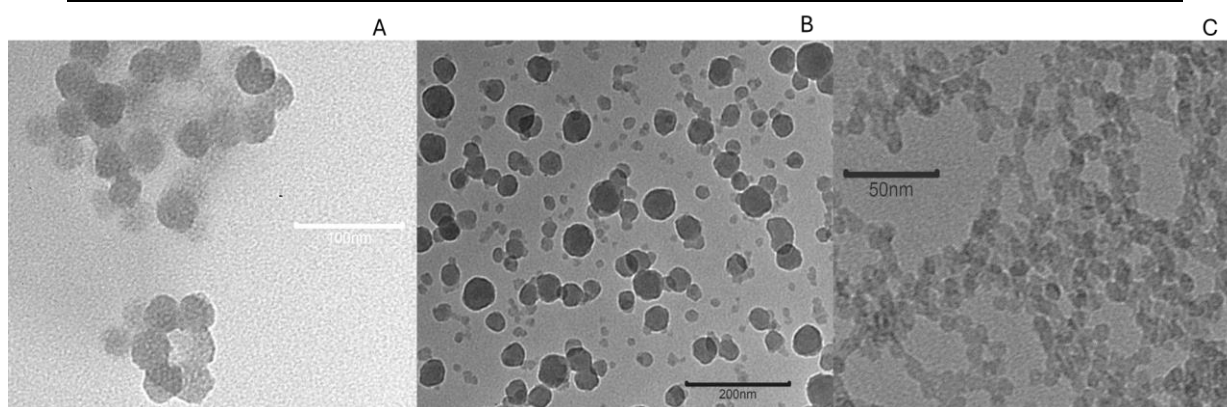


Figura 6. Micrografía TEM de nanopartículas mesoporosas de sílice. Micrografía nanopartículas mesoporosas de sílice. A) Partículas de sílice mesoporosas de aproximadamente 20 nm (MSN-20) obtenidas por el método propio de este trabajo. Magnificación 100 kx. B) Partículas de sílice mesoporosas de aproximadamente 50 nm (MSN-50) obtenidas por el método de síntesis de Urata et al. Magnificación 100 kx. C) Partículas de sílice mesoporosas de aproximadamente 8 nm (MSN-8) obtenidas por el método de síntesis de Jiménez et al. Magnificación 100 kx.

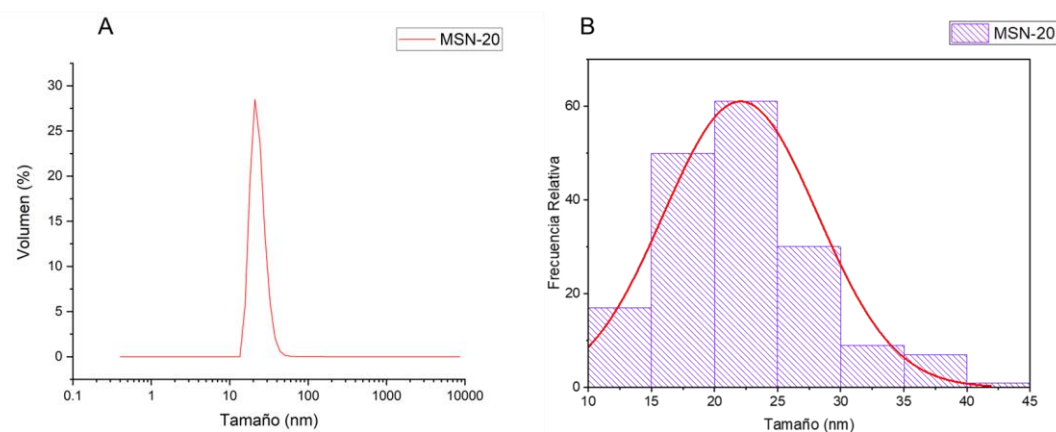


Figura 7. Tamaño de nanopartículas mesoporosas de sílice. A) Diámetro hidrodinámico por número promedio de partícula medida por dispersión dinámica de luz, tamaño promedio= $23.2 \text{ nm} \pm 5.49 \text{ nm}$. B) Histograma de frecuencias de los tamaños medidos en las micrografías TEM, tamaño promedio= $22.06 \pm 6.09 \text{ nm}$.

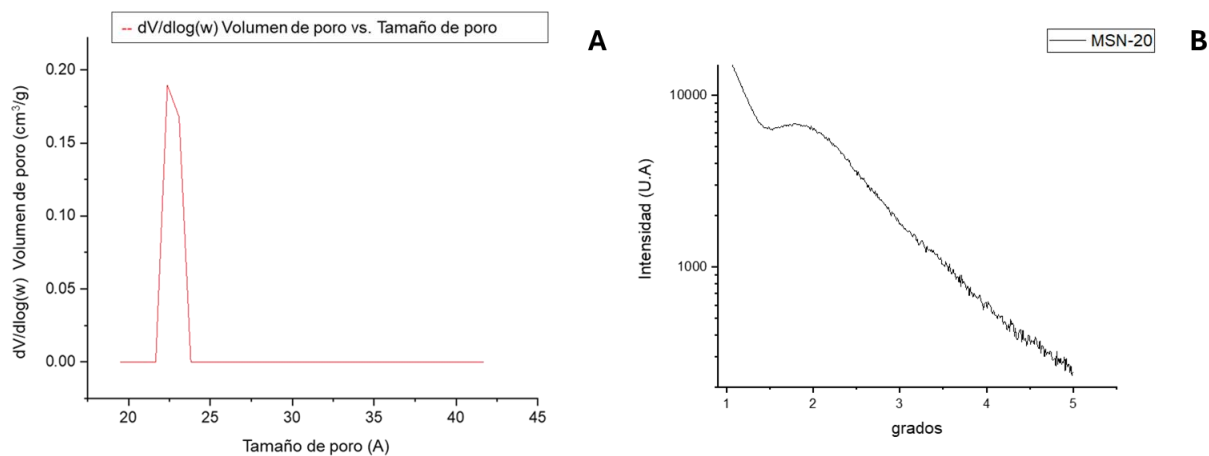


Figura 8. Caracterización de tamaño y arreglo de poro de las MSN-20. A) Distribución de tamaño de poro determinado por BET. El tamaño promedio de poro resultó en 2.33 nm. B) Patrón de distribución de poros determinado por XDR.

3.2 Cargado de nanopartículas mesoporosas de sílice

El protocolo de cargado logró introducir el ATRA en los poros de las nanopartículas dispersas y la cantidad de ATRA cargada fue determinada por espectrofotometría UV-Vis, tras la purificación se obtuvo 27.91 mg de ATRA por mg de MSN lo que corresponde a aproximadamente 2.47×10^{13} nanopartículas de sílice mesoporosa en solución cargadas de ATRA como se muestra en la Figura 9. Se determinó una eficiencia de cargado de 8.6 %.

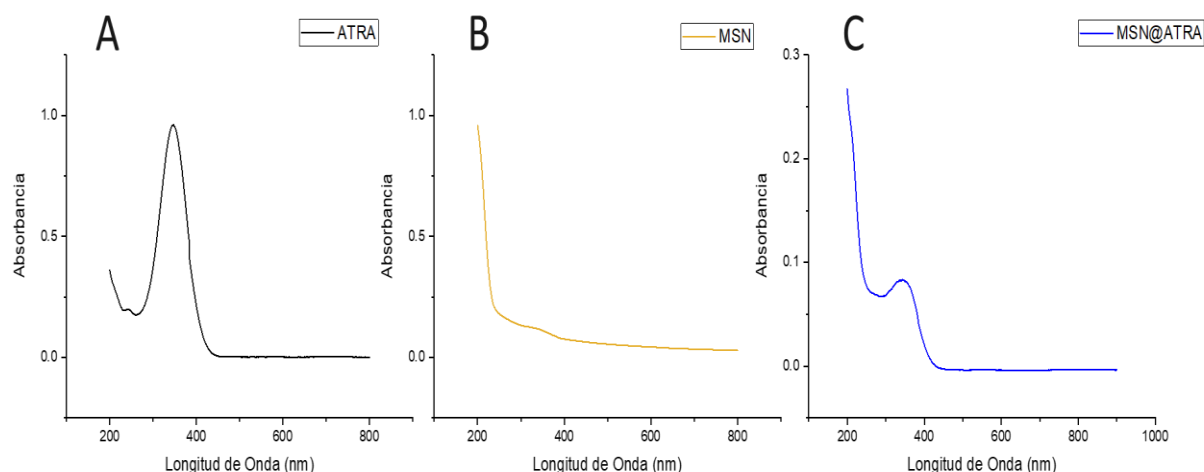


Figura 9. Cargado de ATRA en MSN. Espectros de absorbancia de A) Correspondiente a el *ácido-holo-trans* retinoico (ATRA), pico máximo a 343 nm de longitud de onda. B) Espectro de las partículas mesoporosas de sílice, pico máximo a 206 nm de longitud de onda C) Espectro correspondiente a las partículas mesoporosas de sílice cargadas con *ácido-holo-trans* retinoico.

3.3 Producción y purificación del virus de mosaico del bromo (BMV)

Una vez lograda la síntesis de MSN se procedió a producir y purificar los viriones del BMV. La concentración y pureza del virus de BMV obtenido fue determinada por espectroscopía UV-Vis con el espectrofotómetro Lambda 25 (PerkinElmer®) se encontró una pureza de ≈ 1.84 con una concentración de 2 mg/mL y el rendimiento calculado de la extracción fue de 0.5 mg de virus por gramo de hoja infectada. El análisis por DLS indicó un diámetro promedio de 27.8 ± 5.5 nm, IDP = 0.05 (Figura 10). El análisis de tamaño obtenidos de la micrografía en TEM mostró un diámetro promedio de 28.5 ± 1.64 nm, IDP= 0.003. En la Figura 11 se observan los viriones de BMV tomada por TEM.

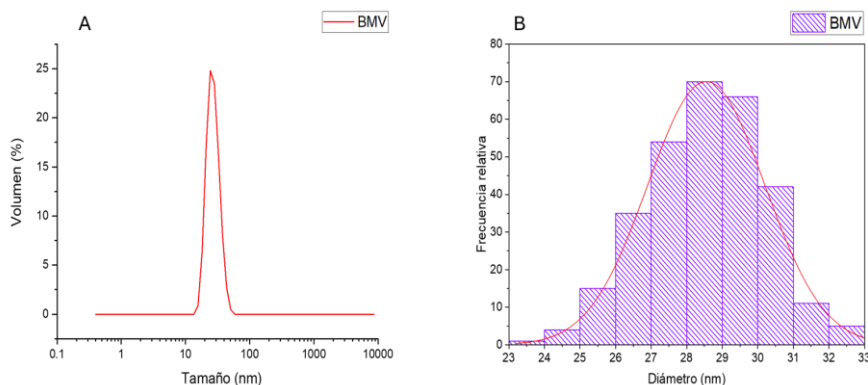


Figura 10. Tamaño del virus de mosaico del bromo. A) Diámetro hidrodinámico por volumen promedio de partícula medida por dispersión dinámica de luz, tamaño promedio= 27.8 nm $\pm$ 5.5 nm. B) Histograma de frecuencias de los tamaños medidos en las micrografías TEM, tamaño promedio= 28.5 $\pm$ 1.64 nm.

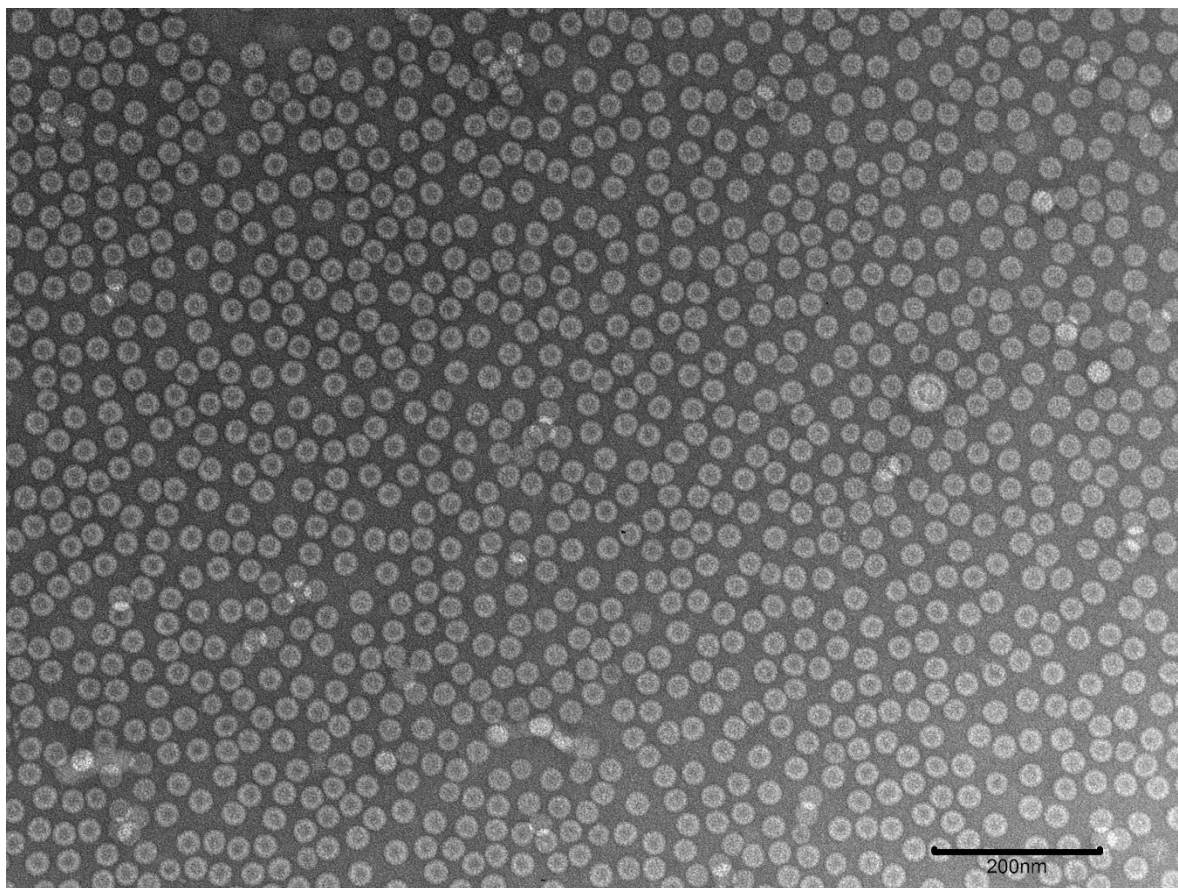


Figura 11. Micrografías TEM del Virus de mosaico del bromo. Virus purificado por ultracentrifugación y colchón de sacarosa. La barra de escala corresponde a 200 nm. Magnificación 40kx.

3.4 Purificación de la proteína de cápside del BMV

A partir de 1.5 mg de virus nativo se obtuvo 1 mg de proteína de cápside con una pureza de 1.56 en relación con la absorbancia UV-Vis A260/ A280. La proteína fue almacenada a 4 °C y utilizada en un periodo no máximo a 12 días para garantizar la integridad.

3.5 Ensamble de nanopartículas

Los ensambles realizados con los diferentes tipos de MSN vacías (MSN-50, MSN-20 y MSN-8) sólo formaron VLP's para los casos donde se usaron MSN-20 y MSN-8 (anexos) por lo que se decidió usar las MSN-20 para el resto de los experimentos de ensamble. El ensamble de las VLP's con MSN vacías o con MSN cargadas con ATRA se muestra en la Figura 12. Ambos ensambles ocurrieron con éxito, indicando que la proteína

de cápside del BMV puede atrapar tanto partículas cargadas como vacías. El radio hidrodinámico promedio de las partículas vacías resultó en 27.04 ± 3.9 nm mientras que las micrografías TEM mostraron que las partículas ensambladas en un rango desde 19-36.5 nm con un diámetro promedio de 27.9 ± 4.5 nm, los índices de polidispersidad fueron 0.02 en ambas mediciones (Figura 13). Las partículas cargadas con ATRA mostraron tener un radio hidrodinámico promedio de 29.47 ± 6.09 nm, IDP=0.04 nm y las micrografías mostraron VLP's formadas en un rango de 19-36 nm con un diámetro promedio de 28.11 ± 3.6 nm, IDP=0.01 (Figura 14). Adicionalmente se observó que las VLP's con un diámetro mayor de 36 nm mostraban malformaciones o formaban cápsides aberrantes que no cubrían la totalidad de la MSN (Figura 12 C).

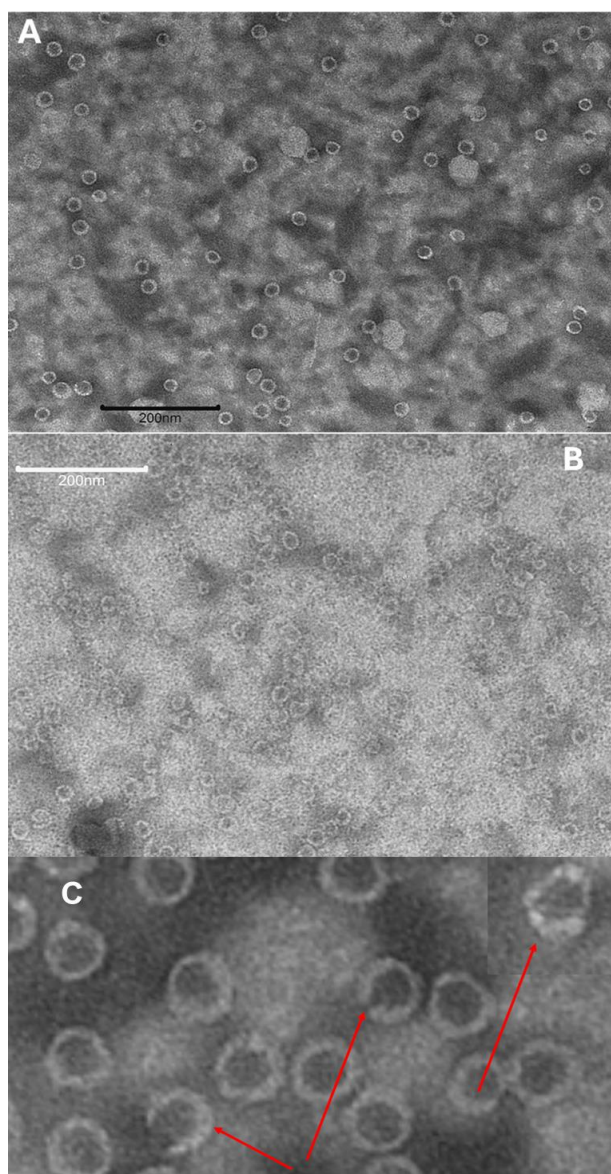


Figura 12. VLP's-MSN. A) Partículas mesoporosas de sílice vacías recubiertas con proteína de cápside del virus de mosaico del bromo. B) Partículas mesoporosas de sílice cargadas con ATRA recubiertas con proteína de cápside del virus de mosaico del bromo. La barra de escala corresponde a 200 nm. C) Malformaciones en VLP's de tamaño mayor a 36 nm. Magnificación 40kx.

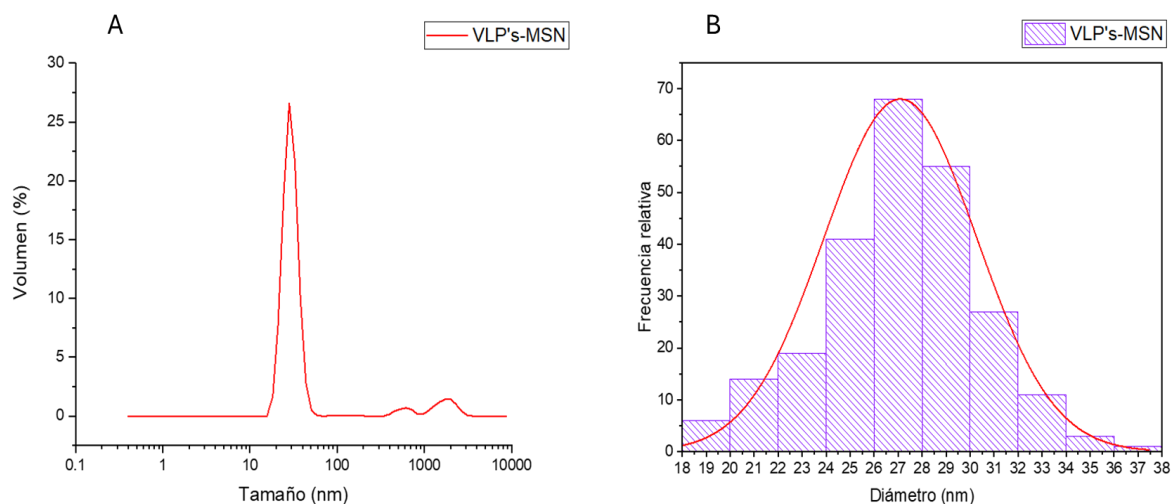


Figura 13. Tamaño de VLP's-MSN. A) Diámetro hidrodinámico por volumen promedio de partícula medida por dispersión dinámica de luz, tamaño promedio= 27.04 nm $\pm$ 3.9 nm. B) Histograma de frecuencias de los tamaños medidos en las micrografías TEM, tamaño del diámetro promedio= 27.9 nm $\pm$ 4.5 nm.

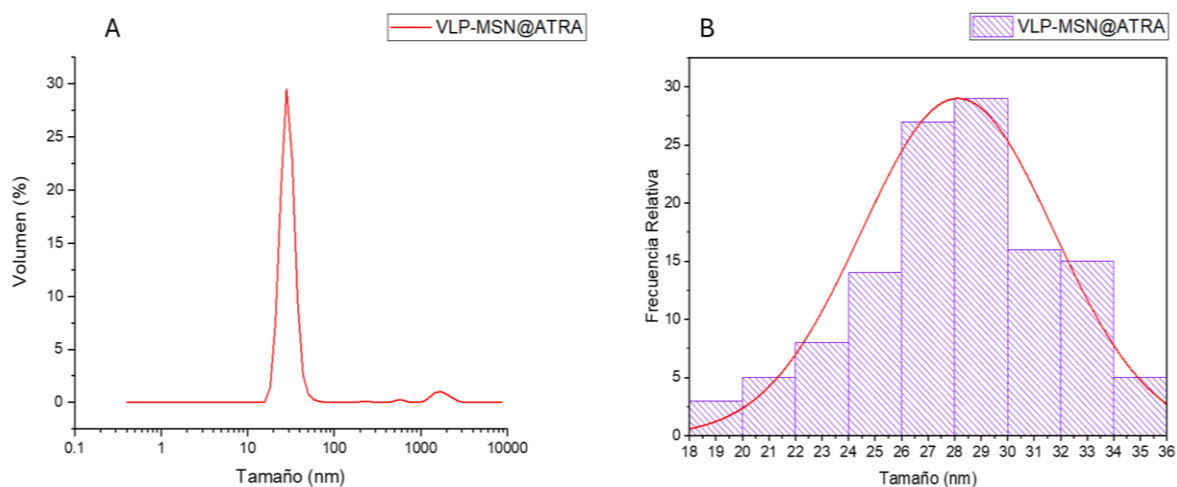


Figura 14. Tamaño de VLP's-MSN cargadas con ATRA. A) Diámetro hidrodinámico por volumen promedio de partícula medida por dispersión dinámica de luz, tamaño promedio= 29.47 nm $\pm$ 6.09 nm. B) Histograma de frecuencias de los tamaños medidos en las micrografías TEM, tamaño promedio= 28.11 $\pm$ 3.6 nm.

La carga de ATRA en el sistema se determinó por absorbancia a 343 nm correspondiente a el pico máximo del ATRA utilizando un espectrofotómetro Lambda 25 (PerkinElmer®) se determinó que la solución final de VLP's-MSN@ATRA contenían 21.7 μ g/mL de ATRA. El espectro de absorbancia de las VLP's-MSN@ATRA se muestra la Figura 15 A. La deconvolución del espectro mostró 3 picos, correspondientes a proteína (220 nm y 280 nm) y al ATRA (343nm) (Figura 15 C).

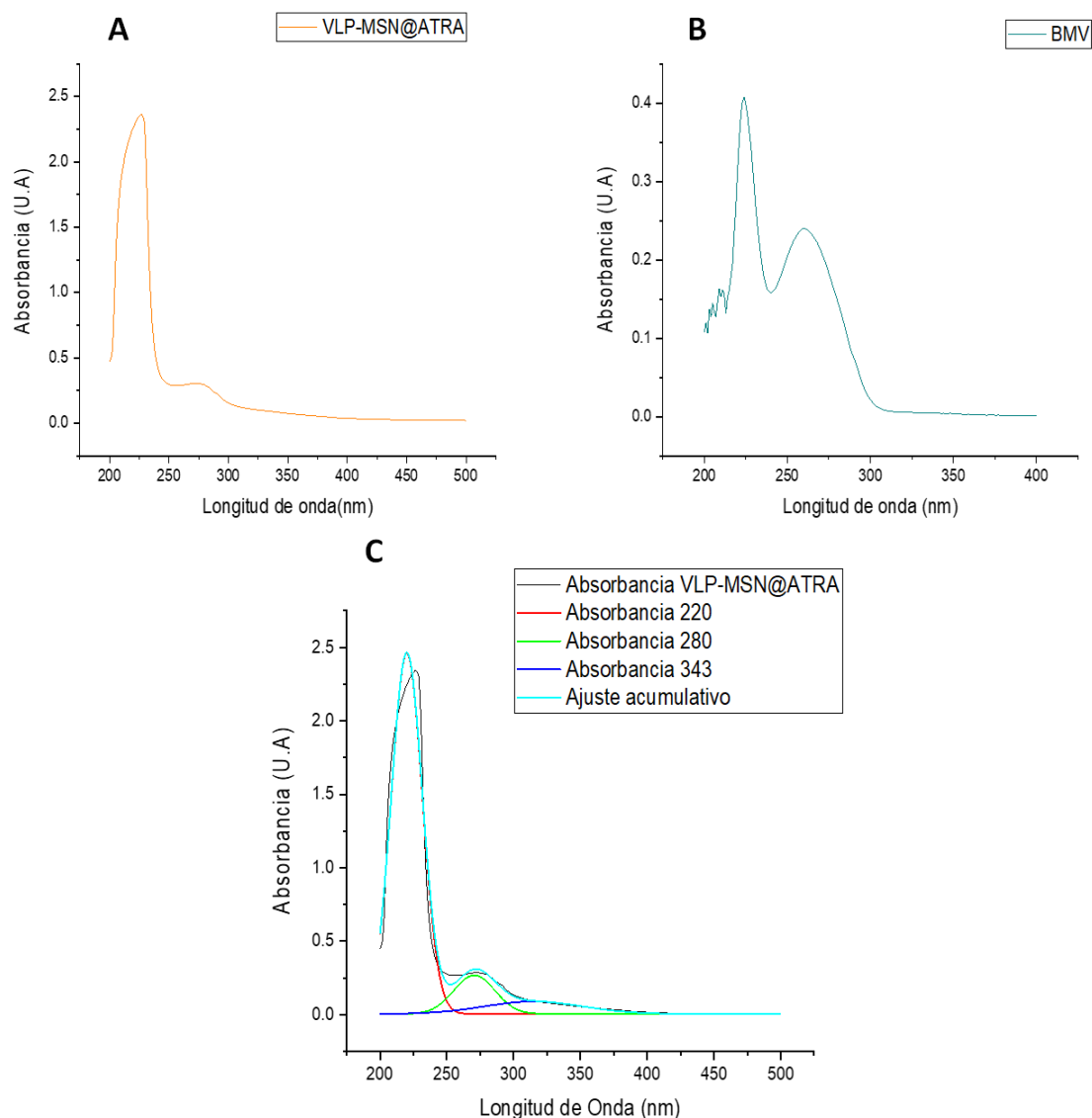


Figura 15. Espectro de absorbancia del virus nativo y VLP's. A) Espectro de absorbancia de la VLP-MSN@ATRA. B) Espectro de absorbancia de virus nativo de BMV. C) Deconvolución de las curvas presentes en el espectro de absorbancia.

3.6 Funcionalización de VLP's

El péptido ChMAP-28 fue anclado químicamente a la VLP-MSN@ATRA en las dos relaciones de tasas de exceso molar. Para comprobar el éxito de la funcionalización, se midió el potencial Z y la movilidad electroforética de los tratamientos en dos grupos: VLP-MSN (VLP-MSN@ChMAP-28) y VLP-MSN cargada con ATRA (VLP-MSN/ATRA@ChMAP-28) utilizando como control el virus nativo de BMV. El análisis del potencial Z reveló una diferencia en la carga superficial de la proteína de la cápside entre los grupos

tratados y el grupo control (BMV nativo). Los tratamientos con una relación de dos moléculas de péptido por proteína de cápside presentaron un potencial Z más positivo tanto en el virus nativo del mosaico de bromo como en la VLP. La VLP-MSN presentó diferencias significativas entre el control y las dos relaciones probadas, sin embargo, la VLP-MSN@ATRA sólo mostró tener diferencias significativas entre la relación 2:1 y el control (Figura 16 A). Los ensayos de movilidad electroforética revelaron que tanto las VLP-MSN como las VLP-MSN@ATRA que fueron conjugadas con una relación 2:1 de péptido por proteína de cápside mostraron diferencias significativas en comparación con las relaciones 1:1 y el control (Figura 16 B). Se seleccionó la relación de dos moléculas de péptido por proteína de cápside para medir el radio hidrodinámico del virus y de la VLP ya que esta relación mostró tener diferencias significativas, así como un potencial Z más cercano a ser positivo. Se observó un cambio en el diámetro hidrodinámico de los virus y las VLP's funcionalizadas comparadas con el tamaño del virus nativo no funcionalizado utilizado como control. El control resultó tener un diámetro hidrodinámico de 29.29 ± 5.09 nm, mientras que el BMV@ChMAP-28 mostró un radio hidrodinámico de 34.59 ± 7.06 nm. Las VLP-MAN/ATRA@ChMAP-28 mostraron dos picos, el primer pico 74.66 ± 20.83 nm y un segundo pico en 238.2 ± 75.58 nm, este segundo pico se atribuye a la formación de agregados (Figura 17). La presencia de las partículas formadas se confirmó mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 18).

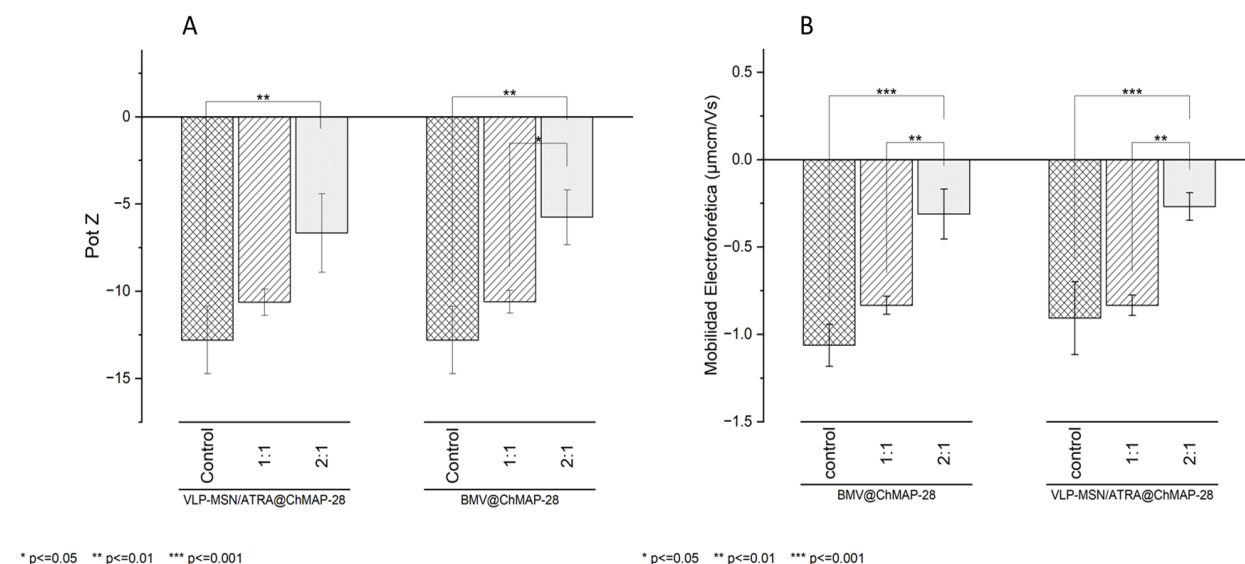


Figura 16. Cambios en el potencial Z y movilidad electroforética de las nanopartículas conjugadas. A) Cambio del potencial Z en las nanopartículas conjugadas con relaciones de 1 molécula de péptido por proteína de cápside y 2 moléculas de péptido por proteína de cápside. Virus nativo utilizado como control. B) Movilidad electroforética de las partículas conjugadas con relaciones de 1 molécula de péptido por proteína de cápside y 2 moléculas de péptido por proteína de cápside.

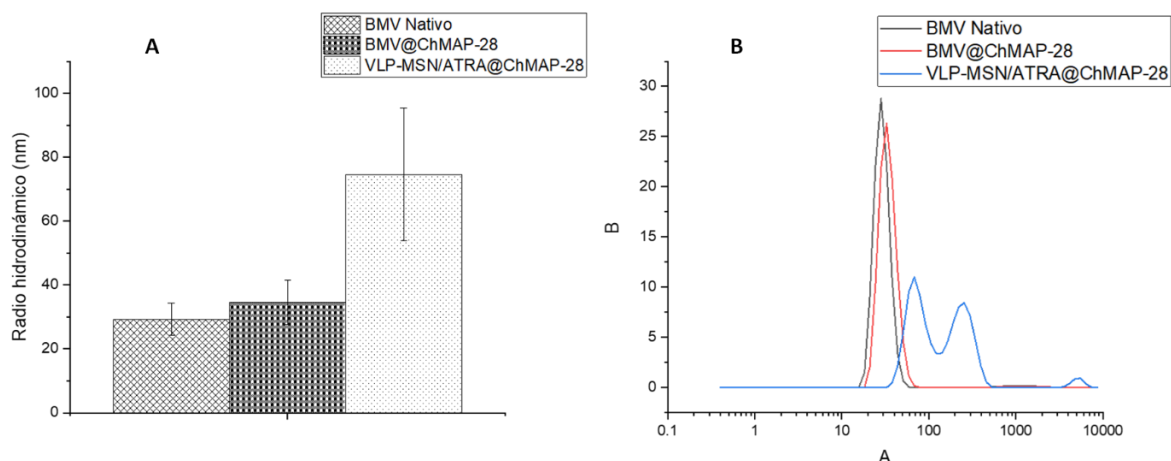


Figura 17. Radio hidrodinámico de las partículas funcionalizadas. A) Diámetro hidrodinámico por volumen promedio de partículas por dispersión dinámica de luz. BMV Nativo 29.29 ± 5.09 nm, BMV@ChMAP-28 34.59 ± 7.06 nm, VLP-MAN/ATRA@ChMAP-28 primer pico 74.66 ± 20.83 nm. B) Análisis de dispersión dinámica de luz para los diferentes grupos, el virus nativo y el virus funcionalizados muestran un solo pico mientras que las VLP's funcionalizadas (VLP-MSN/ATRA@ChMAP-28) muestran dos picos, el segundo pico resultó tener un tamaño de 238.2 ± 75.58 nm.

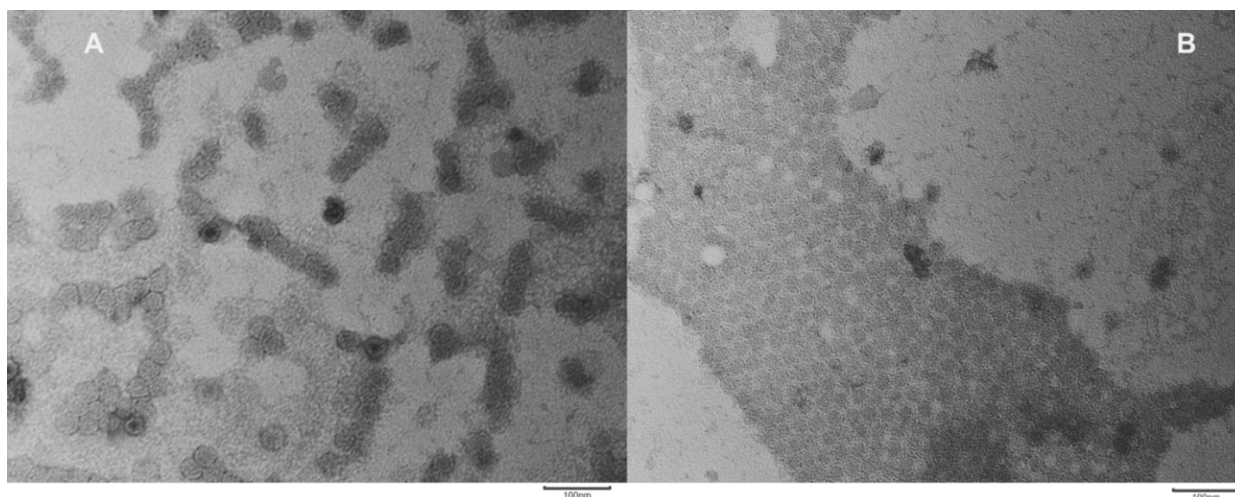


Figura 18. Micrografía de las partículas funcionalizadas. A) partículas tipo virus de sílice mesoporosa cargadas con ATRA y funcionalizadas con el péptido ChMAP-28 (VLP-MSN/ATRA@ChMAP-28). B) Virus de mosaico del bromo funcionalizados con el péptido ChMAP-28 (BMV@ChMAP-28). Magnificación 100kx.

3.7 Cinética de liberación

Se observó que las MSN liberaron el cargo terapéutico de manera constante y una correlación de $R^2=0.54$ ajustándose a un modelo de primer orden, mientras que la VLP-MSN demostró ajustarse más aun modelo de liberación bifásica con una liberación inicial rápida y posteriormente una liberación de estallido a partir de la hora 4. La MSN mostró liberar hasta 82.5% del total cargado tras 8 horas, mientras que la VLP mostró llegar a una liberación del 69.2% del contenido cargado tras 8 horas, teniendo una fase de liberación

sostenida hasta las 4 h y después mostró liberar el 48.6% del cargo terapéutico en una fase de estallido (Figura 19). Se observó la degradación del fármaco ATRA liberado en la solución amortiguadora de fosfatos salinos a partir de la segunda hora (Figura 20).

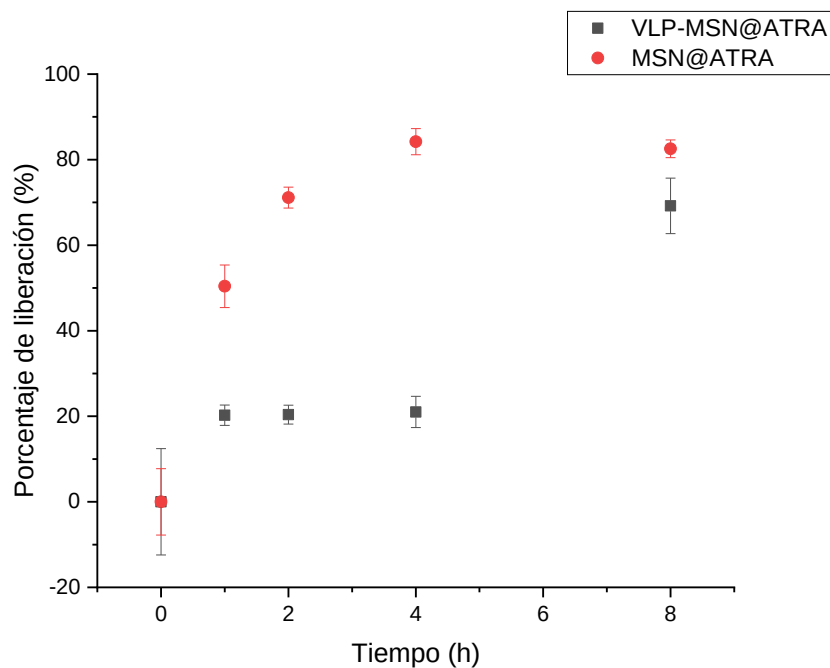


Figura 19. Perfil de liberación de ATRA. Liberación de ATRA en los sistemas de nanopartículas mesoporosas de sílice y las nanopartículas mesoporosas cubiertas con proteína de cápside del BMV.

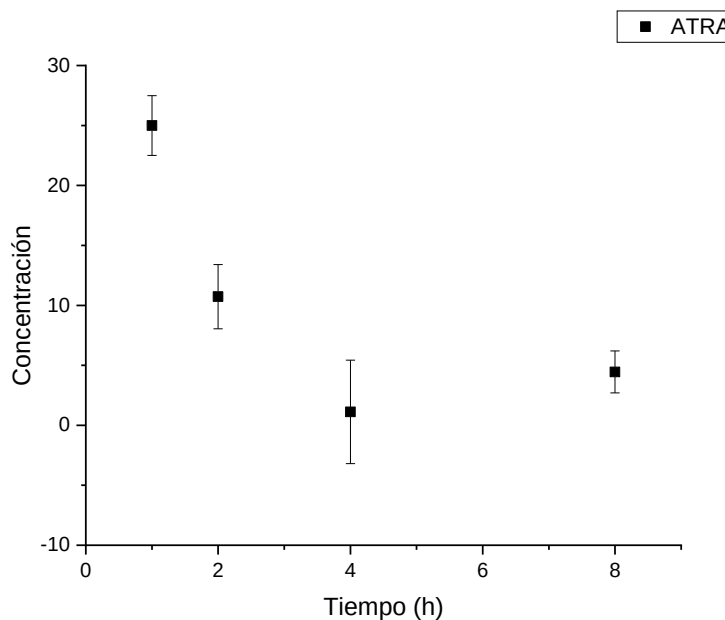


Figura 20. Degradación de ATRA liberado en medio salino. Se observa degradación del ATRA en medio salino a lo largo de tiempo medida en concentración.

Capítulo 4. Discusión

Las modificaciones realizadas al método sol-gel para la síntesis de partículas mesoporosas de 20 nm presentadas en este trabajo mostraron un rendimiento superior (0.5 mg/mL) de nanopartículas mesoporosas de sílice sintetizadas en comparación al rendimiento obtenido con los métodos de Urata y Jiménez. Además, por este método de síntesis propuesto, las partículas formadas son monodispersas, y presentan un IDP <0.1 medido tanto por DLS y TEM. Aunque el uso de MSN como nanovehículos terapéuticos de las MSN ya se encuentran aprobadas por la FDA (Kirla et al., 2023; Meola et al., 2021; Tan et al., 2014), algunos estudios indican que estas pueden activar la respuesta inmune proinflamatoria y presentan una leve citotoxicidad (Chou et al., 2017; Lee et al., 2011). No obstante, las principales causas de este fenómeno de activación de la respuesta inmunitaria se encuentran ligados a factores como la carga, tamaños grandes y polidispersidad de nanopartículas (Chou et al., 2017). Por otro lado, diversos estudios han señalado que partículas con tamaños inferiores a 10 nm pueden presentar diversos tipos de toxicidad a pesar de tener ventaja de poder internalizarse en células. Por otro lado, otros estudios han señalado que las nanopartículas entre 20-50 nm son más eficientes para internalizarse en las células, en comparación con partículas de mayor tamaño y presentan una baja toxicidad en comparación con partículas de menor tamaño (Miao et al., 2024; Pan et al., 2012; Wu et al., 2022). Por lo que lograr un método de síntesis de gran rendimiento, monodispersas y tamaño adecuado es de gran relevancia y representa un hallazgo de importancia en este trabajo, ya que las nanopartículas sintetizadas presentan buenas condiciones para usos terapéuticos según los estudios antes mencionados. Así mismo, estas partículas fueron recubiertas con proteína de cápside de manera exitosa, formando VLP's-MSN o VLP's-MSN@ATRA cuyo diámetro promedio resultó ser bastante cercano al diámetro promedio del virus nativo (28nm). Existen tres argumentos que pueden explicar este fenómeno. El primer motivo es la presencia de 26 aminoácidos en la N-terminal de la proteína de cápside que son de naturaleza básica y requieren de moléculas negativas para neutralizar su carga (Elrad & Hagan, 2008; G. He et al., 2021), por lo que son fuertemente atraídas por la carga negativa superficial de la MSN. En la naturaleza la carga de los aminoácidos se neutraliza con el ARN del virus, sin embargo, se han observado limitantes físicas en el empaquetamiento de ARNs determinados por el tamaño (Cadena-Nava et al., 2012; Comas-Garcia et al., 2012), esto representaría el segundo motivo. Aunque los resultados mostrados en este trabajo sugieren que los residuos N-Terminales de naturaleza básica atrapan a las nanopartículas de sílice mesoporosa que son altamente negativas para neutralizar su carga, se encontró que esta interacción es preferencial al tamaño de la MSN de manera similar tal como ocurre en el empaquetamiento de ARN. Las partículas tipo virus formadas superiores a los 36 nm mostraban tener malformaciones o defectos, mientras que, las

partículas de un tamaño similar al virus (25-30nm) no presentaban estas malformaciones, es posible que el tamaño de las nanopartículas sintetizadas promueva la unión de las proteínas y esto debido a la curvatura espontánea con la que las proteínas se autoensamblan, este sería el tercer motivo, la curvatura espontánea de la proteína de cápside. La presencia de esta curvatura en el virus es una ventaja evolutiva que permite a la partícula viral adquirir una estructura estable y una geometría de icosaedro perfecto lo que permite proteger el material genético en la naturaleza. La curvatura de esta estructura está influenciada por condiciones biogeométricas. No es completamente rígida, pero sí posee un ángulo diedro límite, este ángulo es crucial para que la estructura "encaje" correctamente durante el proceso de ensamblaje de la cápside. La biogeometría del BMV le permite organizarse en diferentes estructuras para el ensamblaje de acuerdo con las condiciones de empaquetamiento como el medio dónde se encuentre, las fuerzas iónicas que este tenga y el templado sobre el que se ensamblaran. La proteína de cápside del BMV puede ensamblarse en T=1, (60 subunidades formando la cápside) pseudo T=2 (60 subunidades formando la cápside de manera no rígida), T=3 (180 subunidades proteicas formando la cápside) y de manera menos frecuente T=4 (240 subunidades formando la cápside), siendo entre todas estas el T=3 la conformación más estable y presente en la naturaleza (Hema et al., 2010; Kao et al., 2011), ya que en este tipo de estructura la curvatura espontánea de las proteínas de cápside presenta un radio diedro adecuado (Chang et al., 2008a; Lucas et al., 2002). Considerando esto, las esferas de un tamaño ideal se adaptan de manera adecuada a la curvatura espontánea de las proteínas de cápside en una formación T=3, este hecho defiende a las MSN como un templado perfecto para el ensamblaje de las CP, al poseer una geometría pseudo-esférica (Cadena-Nava et al., 2012; Comas-Garcia et al., 2012; Elrad & Hagan, 2008). El otro punto clave para el éxito de ensamblaje de estas nanopartículas se debe al tamaño y uniformidad de las nanopartículas de sílice. Los bajos índices de polidispersidad mostrados por los virus nativos y mantenidos en las VLP's-MSN también son indicadores de la selectividad por partículas que geométricamente se amoldan mejor a la estructura de la proteína de cápside (Chang et al., 2008b; Dragnea et al., 2003; Lucas et al., 2002). También es importante resaltar que el bajo índice de polidispersidad (<0.1) de las VLP's-MSN resulta satisfactorio para los usos en aplicaciones terapéuticas, ya que un bajo IDP se atribuye a buena capacidad de retención en sistemas biológicos y baja respuesta inflamatoria (Danaei et al., 2018; Liao et al., 2018).

Los hallazgos encontrados sobre la encapsulación de nanopartículas de sílice mesoporosa se suman a la evidencia mostrada en trabajos previos que señalan selectividad de las proteínas de cápside para encapsidar plantillas esféricas y de tamaños definidos (Chang et al., 2008b; Elrad & Hagan, 2008).

Si bien es cierto que las MSN son biocompatibles y su uso ha sido aprobado por la FDA para fines terapéuticos (Kirla et al., 2023; Lin et al., 2023; Tan et al., 2014), por sí solas no presentan ningún tipo de selectividad. Por esta razón, es necesario modificarlas durante o después de su síntesis para dotarlas de esta selectividad. Las modificaciones centrales en las MSN suelen ser la adición de grupos funcionales sobre los cuales anclar químicamente las moléculas que otorgarán la selectividad a la célula u órgano diana (Z. Xu et al., 2019). La cobertura con la proteína de cápside otorga grupos funcionales sobre los cuales se pueden anclar las moléculas de direccionamiento. En este trabajo se probó conjugar el péptido ChMAP-28 utilizando dos relaciones de excesos molares: 1 moléculas de péptido por proteína de cápside y 2 moléculas de péptido por proteína de cápside, se demostró que en ambos casos el anclaje químico ocurre bajo las condiciones mencionadas anteriormente en la sección de metodología logrando un cambio en la carga superficial en tanto en los virus nativos como en la partícula tipo virus. La funcionalización probada en este trabajo demostró que el péptido cambia el potencial Z de la VLP y el virus de manera que se vuelve más positivo, esto sugiere que el péptido fue adherido a la superficie de la CP dejando expuesto el extremo amino del péptido, sitio donde se encuentra la actividad selectiva y quimioterapéutica hacia células de LPA (Emelianova et al., 2018; Panteleev et al., 2018), el análisis de datos obtenidos de los ensayos de movilidad electroforética mostraron que existen diferencias significativas en el desplazamiento de las VLP's conjugadas a una razón de 2 péptidos por proteína de cápside, sumando evidencia para indicar que las partículas fueron conjugadas exitosamente con el péptido (Fichtner et al., 2017; Safenkova et al., 2016). Es importante resaltar que la conjugación del péptido planteada en este trabajo utilizó los sitios aminos expuestos de las proteínas de cápside formadas en VLP's o BMV. Estos sitios son difícilmente utilizados ya que son pocos y su ubicación complica el anclaje de otras moléculas, sin embargo, se ha observado que la estructura de los virus icosaédricos como el BMV se hincha cuando se encuentra en pH ligeramente alcalino y su estructura es igualmente influenciada por las fuerzas iónicas Haga clic o pulse aquí para escribir texto.. En el protocolo de conjugación el BMV fue incubado en PBS para provocar la hinchazón de la estructura viral y exponer los grupos aminos buscando que favorecer el anclaje químico del extremo C-terminal del péptido con el sitio N-Terminal de las cápsides o VLP's. El método de carbodiimida empleado en este estudio para la conjugación del péptido a la VLP o BMV permite exclusivamente la unión química entre un grupo carboxilo y un grupo amino. Los cambios observados en el potencial Zeta de las partículas conjugadas, que muestran un desplazamiento hacia valores más positivos en comparación con el control, junto con los resultados del análisis de movilidad electroforética, respaldan que el anclaje químico tuvo lugar en los sitios amino-terminales de la proteína de la cápside. El protocolo utilizado para la conjugación en este trabajo demostró que es posible utilizar los sitios amino expuestos en el exterior de un virus o VLP y abre las puertas para el aprovechar estos sitios en futuros trabajos.

La conjugación del péptido a la VLP o al BMV, también podría protegerlo de la degradación por proteasas, radicales libres y diversos metabolitos permitiendo su actividad terapéutica (Pal et al., 2016; Rai et al., 2016). Este trabajo demostró que las VLP's-MSN pueden ser utilizada como un andamio para transportar péptidos antimicrobianos y anticancerígenos, abriendo en este caso y para los intereses de este trabajo la posibilidad a utilizar este método de conjugación como una estrategia terapéutica anticancerígena. Desde luego el hallazgo encontrado en este trabajo requiere más investigación, sin embargo, se espera que pueda ser extrapolado a trabajos futuros.

En cuanto al cargado y transporte del fármaco quimioterapéutico ATRA, se ha demostrado que el sistema desarrollado en este trabajo puede transportar y liberar el fármaco, además que el recubrimiento de las MSN con CP del BMV modifica la manera en que se libera el fármaco teniendo una liberación bifásica y un poco más lenta en comparación con las MSN desnudas. La eficiencia de cargado del ATRA en este trabajo fue 8.6%, esta eficiencia fue menor comparada con trabajos similares dónde logran tasas de 36% (Karimi et al., 2020) o incluso alcanzar tasas del 48.9% de eficiencia de cargado (Kong et al., 2017). Esta eficiencia puede ser explicada con la carga ligeramente negativa, casi neutra que presenta el ATRA por lo que el cargado en estos casos depende solo de fuerzas de adsorción por capilaridad y no de atracción electrostática. En otros trabajos se realizan modificaciones químicas en la superficie de las MSN que cambian la naturaleza de carga de las MSN de negativo a una carga superficial altamente positiva lo mejora la adsorción del fármaco (Karimi et al., 2020; Kong et al., 2017). Para los propósitos de este trabajo era necesario mantener la carga superficial de las MSN negativa, por lo que se decidió no realizar modificaciones y en su lugar, se apostó por un cargado totalmente dependiente de la adsorción pasiva complementada con estímulos por sonicación. De esta manera se acelera y mejora la adsorción capilar de fármacos hidrofóbicos como el ATRA (Ho et al., 2020).

La liberación del ATRA mostró ser diferente en las partículas MSN desnudas y las VLP, siendo la principal distinción la liberación en tres fases que presentó la VLP. Esta liberación bifásica podría explicarse entendiendo la estructura del virus nativo de BMV, que presenta 60 poros en la superficie, en las VLP estos poros se mantienen. Durante la primera fase de liberación el ATRA puede escapar por los poros de la VLP hasta saturarlos entrando fase de liberación de tipo sostenida. Sin embargo, a partir de la cuarta hora se observa un cambio en la liberación, esto puede explicarse a que, en los medios cercanos a condiciones de pH neutras, como lo es el PBS, las VLP adquieren una estructura expandida que modifica el tamaño del poro a casi 2 nm (Loredo García, 2023) y al mismo tiempo la adhesión de la proteína de cápside a la superficie de la MSN se vuelve débil, lo que facilita la liberación del ATRA retenido a manera de liberación de estallido (Running et al., 2012b). Sin embargo, el principal hallazgo de los experimentos de liberación

es la capacidad de la CP para recubrir las MSN y retrasar la liberación del cargo terapéutico, lo que potencialmente representa mejoras en la entrega y biodisponibilidad del ATRA. También se observó que el ATRA se degrada a partir de las 2-4 h después de su liberación en un medio salino *in vitro* lo que concuerda con lo reportado por Ezpeleta et al. (1996). En el organismo la vida media del ATRA es de 2-4 h, no obstante, su biodisponibilidad es del 50% (Muindi et al., 1992; Regazzi et al., 1997), por lo que se refuerza la necesidad de transportar y proteger este fármaco para potenciar su actividad terapéutica y potenciar la presencia dentro del organismo con un sistema de entrega controlado o sostenida.

Debido a las características del ATRA como la hidrofobicidad y una carga electroestática prácticamente neutra no resulta sencillo encapsular y transportar ATRA en cualquier tipo de nanovehículo, lo que potencia el sentido de este trabajo al diseñar un sistema híbrido VLP-MSN para el transporte de fármacos con métodos innovadores. El impacto de los resultados obtenidos en este trabajo recae en la posibilidad de extrapolar este sistema a fármacos o moléculas terapéuticas de característica similares, a su vez el recubrimiento con proteína de cápside ha mostrado mejorar la retención del fármaco dentro del nanovehículo a comparación de la nanopartícula de sílice mesoporosa desnuda.

Capítulo 5. Conclusiones

En este trabajo se logró la síntesis de nanopartículas de sílice mesoporosa a partir de un método sol-gel adecuado con un gran rendimiento de 0.5 mg/mL de síntesis y una baja polidispersidad (<0.1). Estas partículas fueron cargadas con *ácido holo-trans-retinoico*, un agente quimioterapéutico para leucemia promielocítica aguda y cubiertas exitosamente con la proteína de cápside del BMV formando una VLP. Tanto las partículas de sílice mesoporosa desnudas como el sistema VLP-MSN mostraron la capacidad de liberar satisfactoriamente el ATRA cargado.

Finalmente, el recubrimiento de proteína de cápside permite conjugar biomoléculas como péptidos que potencian la selectividad o la actividad terapéutica. En este estudio, el péptido ChMAP-28 fue conjugado utilizando una estrategia innovadora que aprovecha los residuos aminos expuestos de la proteína de cápside del virus del mosaico del bromo como sitios de anclaje químico y una rápida activación de los sitios carboxilo del péptido para orientar la conjugación a un polo de interés. Esta metodología no ha sido documentada previamente en la literatura.

El éxito en la encapsulación y protección de fármacos como el ATRA subraya la relevancia de este sistema híbrido VLP-MSN, sugiriendo su potencial para aplicaciones futuras en el transporte de una amplia gama de moléculas terapéuticas. Este trabajo no solo presenta un método innovador para la síntesis de nanopartículas ≈ 20 nm con una buena monodispersidad, sino que también establece una plataforma prometedora para la mejora de la administración de fármacos en el tratamiento del cáncer y potencialmente de diversas enfermedades.

Literatura citada

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, Shiv (Eds.). (2018). *Cellular and Molecular Immunology* (9th ed.). Elsevier.
- Ahmad, J., Amin, S., Rahman, M., Rub, R., Singhal, M., Ahmad, M., Rahman, Z., Addo, R., Ahmad, F., Mushtaq, G., Kamal, M., & Akhter, S. (2015). Solid Matrix Based Lipidic Nanoparticles in Oral Cancer Chemotherapy: Applications and Pharmacokinetics. *Current Drug Metabolism*, 16(8), 633–644. <https://doi.org/10.2174/1389200216666150812122128>
- Alcalay, M., Zangrilli, D., Fagioli, M., Pandolfi, P. P., Mencarelli, A., Lo Coco, F., Biondi, A., Grignani, F., & Pelicci, P. G. (1992). Expression pattern of the RAR alpha-PML fusion gene in acute promyelocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(11), 4840–4844. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.11.4840>
- Argyo, C., Weiss, V., Bräuchle, C., & Bein, T. (2014). Multifunctional mesoporous silica nanoparticles as a universal platform for drug delivery. In *Chemistry of Materials* (Vol. 26, Issue 1, pp. 435–451). <https://doi.org/10.1021/cm402592t>
- Beretta, G. L., & Zunino, F. (2007). Molecular Mechanisms of Anthracycline Activity. In: Krohn, K. (Ed.), *Anthracycline Chemistry and Biology II. Topics in Current Chemistry*, (pp. 1–19). Springer. https://doi.org/10.1007/128_2007_3
- Bernard, J., Mathe, G., Boulay, J., Ceoard, B., & Chome, J. (1959). Acute promyelocytic leukemia: a study made on 20 cases. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 89, 604–608. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13799642/>
- Blandino, A., Lico, C., Baschieri, S., Barberini, L., Cirotto, C., Blasi, P., & Santi, L. (2015). In vitro and in vivo toxicity evaluation of plant virus nanocarriers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 129, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.039>
- Bognár, Z., de Jonge, M. I., & Gyurcsányi, R. E. (2022a). In situ silver nanoparticle coating of virions for quantification at single virus level. *Nanoscale*, 14(6), 2296–2303. <https://doi.org/10.1039/D1NR07607H>
- Bognár, Z., de Jonge, M. I., & Gyurcsányi, R. E. (2022b). In situ silver nanoparticle coating of virions for quantification at single virus level. *Nanoscale*, 14(6), 2296–2303. <https://doi.org/10.1039/D1NR07607H>
- Borrow, J., Goddard, A. D., Gibbons, B., Katz, F., Swirsky, D., Fioretos, T., Dube, I., Winfield, D. A., Kingston, J., Hagemeijer, A., Rees, J. K. H., Lister, T. A., & Solomon, E. (1992). Diagnosis of acute promyelocytic leukaemia by RT-PCR: detection of PML-RARA and RARA-PML fusion transcripts. *British Journal of Haematology*, 82(3), 529–540. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1992.tb06463.x>
- Brand, N., Petkovich, M., Krust, A., Chambon, P., de Thé, H., Marchio, A., Tiollais, P., & Dejean, A. (1988). Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature*, 332(6167), 850–853. <https://doi.org/10.1038/332850a0>

- Budman, D. R., Petroni, G. R., Johnson, J. L., Cooper, M. R., Schlossman, D. M., Barcos, M., & Peterson, B. A. (1997). Phase II trial of docetaxel in non-Hodgkin's lymphomas: a study of the Cancer and Leukemia Group B. *Journal of Clinical Oncology*, 15(10), 3275–3279. <https://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.10.3275>
- Busby, S. A., & Burris, T. P. (2012). Retinoic Acid Receptors (RARA, RARB, and RARC). In *Encyclopedia of Signaling Molecules* (pp. 1648–1655). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0461-4_385
- Cadena-Nava, R. D., Comas-Garcia, M., Garmann, R. F., Rao, A. L. N., Knobler, C. M., & Gelbart, W. M. (2012). Self-Assembly of Viral Capsid Protein and RNA Molecules of Different Sizes: Requirement for a Specific High Protein/RNA Mass Ratio. *Journal of Virology*, 86(6), 3318–3326. <https://doi.org/10.1128/JVI.06566-11>
- Chang, C. B., Knobler, C. M., Gelbart, W. M., & Mason, T. G. (2008a). Curvature Dependence of Viral Protein Structures on Encapsidated Nanoemulsion Droplets. *ACS Nano*, 2(2), 281–286. <https://doi.org/10.1021/nn700385z>
- Chang, C. B., Knobler, C. M., Gelbart, W. M., & Mason, T. G. (2008b). Curvature Dependence of Viral Protein Structures on Encapsidated Nanoemulsion Droplets. *ACS Nano*, 2(2), 281–286. <https://doi.org/10.1021/nn700385z>
- Chen, J., & Cong, X. (2023). Surface-engineered nanoparticles in cancer immune response and immunotherapy: Current status and future prospects. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 157, 113998. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113998>
- Chen, J., Kao, Y.-R., Sun, D., Todorova, T. I., Reynolds, D., Narayanagari, S.-R., Montagna, C., Will, B., Verma, A., & Steidl, U. (2019). Myelodysplastic syndrome progression to acute myeloid leukemia at the stem cell level. *Nature Medicine*, 25(1), 103–110. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0267-4>
- Chen, Y., Kantarjian, H., Wang, H., Cortes, J., & Ravandi, F. (2012). Acute promyelocytic leukemia: A population-based study on incidence and survival in the United States, 1975–2008. *Cancer*, 118(23), 5811–5818. <https://doi.org/10.1002/cncr.27623>
- Chen, Z., & Chen, S.-J. (1992). RARA and PML Genes in Acute Promyelocytic Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 8(4–5), 253–260. <https://doi.org/10.3109/10428199209051004>
- Choi, K.-Y. (Grace), & Mookherjee, N. (2012). Multiple Immune-Modulatory Functions Of Cathelicidin Host Defense Peptides. *Frontiers in Immunology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00149>
- Chou, C.-C., Chen, W., Hung, Y., & Mou, C.-Y. (2017). Molecular Elucidation of Biological Response to Mesoporous Silica Nanoparticles in Vitro and in Vivo. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(27), 22235–22251. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b05359>
- Chu, H.-L., Yip, B.-S., Chen, K.-H., Yu, H.-Y., Chih, Y.-H., Cheng, H.-T., Chou, Y.-T., & Cheng, J.-W. (2015). Novel Antimicrobial Peptides with High Anticancer Activity and Selectivity. *PLOS ONE*, 10(5), e0126390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126390>
- Comas-Garcia, M., Cadena-Nava, R. D., Rao, A. L. N., Knobler, C. M., & Gelbart, W. M. (2012). In Vitro Quantification of the Relative Packaging Efficiencies of Single-Stranded RNA Molecules by Viral Capsid Protein. *Journal of Virology*, 86(22), 12271–12282. <https://doi.org/10.1128/JVI.01695-12>

- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., & Mozafari, M. R. (2018). Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- De Braekeleer, E., Douet-Guilbert, N., & De Braekeleer, M. (2014). RARA fusion genes in acute promyelocytic leukemia: a review. *Expert Review of Hematology*, 7(3), 347–357. <https://doi.org/10.1586/17474086.2014.903794>
- De Vries, A. J., LePage, M., Beau, R., & Guillemin, C. L. (1967). Evaluation of porous silica beads as a new packing material for chromatographic columns. Application in gel permeation chromatography. *Analytical Chemistry*, 39(8), 935–939. <https://doi.org/10.1021/ac60252a007>
- Dong, Y., Shi, O., Zeng, Q., Lu, X., Wang, W., Li, Y., & Wang, Q. (2020). Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. *Experimental Hematology & Oncology*, 9(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s40164-020-00170-6>
- Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., & Dick, J. E. (2012). Hematopoiesis: A human perspective. In *Cell Stem Cell* (Vol. 10, Issue 2, pp. 120–136). <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.006>
- Dragnea, B., Chen, C., Kwak, E.-S., Stein, B., & Kao, C. C. (2003). Gold Nanoparticles as Spectroscopic Enhancers for in Vitro Studies on Single Viruses. *Journal of the American Chemical Society*, 125(21), 6374–6375. <https://doi.org/10.1021/ja0343609>
- Durán-Meza, A. L., Escamilla-Ruiz, M. I., Segovia-González, X. F., Villagrana-Escareño, M. V., Vega-Acosta, J. R., & Ruiz-Garcia, J. (2020). Encapsulation of Different Plasmonic Gold Nanoparticles by the CCMV CP. *Molecules*, 25(11), 2628. <https://doi.org/10.3390/molecules25112628>
- Ebrahimi, S. M., Karamat Iradmousa, M., Rashed, M., Fattahi, Y., Hosseinzadeh Ardakani, Y., Bahadorikhalili, S., Bafkary, R., Erfan, M., Dinarvand, R., & Mahboubi, A. (2022). Enzyme and Thermo Dual-stimuli Responsive DOX Carrier Based on PNIPAM Conjugated Mesoporous Silica. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 21(1). <https://doi.org/10.5812/ijpr-130474>
- Elrad, O. M., & Hagan, M. F. (2008). Mechanisms of Size Control and Polymorphism in Viral Capsid Assembly. *Nano Letters*, 8(11), 3850–3857. <https://doi.org/10.1021/nl802269a>
- Emelianova, A. A., Kuzmin, D. V., Panteleev, P. V., Sorokin, M., Buzdin, A. A., & Ovchinnikova, T. V. (2018). Anticancer Activity of the Goat Antimicrobial Peptide ChMAP-28. *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01501>
- Ezpeleta, I., Irache, J. M., Stainmesse, S., Chabenat, C., Gueguen, J., Popineau, Y., & Orecchioni, A.-M. (1996). Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans-retinoic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 131(2), 191–200. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)04338-1](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04338-1)
- Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., & Lowe, S. W. (2000). PML is induced by oncogenic RAS and promotes premature senescence. *Genes & Development*, 14(16), 2015–2027. <https://doi.org/10.1101/gad.14.16.2015>
- Fichtner, A., Jalil, A., & Pyell, U. (2017). Determination of the Exact Particle Radius Distribution for Silica Nanoparticles via Capillary Electrophoresis and Modeling the Electrophoretic Mobility with a

- Modified Analytic Approximation. *Langmuir*, 33(9), 2325–2339. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04543>
- Fogal, V. (2000). Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *The EMBO Journal*, 19(22), 6185–6195. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.22.6185>
- Frietze, K. M., Peabody, D. S., & Chackerian, B. (2016). Engineering virus-like particles as vaccine platforms. *Current Opinion in Virology*, 18, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.03.001>
- Gallagher, R. (2002). Retinoic acid resistance in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*, 16(10), 1940–1958. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402719>
- Galmarini, D., Galmarini, C. M., & Galmarini, F. C. (2012). Cancer chemotherapy: A critical analysis of its 60 years of history. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 84, Issue 2, pp. 181–199). <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.03.002>
- Gaspar, D., Veiga, A. S., & Castanho, M. A. R. B. (2013). From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00294>
- Gómez-Almaguer, D., Marcos-Ramírez, E. R., Montañó-Figueroa, E. H., Ruiz-Argüelles, G. J., Best-Aguilera, C. R., López-Sánchez, M. del C., Barrera-Chairez, E., López-Arrollo, J. L., Ramos-Peñafiel, C. O., León-Peña, A., González-López, E. E., Rivas-García, P. E., Tellez-Hinojosa, C. A., Gómez-De León, A., & Jaime-Pérez, J. C. (2017). Acute Leukemia Characteristics are Different Around the World: the Mexican Perspective. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 17(1), 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2016.09.003>
- Goodman, L. S., Maxwell M. Wintrobe, William Dameshek, Morton J. Goodman, Alfred Gilman, & Margaret T. McLennan. (1946). Nitrogen mustard therapy. Use of methyl-bis(beta-chloroethyl)amine hydrochloride and tris(beta-chloroethyl)amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 251(17), 2255–2261. <https://doi.org/10.1001/jama.251.17.2255>
- Gui, G., Wong-Rolle, A., Dillon, L. W., Goswami, M., Martin, E., Divakar, P., Reeves, J., Calvo, K. R., Hansen, K. D., Hourigan, C. S., & Zhao, C. (2022). Spatial-Temporal Multiomic Analysis of Tumor-Immune Interactions in Patients with AML Receiving Pembrolizumab and Decitabine. *Blood*, 140(Supplement 1), 3427–3428. <https://doi.org/10.1182/blood-2022-168191>
- Hancock, R. E. W., & Lehrer, R. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 16(2), 82–88. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(97\)01156-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01156-6)
- Hannun, Y. A. (1997). Apoptosis and the Dilemma of Cancer Chemotherapy. *Blood*, 89(6), 1845–1853. <https://doi.org/10.1182/blood.V89.6.1845>
- He, G., Zhang, Z., Sathanantham, P., Diaz, A., & Wang, X. (2021). Brome Mosaic Virus (Bromoviridae). In *Encyclopedia of Virology* (pp. 252–259). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21294-6>
- He, Q., & Shi, J. (2014). MSN Anti-Cancer Nanomedicines: Chemotherapy Enhancement, Overcoming of Drug Resistance, and Metastasis Inhibition. *Advanced Materials*, 26(3), 391–411. <https://doi.org/10.1002/adma.201303123>

- Hema, M., Murali, A., Ni, P., Vaughan, R. C., Fujisaki, K., Tsvetkova, I., Dragnea, B., & Kao, C. C. (2010). Effects of Amino-Acid Substitutions in the Brome mosaic virus Capsid Protein on RNA Encapsidation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 23(11), 1433–1447. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-10-0118>
- Herrera-Hernández, M. M. (2023). *Nanopartículas virales con capacidad de inhibir la cadherina-11 y su potencial uso en el tratamiento de cáncer de mama* [Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.]. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3852>
- Hillestad, Leif. K. (1957). Acute promyelocytic leukemia. *Acta Medica Scandinavica*, 159(3), 189–194. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1957.tb00124.x>
- Ho, Y.-J., Wu, C.-H., Jin, Q., Lin, C.-Y., Chiang, P.-H., Wu, N., Fan, C.-H., Yang, C.-M., & Yeh, C.-K. (2020). Superhydrophobic drug-loaded mesoporous silica nanoparticles capped with β -cyclodextrin for ultrasound image-guided combined antivasculature and chemo-sonodynamic therapy. *Biomaterials*, 232, 119723. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119723>
- Hoskin, D. W., & Ramamoorthy, A. (2008). Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(2), 357–375. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.11.008>
- International Agency for Research on Cancer, Global Cancer Observatory. (2022). *Incidence, Both sexes, in 2022*. <https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/tables?mode=population>
- Ireland, C. M., & Pittman, S. M. (1995). Tubulin alterations in taxol-induced apoptosis parallel those observed with other drugs. *Biochemical Pharmacology*, 49(10), 1491–1499. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00030-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)00030-4)
- Iturrioz-Rodríguez, N., Correa-Duarte, M. A., & Fanarraga, M. L. (2019). Controlled drug delivery systems for cancer based on mesoporous silica nanoparticles. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 14, pp. 3389–3401). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S198848>
- Jimenez, C. M., Rubio, Y. G., Saunier, V., Warther, D., Stojanovic, V., Raehm, L., Frochot, C., Arnoux, P., Garcia, M., Morère, A., Bettache, N., Maynadier, M., Maillard, P., Gary-Bobo, M., & Durand, J.-O. (2016). 20-nm-sized mesoporous silica nanoparticles with porphyrin photosensitizers for in vitro photodynamic therapy. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 79(3), 447–456. <https://doi.org/10.1007/s10971-016-3991-6>
- Jolley, C., Klem, M., Harrington, R., Parise, J., & Douglas, T. (2011). Structure and photoelectrochemistry of a virus capsid–TiO₂ nanocomposite. *Nanoscale*, 3(3), 1004–1007. <https://doi.org/10.1039/C0NR00378F>
- Kankala, R. K., Han, Y.-H., Xia, H.-Y., Wang, S.-B., & Chen, A.-Z. (2022). Nanoarchitected prototypes of mesoporous silica nanoparticles for innovative biomedical applications. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01315-x>
- Kao, C. C., Ni, P., Hema, M., Huang, X., & Dragnea, B. (2011). The coat protein leads the way: an update on basic and applied studies with the Brome mosaic virus coat protein. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 403–412. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00678.x>

- Karimi, N., Soleiman-Beigi, M., & Fattahi, A. (2020). Co-delivery of all-trans-retinoic acid and docetaxel in drug conjugated polymeric nanoparticles: Improving controlled release and anticancer effect. *Materials Today Communications*, 25, 101280. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101280>
- Kirla, H., Henry, D. J., Jansen, S., Thompson, P. L., & Hamzah, J. (2023). Use of Silica Nanoparticles for Drug Delivery in Cardiovascular Disease. *Clinical Therapeutics*, 45(11), 1060–1068. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2023.08.017>
- Kong, M., Tang, J., Qiao, Q., Wu, T., Qi, Y., Tan, S., Gao, X., & Zhang, Z. (2017). Biodegradable Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles for Regulating Tumor Microenvironment and Enhancing Antitumor Efficiency. *Theranostics*, 7(13), 3276–3292. <https://doi.org/10.7150/thno.19987>
- Lacasse, P., Denis, J., Lapointe, R., Leclerc, D., & Lamarre, A. (2008). Novel Plant Virus-Based Vaccine Induces Protective Cytotoxic T-Lymphocyte-Mediated Antiviral Immunity through Dendritic Cell Maturation. *Journal of Virology*, 82(2), 785–794. <https://doi.org/10.1128/JVI.01811-07>
- Lancet, J. E., Moseley, A. B., Coutre, S. E., DeAngelo, D. J., Othus, M., Tallman, M. S., Litzow, M. R., Komrokji, R. S., Erba, H. P., & Appelbaum, F. R. (2020). A phase 2 study of ATRA, arsenic trioxide, and gemtuzumab ozogamicin in patients with high-risk APL (SWOG 0535). *Blood Advances*, 4(8), 1683–1689. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001278>
- Lanier, O. L., Pérez-Herrero, E., Andrea, A. P. D. ', Bahrami, K., Lee, E., Ward, D. M., Ayala-Suárez, N., Rodríguez-Méndez, S. M., & Peppas, N. A. (2022). Immunotherapy approaches for hematological cancers. *IScience*, 25(11), 105326. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105326>
- Lee, S., Yun, H.-S., & Kim, S.-H. (2011). The comparative effects of mesoporous silica nanoparticles and colloidal silica on inflammation and apoptosis. *Biomaterials*, 32(35), 9434–9443. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.042>
- Li, Z., Barnes, J. C., Bosoy, A., Stoddart, J. F., & Zink, J. I. (2012a). Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2590. <https://doi.org/10.1039/c1cs15246g>
- Li, Z., Barnes, J. C., Bosoy, A., Stoddart, J. F., & Zink, J. I. (2012b). Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2590. <https://doi.org/10.1039/c1cs15246g>
- Liao, W., Liu, Z., Zhang, T., Sun, S., ye, J., Li, Z., Mao, L., & Ren, J. (2018). Enhancement of Anti-Inflammatory Properties of Nobiletin in Macrophages by a Nano-Emulsion Preparation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(1), 91–98. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03953>
- Lim, P. T., Goh, B. H., & Lee, W.-L. (2022). Taxol: Mechanisms of action against cancer, an update with current research. In *Paclitaxel* (pp. 47–71). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90951-8.00007-2>
- Lin, A. Y., Yang, E., Rink, J. S., Xu, D., Miller, S., & Gordon, L. I. (2023). Photoablation with the Aurolase System Reduces T Cell Exhaustion and Synergizes with Immunotherapies in Lymphoma. *Blood*, 142(Supplement 1), 2825–2825. <https://doi.org/10.1182/blood-2023-185400>

- Liquori, A., Ibañez, M., Sargas, C., Sanz, M., Barragán, E., & Cervera, J. (2020). Acute Promyelocytic Leukemia: A Constellation of Molecular Events around a Single PML-RARA Fusion Gene. *Cancers*, 12(3), 624. <https://doi.org/10.3390/cancers12030624>
- 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, Baja California.]. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3850>
- Lošdorfer Božič, A., & Šiber, A. (2018). Electrostatics-Driven Inflation of Elastic Icosahedral Shells as a Model for Swelling of Viruses. *Biophysical Journal*, 115(5), 822–829. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.07.032>
- Lucas, R. W., Larson, S. B., & McPherson, A. (2002). The crystallographic structure of brome mosaic virus. *Journal of Molecular Biology*, 317(1), 95–108. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5389>
- Ma, K., Werner-Zwanziger, U., Zwanziger, J., & Wiesner, U. (2013). Controlling Growth of Ultrasmall Sub-10 nm Fluorescent Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 25(5), 677–691. <https://doi.org/10.1021/cm303242h>
- Mahinpour, R., Riazi, G. H., Sarbolouki, M. N., Moosavi-Movahedi, A. A., Ahmadian, S., Shokrgozar, M. A., & Moosavi-Nejad, S. Z. (2009). Interference of arsenic trioxide on magnesium dependent polymerization of microtubule proteins. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 6(4), 715–721. <https://doi.org/10.1007/BF03246161>
- Mahmoud, M. M., Alenezi, M., Al-Hejin, A. M., Abujamel, T. S., Aljoud, F., Noorwali, A., Awad, I. A., Alkhaled, M., & Yacoub, H. A. (2022). Anticancer activity of chicken cathelicidin peptides against different types of cancer. *Molecular Biology Reports*, 49(6), 4321–4339. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07267-7>
- Majeed, M., Hakeem, K. R., & Rehman, R. U. (2022). Synergistic effect of plant extract coupled silver nanoparticles in various therapeutic applications- present insights and bottlenecks. *Chemosphere*, 288, 132527. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132527>
- Masarapu, H., Patel, B. K., Chariou, P. L., Hu, H., Gulati, N. M., Carpenter, B. L., Ghiladi, R. A., Shukla, S., & Steinmetz, N. F. (2017). Physalis Mottle Virus-Like Particles as Nanocarriers for Imaging Reagents and Drugs. *Biomacromolecules*, 18(12), 4141–4153. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01196>
- Méndez-Ferrer, S., Bonnet, D., Steensma, D. P., Hasserjian, R. P., Ghobrial, I. M., Gribben, J. G., Andreeff, M., & Krause, D. S. (2020). Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nature Reviews Cancer*, 20(5), 285–298. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0245-2>
- Meola, T. R., Abuhelwa, A. Y., Joyce, P., Clifton, P., & Prestidge, C. A. (2021). A safety, tolerability, and pharmacokinetic study of a novel simvastatin silica-lipid hybrid formulation in healthy male participants. *Drug Delivery and Translational Research*, 11(3), 1261–1272. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00853-x>
- Miao, C., Jia, P., Luo, C., Pang, J., Xiao, L., Zhang, T., Duan, J., Li, Y., & Sun, Z. (2024). The size-dependent in vivo toxicity of amorphous silica nanoparticles: A systematic review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 271, 115910. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115910>

- Mohseni, M., Gilani, K., & Mortazavi, S. A. (2015). Preparation and characterization of rifampin loaded mesoporous silica nanoparticles as a potential system for pulmonary drug delivery. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 14(1), 27–34. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4277616/>
- Morelli, C., Maris, P., Sisci, D., Perrotta, E., Brunelli, E., Perrotta, I., Panno, M. L., Tagarelli, A., Versace, C., Casula, M. F., Testa, F., Andò, S., Nagy, J. B., & Pasqua, L. (2011). PEG-templated mesoporous silica nanoparticles exclusively target cancer cells. *Nanoscale*, 3(8), 3198. <https://doi.org/10.1039/c1nr10253b>
- Muindi, J. R., Frankel, S. R., Huselton, C., DeGrazia, F., Garland, W. A., Young, C. W., & Warrell, R. P. (1992). Clinical pharmacology of oral all-trans retinoic acid in patients with acute promyelocytic leukemia. *Cancer Research*, 52(8), 2138–2142. <https://aacrjournals.org/cancerres/article/52/8/2138/467341/Clinical-Pharmacology-of-Oral-All-trans-Retinoic>
- Nandy, S., Kundu, D., & Naskar, M. K. (2014). Synthesis of mesoporous Stöber silica nanoparticles: the effect of secondary and tertiary alkanolamines. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 72(1), 49–55. <https://doi.org/10.1007/s10971-014-3420-7>
- Nie, D., Dai, Z., Li, J., Yang, Y., Xi, Z., Wang, J., Zhang, W., Qian, K., Guo, S., Zhu, C., Wang, R., Li, Y., Yu, M., Zhang, X., Shi, X., & Gan, Y. (2020). Cancer-Cell-Membrane-Coated Nanoparticles with a Yolk–Shell Structure Augment Cancer Chemotherapy. *Nano Letters*, 20(2), 936–946. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b03817>
- Niemirowicz, K., Prokop, I., Wilczewska, A., Wnorowska, U., Piktel, E., Wątek, M., Savage, P., & Bucki, R. (2015). Magnetic nanoparticles enhance the anticancer activity of cathelicidin LL-37 peptide against colon cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*, 3843. <https://doi.org/10.2147/IJN.S76104>
- Nobbmann, U. (2022, September 21). *Estimate Particle Concentration with the Nano*. <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/insights/particle-concentration-with-the-nano>
- Noguera, N., Catalano, G., Banella, C., Divona, M., Faraoni, I., Ottone, T., Arcese, W., & Voso, M. (2019). Acute Promyelocytic Leukemia: Update on the Mechanisms of Leukemogenesis, Resistance and on Innovative Treatment Strategies. *Cancers*, 11(10), 1591. <https://doi.org/10.3390/cancers11101591>
- Núñez-Rivera, A., Fournier, P. G. J., Arellano, D. L., Rodríguez-Hernández, A. G., Vázquez-Duhalt, R., & Cadena-Nava, R. D. (2020). Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 372–382. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.28>
- Pal, I., Brahmkhatri, V. P., Bera, S., Bhattacharyya, D., Quirishi, Y., Bhunia, A., & Atreya, H. S. (2016). Enhanced stability and activity of an antimicrobial peptide in conjugation with silver nanoparticle. *Journal of Colloid and Interface Science*, 483, 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.08.043>
- Pan, L., He, Q., Liu, J., Chen, Y., Ma, M., Zhang, L., & Shi, J. (2012). Nuclear-Targeted Drug Delivery of TAT Peptide-Conjugated Monodisperse Mesoporous Silica Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 134(13), 5722–5725. <https://doi.org/10.1021/ja211035w>

- Panteleev, P. V., Bolosov, I. A., Kalashnikov, A. À., Kokryakov, V. N., Shamova, O. V., Emelianova, A. A., Balandin, S. V., & Ovchinnikova, T. V. (2018). Combined Antibacterial Effects of Goat Cathelicidins With Different Mechanisms of Action. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02983>
- Park, S. J., & Bejar, R. (2020). Clonal hematopoiesis in cancer. *Experimental Hematology*, 83, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.02.001>
- Patel, A. G., & Kaufmann, S. H. (2012). How does doxorubicin work? *ELife*, 1. <https://doi.org/10.7554/eLife.00387>
- Patel, K. G., & Swartz, J. R. (2011). Surface Functionalization of Virus-Like Particles by Direct Conjugation Using Azide–Alkyne Click Chemistry. *Bioconjugate Chemistry*, 22(3), 376–387. <https://doi.org/10.1021/bc100367u>
- Phillips, E., Penate-Medina, O., Zanzonico, P. B., Carvajal, R. D., Mohan, P., Ye, Y., Humm, J., Gönen, M., Kalaigian, H., Schöder, H., Strauss, H. W., Larson, S. M., Wiesner, U., & Bradbury, M. S. (2014). Clinical translation of an ultrasmall inorganic optical-PET imaging nanoparticle probe. *Science Translational Medicine*, 6(260). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009524>
- Popat, A., Liu, J., Lu, G. Q. (Max), & Qiao, S. Z. (2012). A pH-responsive drug delivery system based on chitosan coated mesoporous silica nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, 22(22), 11173. <https://doi.org/10.1039/c2jm30501a>
- Rai, A., Pinto, S., Velho, T. R., Ferreira, A. F., Moita, C., Trivedi, U., Evangelista, M., Comune, M., Rumbaugh, K. P., Simões, P. N., Moita, L., & Ferreira, L. (2016). One-step synthesis of high-density peptide-conjugated gold nanoparticles with antimicrobial efficacy in a systemic infection model. *Biomaterials*, 85, 99–110. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.051>
- Rajagopal, P., Duraiswamy, S., Sethuraman, S., Giridhara Rao, J., & Krishnan, U. M. (2018). Polymer-coated viral vectors: hybrid nanosystems for gene therapy. *The Journal of Gene Medicine*, 20(4), e3011. <https://doi.org/10.1002/jgm.3011>
- Rajput, S., Volk-Draper, L. D., & Ran, S. (2013). TLR4 Is a Novel Determinant of the Response to Paclitaxel in Breast Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(8), 1676–1687. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-1019>
- Regazzi, M. B., Iacona, I., Gervasutti, C., Lazzarino, M., & Toma, S. (1997). Clinical Pharmacokinetics of Tretinoin. *Clinical Pharmacokinetics*, 32(5), 382–402. <https://doi.org/10.2165/00003088-199732050-00004>
- Rosenholm, J. M., Peuhu, E., Bate-Eya, L. T., Eriksson, J. E., Sahlgren, C., & Lindén, M. (2010). Cancer-Cell-Specific Induction of Apoptosis Using Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug-Delivery Vectors. *Small*, 6(11), 1234–1241. <https://doi.org/10.1002/smll.200902355>
- Rowinsky, E. K., Burke, P. J., Karp, J. E., Tucker, R. W., Ettinger, D. S., & Donehower, R. C. (1989). *Phase I and Pharmacodynamic Study of Taxol in Refractory Acute Leukemias*. <http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/49/16/4640/2436248/cr0490164640.pdf>
- Ruiz-Argüelles, G. J., Garcés-Eisele, J., Reyes-Núñez, V., Gómez-Rangel, J. D., & Ruiz-Delgado, G. J. (2004). More on Geographic Hematology: The Breakpoint Cluster Regions of the PML/RAR α Fusion Gene

- in Mexican Mestizo Patients with Promyelocytic Leukemia are Different from Those in Caucasians. *Leukemia & Lymphoma*, 45(7), 1365–1368. <https://doi.org/10.1080/10428190310001657344>
- Running, W. E., Ni, P., Kao, C. C., & Reilly, J. P. (2012a). Chemical Reactivity of Brome Mosaic Virus Capsid Protein. *Journal of Molecular Biology*, 423(1), 79–95. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.06.031>
- Running, W. E., Ni, P., Kao, C. C., & Reilly, J. P. (2012b). Chemical Reactivity of Brome Mosaic Virus Capsid Protein. *Journal of Molecular Biology*, 423(1), 79–95. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.06.031>
- Safenkova, I. V., Slutskaia, E. S., Panferov, V. G., Zherdev, A. V., & Dzantiev, B. B. (2016). Complex analysis of concentrated antibody-gold nanoparticle conjugates' mixtures using asymmetric flow field-flow fractionation. *Journal of Chromatography A*, 1477, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.040>
- Schwarz, B., Uchida, M., & Douglas, T. (2017). *Biomedical and Catalytic Opportunities of Virus-Like Particles in Nanotechnology* (pp. 1–60). <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.09.002>
- Scott F. G. (Ed.). (2013). *Developmental biology* (10th ed.). Sinauer Associates, Inc.
- Segovia-González, X. F., Villagrana-Escareño, M. V., Ríos-Ramírez, M., de la Cruz, V. S., Mejía-Hernández, J. N., Cuellar-Camacho, J. L., Patrón-Soberano, A., Sportsman, R., & Ruiz-García, J. (2023). An Observation of a Very High Swelling of Bromovirus Members at Specific Ionic Strengths and pH. *Viruses*, 15(10), 2046. <https://doi.org/10.3390/v15102046>
- Shahrivarkevishahi, A., Hagge, L. M., Brohlin, O. R., Kumari, S., Ehrman, R., Benjamin, C., & Gassensmith, J. J. (2022). Virus-like particles: a self-assembled toolbox for cancer therapy. *Materials Today Chemistry*, 24, 100808. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2022.100808>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- Speth, P. A. J., van Hoesel, Q. G. C. M., & Haanen, C. (1988). Clinical Pharmacokinetics of Doxorubicin. *Clinical Pharmacokinetics*, 15(1), 15–31. <https://doi.org/10.2165/00003088-198815010-00002>
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N., Jaffe, E., Pileri, S., Stein, H., Thiele, J., & Vardiman, J. (Eds.). (2017). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid*. (4th ed.). International Agency for Research on Cancer.
- Tallman, M., Lo-Coco, F., Barnes, G., Kruse, M., Wildner, R., Martin, M., Mueller, U., & Tang, B. (2015). Cost-Effectiveness Analysis of Treating Acute Promyelocytic Leukemia Patients With Arsenic Trioxide and Retinoic Acid in the United States. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 15(12), 771–777. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2015.07.634>
- Tan, A., Eskandar, N. G., Rao, S., & Prestidge, C. A. (2014). First in man bioavailability and tolerability studies of a silica–lipid hybrid (Lipoceramic) formulation: a Phase I study with ibuprofen. *Drug Delivery and Translational Research*, 4(3), 212–221. <https://doi.org/10.1007/s13346-013-0172-9>
- Tashtoush, B. M., Jacobson, E. L., & Jacobson, M. K. (2007). A rapid HPLC method for simultaneous determination of tretinoin and isotretinoin in dermatological formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(3), 859–864. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.08.027>

- Tejeda-Rodríguez, J. A., Núñez, A., Soto, F., García-Gradilla, V., Cadena-Nava, R., Wang, J., & Vazquez-Duhalt, R. (2019). Virus-Based Nanomotors for Cargo Delivery. *ChemNanoMat*, 5(2), 194–200. <https://doi.org/10.1002/cnma.201800403>
- Tomita, A., Kiyoi, H., & Naoe, T. (2013). Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As₂O₃) in acute promyelocytic leukemia. *International Journal of Hematology*, 97(6), 717–725. <https://doi.org/10.1007/s12185-013-1354-4>
- Tornesello, A. L., Borrelli, A., Buonaguro, L., Buonaguro, F. M., & Tornesello, M. L. (2020). Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities. *Molecules*, 25(12), 2850. <https://doi.org/10.3390/molecules25122850>
- Urata, C., Aoyama, Y., Tonegawa, A., Yamauchi, Y., & Kuroda, K. (2009). Dialysis process for the removal of surfactants to form colloidal mesoporous silica nanoparticles. *Chemical Communications*, 34, 5094. <https://doi.org/10.1039/b908625k>
- U.S. Cancer Statistics Working Group. U.S. Cancer Statistics Data Visualizations Tool. (2024, June). 5-year Relative Survival (Percent) All Types of Cancer. <https://www.cdc.gov/cancer/dataviz>
- Vicente-Deñás, C., Janssen, S., Oldenburg, M., Auer, F., González-Herrero, I., Casado-García, A., Isidro-Hernández, M., Raboso-Gallego, J., Westhoff, P., Pandya, A. A., Hein, D., Gössling, K. L., Alonso-López, D., De Las Rivas, J., Bhatia, S., García-Criado, F. J., García-Cenador, M. B., Weber, A. P. M., Köhrer, K., ... Borkhardt, A. (2020). An intact gut microbiome protects genetically predisposed mice against leukemia. *Blood*, 136(18), 2003–2017. <https://doi.org/10.1182/blood.2019004381>
- Watermann, A., & Brieger, J. (2017). Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery Vehicles in Cancer. *Nanomaterials*, 7(7), 189. <https://doi.org/10.3390/nano7070189>
- Wen, A. M., Lee, K. L., Yildiz, I., Bruckman, M. A., Shukla, S., & Steinmetz, N. F. (2012). Viral Nanoparticles for In vivo Tumor Imaging. *Journal of Visualized Experiments*, 69. <https://doi.org/10.3791/4352>
- Wilts, B. D., Schaap, I. A. T., & Schmidt, C. F. (2015). Swelling and Softening of the Cowpea Chlorotic Mottle Virus in Response to pH Shifts. *Biophysical Journal*, 108(10), 2541–2549. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.019>
- Wu, L., Wen, W., Wang, X., Huang, D., Cao, J., Qi, X., & Shen, S. (2022). Ultrasmall iron oxide nanoparticles cause significant toxicity by specifically inducing acute oxidative stress to multiple organs. *Particle and Fibre Toxicology*, 19(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12989-022-00465-y>
- Xie, A., Tsvetkova, I., Liu, Y., Ye, X., Hewavitharanage, P., Dragnea, B., & Cadena-Nava, R. D. (2021). Hydrophobic Cargo Encapsulation into Virus Protein Cages by Self-Assembly in an Aprotic Organic Solvent. *Bioconjugate Chemistry*, 32(11), 2366–2376. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00420>
- Xu, Z., Deng, P., Li, J., Tang, S., & Cui, Y. (2019). Modification of mesoporous silica with molecular imprinting technology: A facile strategy for achieving rapid and specific adsorption. *Materials Science and Engineering: C*, 94, 684–693. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.032>
- Xu, Z.-L., & Huang, X.-J. (2020). Therapeutic Approaches for Acute Promyelocytic Leukaemia: Moving Towards an Orally Chemotherapy-Free Era. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.586004>

- Yamada, H., Urata, C., Ujiie, H., Yamauchi, Y., & Kuroda, K. (2013). Preparation of aqueous colloidal mesostructured and mesoporous silica nanoparticles with controlled particle size in a very wide range from 20 nm to 700 nm. *Nanoscale*, 5(13), 6145. <https://doi.org/10.1039/c3nr00334e>
- Yanagisawa, T., Shimizu, T., Kuroda, K., & Kato, C. (1990). The Preparation of Alkyltrimethylammonium–Kanemite Complexes and Their Conversion to Microporous Materials. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 63(4), 988–992. <https://doi.org/10.1246/bcsj.63.988>
- Zhang, X.-W., Yan, X.-J., Zhou, Z.-R., Yang, F.-F., Wu, Z.-Y., Sun, H.-B., Liang, W.-X., Song, A.-X., Lallemand-Breitenbach, V., Jeanne, M., Zhang, Q.-Y., Yang, H.-Y., Huang, Q.-H., Zhou, G.-B., Tong, J.-H., Zhang, Y., Wu, J.-H., Hu, H.-Y., de Thé, H., ... Chen, Z. (2010). Arsenic Trioxide Controls the Fate of the PML-RAR α Oncoprotein by Directly Binding PML. *Science*, 328(5975), 240–243. <https://doi.org/10.1126/science.1183424>
- Zhong, S., Salomoni, P., & Pandolfi, P. P. (2000). The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nature Cell Biology*, 2(5), E85–E90. <https://doi.org/10.1038/35010583>

Anexos

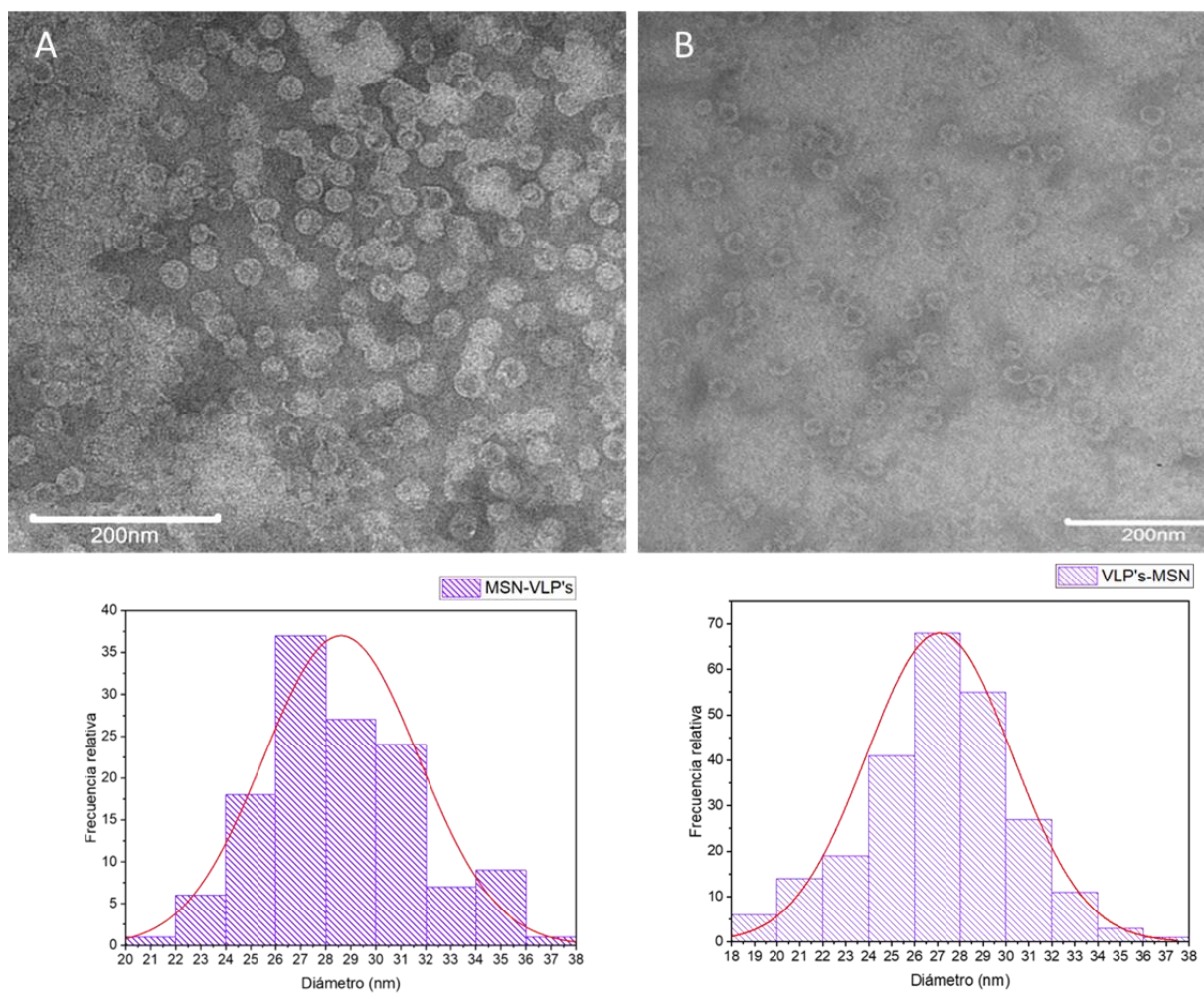


Figura 21. Formación de VLP-MSN. A) VLP-MSN formadas con las MSN-8. B) VLP-MSN formadas con las MSN-20.