

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



Maestría de en Ciencias en Física de Materiales

**Fabricación de un bio-nanomotor para el transporte de
fármacos**

Tesis

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

Presenta:

José Antonio Tejeda Rodríguez

Ensenada, Baja California, México
2017

Tesis defendida por

José Antonio Tejeda Rodríguez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Víctor Julián García Gradilla
Director del Comité

Dr. Rubén Darío Cadena Nava

Dr. Víctor Ruiz Cortes

Dr. Felipe Castellón Barraza



Dr. Leonel S. Cota Araiza
Coordinador del Posgrado en Física

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

José A. Tejeda Rodríguez © 2017

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

Resumen de la tesis que presenta **José Antonio Tejeda Rodríguez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Física de Materiales en Biomedicina.

Fabricación de un bio-nanomotor para el transporte de fármacos

Resumen aprobado por:

Dr. Víctor Julián García Gradilla
Director de tesis

Los micro/nanomotores son un tipo de máquinas miniaturizadas capaces de convertir la energía química o externa en movimiento mecánico a escalas micro y nanométricas. Estas pequeñas máquinas pueden ser modificadas o funcionalizadas de tal manera que puedan interactuar no solo con el medio en el que están embebido, sino, con distintas partículas de manera selectiva. Es de gran interés que estas nanomáquinas sintéticas sean biocompatibles, con la idea de poder ser aplicados en el campo de la nanomedicina, como en el transporte selectivo de fármacos, la nanocirugía de precisión, la obtención de biopsias, la clasificación de células, el ensayo de diagnóstico, etc. En este proyecto se llevó a cabo la fabricación del primer bionanomotor híbrido de dimensión totalmente nanométrica, tomando como andamio la cápside viral de un virus icosaédrico de 28 nm de diámetro y que infecta plantas, en este caso fue usado el virus del moteado clorótico del caupí (CCMV), el cual fue metalizado de manera asimétrica empleando la técnica de “Shadow Deposition”, dicho metalizado asimétrico fue corroborado por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se realizaron estudios de movimiento y velocidad según distintas concentraciones de peróxido de hidrogeno el cual es utilizado como combustible, así como la inserción, y transporte del profármaco anticancerígeno Tamoxifen, utilizado para el tratamiento de cáncer de mama, además posee propiedades fluorescente, lo cual nos permitirá observar las cápsides que lo contengan, generando así, un bionanomotor como un “nanotransportador” de fármacos. Estos resultados podrían extenderse a otros tipos de nanomotores y/o virus para su uso potencial para el transporte de moléculas terapéuticas, lo cual podría revolucionar la forma en la cual se suministran los fármacos actualmente.

Palabras clave: Nanomotores, Nanomáquinas, CCMV (Virus del moteado clorótico del caupí), Virus, Janus Virus.

Abstract of the thesis presented by **José Antonio Tejada Rodríguez** as partial requirement to obtain the Master degree in Materials Physics with orientation in Biomedicine.

Fabrication of a bio-nanomotor for drug transport

Abstract approved by:

Dr. Víctor Julián García Gradilla
Thesis Director

Micro / nanomotors are a type of miniaturized machines capable of converting the chemical or external energy in mechanical movement down to micro and nanometric scales. These small machines can be modified or functionalized in a way that they can interact with not only the medium in which they are embedded, but with different particles selectively. It is of great interest that these synthetic nanomachines are biocompatible, with the idea of being applied in the field of nanomedicine, as in selective drug transport, precision nanosurgery, obtaining biopsies, cell classification, diagnosis, etc. In this project the manufacture of the first hybrid bionanomotor of total nanosized dimension was carried out, taking as a scaffold the viral capsid of an icosahedral virus of 28 nm in diameter that infecting plants, in this case we used the virus of the Cowpea chlorotic mottle virus (CCMV), which was asymmetrically metalized using the "Shadow Deposition" technique, this asymmetric metallization was corroborated by transmission electron microscopy (TEM). Movement and velocity studies were performed according to different concentrations of hydrogen peroxide which is used as fuel, as well as the insertion and transport of the anticancer prophylactic Tamoxifen, used in the treatment of breast cancer, and has fluorescent properties that will allow us to observe the capsids containing it, thus generating a bionanomotor as a nanotransporter of drugs. These results could be extended to other types of nanomotors and / or viruses for their potential use in the transport of therapeutic molecules, which could revolutionize the way that drugs are currently supplied.

Key words: Nanomotor, Nanomachines, CCMV (Cowpea chlorotic mottling virus), Virus, Janus Virus.

Dedicatoria

A mi madre Eliane, mi abuelita Deborah y Adriana,
por todo su apoyo, amor y cariño incondicional.

Agradecimientos

- Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por permitirme realizar mis estudios de posgrado.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante mis estudios de maestría no. 611611
- A mi tutor de tesis, el Dr. Víctor Julián García Gradilla por haberme introducido y guiado en mi investigación
- Al Dr. Rubén Darío Cadena Nava por su enorme apoyo con muestra, técnicas y consejos, sin ellos este trabajo habría sido imposible
- A los jóvenes de servicio social Eduardo Sergio Oliveros Mata y Diana Isabel Sandoval Bojórquez por contribuir para el desarrollo de este trabajo
- Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM, por haberme adoptado y otorgado los medios para realizar mi trabajo de investigación
- Al proyecto de Ciencia Básica CONACYT no. 239953 por el financiamiento de este trabajo.
- Al programa de becas UC Mexus – CICESE por la beca otorgada para mi estancia en la Universidad de California en San Diego (UCSD).
- Al Dr. Joseph Wang por permitir el acceso a sus laboratorios y equipo en UCSD.
- Al personal del laboratorio de Nanomáquinas en UCSD por su apoyo brindado en mi estadía.
- Al personal del Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM por sus atenciones y su buena disposición, especialmente al Sr. Francisco Ruiz por su apoyo con el TEM y al Dr. Eduardo Murillo por su apoyo con el AFM.

Tabla de contenido

	Página
Resumen español.....	ii
Resumen inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Capítulo 1. Introducción	10
1.1 Micro/nanomotores.....	10
1.2 Clasificación de motores según su mecanismo de propulsión	10
1.2.1 Micro/nanomotores impulsados por combustible	10
1.2.2 Propulsión por burbujas.....	11
1.3 Micro/nanomotores libres de combustible	14
1.3.1 Motores impulsados magnéticamente	14
1.3.2 Motores impulsados por ultrasonido.....	15
1.4 Aplicaciones biomédicas de los micro/nano motores	16
1.4.1 Detección y aislamiento	16
1.4.2 Transporte de fármacos	17
1.4.3 Microcirugía	18
1.5 Virus y cápsides virales.....	19
Capítulo 2. Antecedentes	21
Capítulo 2. Hipótesis y Objetivo	26
2.1 Hipótesis.....	26
2.2 Objetivo	26
2.3 Objetivos particulares	26
Capítulo 3. Materiales y Métodos	27
3.1 Virus CCMV y BMV	27
3.1.1 Los virus CCMV y BMV.....	27
3.2 Marcador fluorescente.....	28
3.2.1 NanoOrange®	28
3.3 Fármaco.....	29
3.3.1 Tamoxifen.....	29

3.4 Inserción de marcador fluorescente	29
3.5 Visualización de virus con NanoOrange	29
3.6 Liberación de marcador fluorescente	31
3.7 Depósitos metálicos	32
3.8 Recubrimiento y purificación de cápsides virales	33
3.9 Preparación de muestra para análisis en TEM	35
3.10 Pruebas de movimiento	36
3.11 Inserción del profármaco a virus.....	37
3.11.1 Visualización de los virus cargados con profármaco.....	37
3.12 Internalización de bionanomotores virales en células cancerígenas.....	38
3.12.1 Internalización bionanomotores virales marcados con NanoOrange® en células cancerígenas.....	38
Capítulo 4. Técnicas de caracterización	39
4.1 Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	39
4.2 Espectroscopia de energía dispersa (EDX)	40
4.3 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)	41
4.4 Depósito por erosión iónica o pulverización catódica (Sputtering).....	42
4.5 Microscopia de fluorescencia.....	43
4.6 Microscopia confocal	44
Capítulo 5. Resultados y discusión	46
5.1 Pruebas de fluorescencia	46
5.2 Prueba de liberación de marcador fluorescente en virus	47
5.3 Recubrimientos metálicos de platino.....	49
5.4 Caracterización TEM de virus recubiertos con platino	51
5.6 Visualización y movimiento de bionanomotores virales	55
5.6.1 Propulsión de virus de CCMV recubiertas de platino (bionanomotores de CCMV)	55
5.6.2 Propulsión de BMV recubiertas de platino (bionanomotores virales de BMV).....	58
5.7 CCMV para transporte de fármacos.....	59
5.8 Virus en células de cáncer de mama	61
Capítulo 6. Conclusiones	66
Capítulo 7: Perspectivas	67
Literatura citada	68

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Representación esquemática de un micro/nanomotor en movimiento bajo el mecanismo de propulsión burbuja	11
2	Nanorod de Platino-Oro	12
3	Difusioforesis de una partícula cargada negativamente cerca de una superficie cargada negativamente	13
4	Micro/nanomotores magnéticos	14
5	Ilustración esquemática de un micro/nanomotor fabricado de una aleación de metal Au-Ni-Au propulsado por ultrasonido y guiado por un campo magnético	15
6	Reproducción de cápside del CCMV por medio de cryo-TEM	20
7	Dos cápsulas de nanotubos de carbono en su configuración rígida	21
8	Propulsión catalítica y magnética de un nanomotor híbrido	22
9	Representación esquemática de un micromotor Janus de Al/Pd	23
10	Micromotores multicargados	24
11	Representación esquemática de bionanomotor utilizando como base la cápside viral del virus CCMV	25
12	Pico de emisión y de excitación de colorante fluorescente NanoOrange®	28
13	Filtro de luz azul B-2A Nikon®	30
14	Elementos para realizar depósitos metálicos	32
15	Portaobjetos con virus y base a 65° para realizar el depósito metálico de platino	34
16	Metodología de purificación de muestra	35
17	Preparación de muestra de TEM	36
18	Rejillas de TEM fijadas sobre Scotch tape para realizar depósito metálico	36
19	Esquema de microscopio electrónico de transmisión	39
20	Proceso de generación rayos X en EDX	40
21	Esquema de método de detección del AFM	41
22	Esquema de proceso de sputtering	42
23	Proceso de microscopia de Fluorescencia	43
24	Microscopia confocal	45
25	Comparación de intensidad de luz en virus marcados fluorescentemente (izquierda) y solución sin virus (derecha)	46
26	Visualización por microscopia óptica de fluorescencia de virus de CCMV marcados fluorescentemente (izquierda) y cuantificación de intensidad de luz del fondo con respecto a los virus CCMV marcados fluorescentemente (derecha).	47
27	Liberación de moléculas en virus de CCMV	48
28	Análisis topográfico de depósitos de platino sobre superficies de silicio	49
29	Análisis topográfico de último depósito de platino sobre superficies de silicio	51
30	Análisis de microscopía electrónica de transmisión del virus CCMV y bionanmotores virales a base de CCMV	52
31	Análisis de microscopía electrónica de transmisión de BMV con y sin recubrimiento de platino	54
32	Virus de CCMV recubiertos con platino	55
33	Comparación de movimiento en bionanmotores de CCMV	56
34	Análisis de velocidad de bionanmotores de CCMV con respecto a distintas concentraciones de H ₂ O ₂	57
35	Movimiento de bionanmotores de BMV	58
36	Análisis de velocidad de bionanmotores de BMV con respecto a distintas concentraciones de H ₂ O ₂	58

37	CCMV marcados con Tamoxifen	60
38	Internalización de virus de CCMV cargadas con Tamoxifen en células de cáncer de mama MDA-231	61
39	Internalización de bionanomotores cargados con Tamoxifen dentro de células de cáncer MDA-231	62
40	Control de experimentos de internalización	63
41	Internalización de bionanomotores de virus de CCMV en células de cáncer de mama (MDA-231)	64

Capítulo 1. Introducción

1.1 Micro/nanomotores

Los micro/nanomotores son máquinas fabricadas por el hombre a escalas tan pequeñas como el de las bacterias o incluso motores moleculares en virus, estos motores pueden convertir la energía química o externa en movimiento mecánico a dichas escalas. En la última década se han logrado importantes avances en el diseño y la fabricación de los micro/nano-motores como futura plataforma biomédica inteligente (Abdelmohsen, Peng, Tu, & Wilson, 2014).

A escalas tan pequeñas, factores como la inercia son despreciables, dado que cualquier fuerza mecánica aplicada es contrarrestada inmediatamente por la resistencia viscosa, que en conjunto con la difusión Browniana hacen que el movimiento de estas máquinas diminutas sea una tarea complicada (Sánchez, Soler, & Katuri, 2015).

Los micro/nanomotores pueden ser clasificados en dos grupos principales: autónomos y dependientes.

Los micro/nanomotores dependientes son aquellos que para lograr un movimiento continuo a escalas tan pequeñas, necesitan de algún estímulo o fuerza de manera continua, estos estímulos pueden ser accionados externamente por un dispositivo macroscópico que proporcione la energía que se convertirá en movimiento, por ejemplo campos eléctricos, magnéticos o acústicos.

Los micro/nanomotores autónomos son aquellos que convierten la energía en movimiento de manera local sin la necesidad de algún estímulo externo, obteniendo energía mecánica a partir de reacciones químicas *in-situ* mediante la catálisis (Sánchez et al., 2015).

1.2 Clasificación de motores según su mecanismo de propulsión

1.2.1 Micro/nanomotores impulsados por combustible

Para que cualquier motor funcione se requiere de una fuente de energía para generar el movimiento. En el caso de los micro/nanomotores, la energía requerida para la motilidad se obtiene generalmente a través de la descomposición de un combustible por un catalizador. El tipo de

combustible, la concentración de combustible, la naturaleza del motor catalítico, y el control de las velocidades y movimiento son factores claves para el desarrollo y efectividad de estos motores. Algunos ejemplos de métodos de propulsión a base de combustibles son: Propulsión de burbujas, difusión forosis, electroforéticos, y propulsión de gradiente interfacial (Abdelmohsen et al., 2014).

1.2.2 Propulsión por burbujas

La propulsión por medio de burbujas es probablemente el mecanismo más investigado en el campo de los nanomotores. Hay muchos ejemplos que se centran en el diseño de motores (por ejemplo, motores microtubulares) que operan a través de la propulsión de burbujas. Este tipo de propulsión se origina por la descomposición espontánea de un combustible en contacto con un catalizador, liberando burbujas de gas del tamaño de micras: Dicha liberación de burbujas acciona el movimiento de los motores hacia una dirección lejos del catalizador (Abdelmohsen et al., 2014).

Uno de los combustibles más utilizados es la descomposición catalítica del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en solución acuosa. Utilizando platino (Pt) como catalizador, se sustraen electrones del H_2O_2 reduciendo la energía de activación sobre el H_2O_2 , descomponiendo $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$, donde el O_2 genera las burbujas de un lado del micro/nanomotor lo que resulta en la fuerza de propulsión del motor en dirección opuesta a las burbujas y al catalizador generando el movimiento base de combustibles (Abdelmohsen et al., 2014).

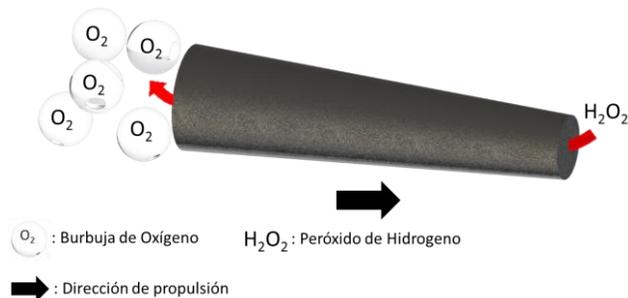


Figura 1. Representación esquemática de un micro/nanomotor en movimiento bajo el mecanismo de propulsión burbuja. La superficie interior está construida de un catalizador de Pt. Durante la descomposición del peróxido, se generan burbujas de oxígeno liberándose del extremo más ancho del motor, lo que resulta en la propulsión del motor en dirección opuesta a las burbujas y el catalizador.

1.2.3 Propulsión por Auto-electroforesis

En la auto-electroforesis los micro/nanomotores generan un campo eléctrico local a través de gradientes químicos y se mueven en respuesta a este campo eléctrico auto-generado.

Por ejemplo en el caso de los micro/nanomotores bimetalícos Au-Pt (Figura 2) la oxidación del H_2O_2 se produce preferencialmente en el extremo del ánodo (Pt) y la reducción del H_2O_2 (y O_2) en el extremo del cátodo (Au). La superficie de oro cataliza una reacción que toma protones, electrones y H_2O_2 produciendo H_2O , esta reacción hace que los protones y electrones fluyan desde el lado del platino. En la sección intermedia, la misma cantidad de electrones y protones recorren la superficie del micro/nanomotor, a su vez la carga positiva de los protones atraen a las moléculas de agua, arrastrándolas a los largo del micro/nanomotor. Por último, la sección de platino se encarga de generar los protones necesarios al catalizar la descomposición del H_2O_2 en electrones, protones y oxígeno molecular. En resumen, el micro/nanomotor obtiene su movimiento debido a la reacciones químicas que ocurren en la superficie de oro y platino, y al flujo ininterrumpido de electrones, protones y moléculas que ayudan a que el micro/nanomotor pueda superar la viscosidad del fluido y moverse a través de el mismo (Mallouk & Sen, 2009).

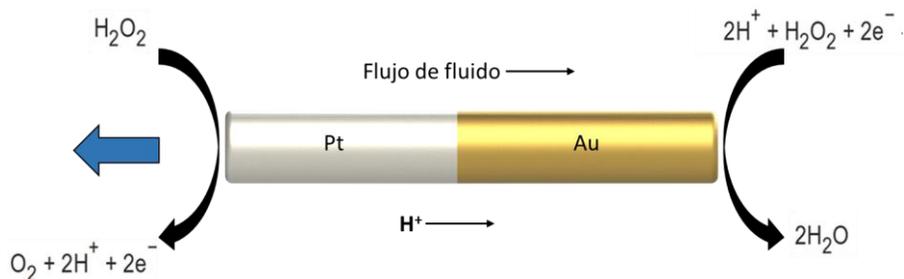


Figura 2. Nanorod de Platino-Oro.

1.2.4 Propulsión por difusioforesis

Difusioforesis es un fenómeno en el cual el movimiento de las partículas es impulsado por un gradiente de concentración de los solutos. Es posible clasificar la difusioforesis en dos categorías principales: Difusioforesis electrolito y no electrolito, en el que las moléculas que contribuyen

gradiente se encuentran cargada o no cargadas, respectivamente (Wang, Duan, Ahmed, Mallouk, & Sen, 2013)

Las reacciones químicas que tienen lugar en las superficies consumen reactivos y generan productos, lo que lleva a concentración de gradientes que potencian el movimiento de motores. En estos casos, el término auto-difusioforesis es utilizado como mecanismo de propulsión debido al hecho de que el gradiente de concentración es generado por el micro/nanomotor (Wang et al., 2013)

En la figura 3 se muestra un esquema de difusioforesis de electrolitos, donde una partícula cargada es conducida por un gradiente de concentración de especies iónicas. Dado que los cationes y aniones se difunden a distintos ritmos, se genera un campo eléctrico que impulsa a una partícula cargada. Así mismo, los cationes y aniones interactúan con la doble capa de la partícula cargada de manera diferente, lo que resulta en una presión que mueve la partícula hacia la sección de mayor concentración de electrolitos.

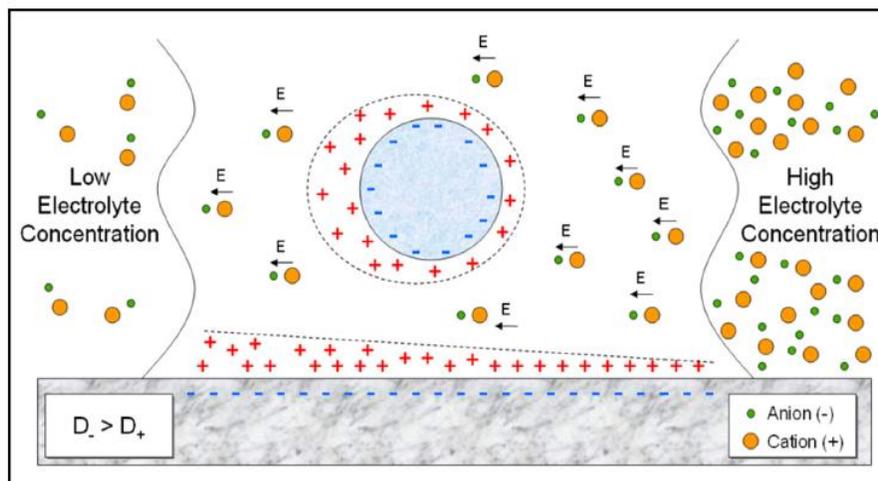


Figura 3. Difusioforesis de una partícula cargada negativamente cerca de una superficie cargada negativamente (Wang et al., 2013).

1.3 Micro/nanomotores libres de combustible

1.3.1 Motores impulsados magnéticamente

Los micro/nanomotores impulsados magnéticamente presentan características de suma importancia para ser utilizados en sistemas biológicos, no necesitan combustibles que pueden llegar a ser tóxicos, no forman subproductos, son relativamente fáciles de manipular y se puede controlar la dirección de su movimiento.

Estos micro/nanomotores están elaborados con elementos magnéticos, estructuras helicoidales, nanohilos flexibles (Figura 4A) o rígidos, o microperlas que al interactuar con un campo magnético les otorgan propiedades de movimiento (Abdelmohsen et al., 2014).

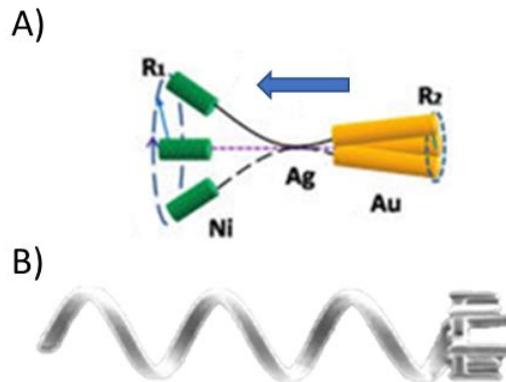


Figura 4. Micro/nanomotores magnéticos. A) Micro/nanomotor magnético con sección flexible de Ag. B) Micro/nanomotor magnético helicoidal (Wang et al., 2013).

Los micro/nanomotores magnéticos helicoidales (Figura 4B) al ser expuestos a un campo magnético giratorio, la rotación de la cabeza inducida magnéticamente es convertida en movimiento de traslación en una dirección dependiente de la quiralidad de la hélice. La rotación de la cabeza magnética da como resultado el movimiento. La dirección del movimiento se puede cambiar fácilmente mediante la inversión del campo magnético rotatorio (Abdelmohsen et al., 2014).

1.3.2 Motores impulsados por ultrasonido

El ultrasonido son ondas mecánicas, cuya frecuencia está por encima del valor umbral del rango de audición humana (aproximadamente 20 000 Hz) que puede ser utilizado como un estímulo externo de propulsión de pequeños motores (Abdelmohsen et al., 2014).

Los motores impulsados por ultrasonido son microvarillas que poseen un extremo cóncavo o convexo, otorgándole una forma asimétrica. La asimetría de la microvarilla induce una contribución no equivalente en la presión de ultrasonido, por lo tanto un gradiente de presión en la superficie de las microvarillas las impulsa unidireccionalmente (Figura 5). Es posible controlar la dirección del movimiento de estos motores, al agregar secciones magnéticas en la parte media del mismo, al trabajar en conjunto con el transductor generando las ondas de ultrasonido y controlando el campo magnético agregado es posible obtener un movimiento predeterminado y controlado de los micro/nanomotores (García-Gradilla et al 2013, Abdelmohsen et al. 2014).

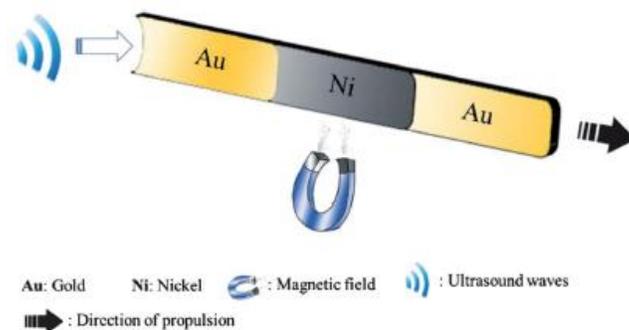


Figura 5. Ilustración esquemática de un micro/nanomotor fabricado de una aleación de metal Au-Ni-Au propulsado por ultrasonido y guiado por un campo magnético (Abdelmohsen et al., 2014).

1.3.3 Motores impulsados por electricidad

Los diodos son dispositivos electrónicos capaces de rectificar la corriente en un sentido, este principio se utiliza para la fabricación de micro/nanomotores donde al aplicar un campo eléctrico externo de corriente alterna se produce en el motor una corriente eléctrica en un sentido, de la cual es posible obtener movimiento. El flujo electro-osmótico localizado alrededor de los diodos otorga movimiento direccional de los mismos (Calvo-Marzal et al., 2010).

Como ejemplo están los diodos elaborados por Wang et al, donde utilizaban nanohilos de poli (pirrol)-cadmio (PPy-Cd) y CdSe-Au- CdSe, que al aplicar un campo eléctrico se observa una locomoción direccional de estos nanohilos a $17.2 \mu\text{m s}^{-1}$.

Este tipo de propulsión de micro/nanomotores libre de combustibles podría llegar a ser considerado en algún momento para aplicaciones biomédicas. Los nuevos motores de nanohilos multisegmento podrían ser espacialmente funcionalizados hacia la creación de nanomáquinas que realicen tareas específicas, tales como el transporte y liberación de fármacos (Calvo-Marzal et al., 2010).

1.3.4 Motores impulsados por luz

Micropartículas de cloruro de plata (AgCl) poseen propiedades fotosensibles que pueden ser explotadas para obtener movimiento al contacto con la luz. Sen et al. demostró que la disolución de AgCl inducida por luz ultra violeta (UV) produce protones e iones cloruro donde la velocidad de la difusión de los protones que se alejan del AgCl es diferente de la de los iones cloruro, lo que conduce a la formación de un gradiente de electrolito alrededor de la partícula de AgCl que resulta en auto-difusioforesis, donde los cationes y aniones se difunden a distintos ritmos, y se genera un campo eléctrico que impulsa a una partícula de AgCl hacia la sección de mayor concentración de electrolitos (Ibele, Mallouk, & Sen, 2009).

Las micropartículas AgCl ($1\mu\text{m}$ de diámetro) al estar en agua desionizada y ser expuestas a rayos ultra violeta (UV) obtienen velocidades de hasta $100 \mu\text{m s}^{-1}$. Las soluciones que contienen una alta concentración de micromotores de AgCl exhiben comportamiento colectivo.

1.4 Aplicaciones biomédicas de los micro/nano motores

1.4.1 Detección y aislamiento

Los micro/nanomotores tienen el potencial de detectar y aislar biomoléculas y células en muestras biológicas.

Las capacidades de detección y aislamiento altamente específicos de estas micro/nanomotores los hacen particularmente atractivos en la construcción de dispositivos bioanalíticos de microchip, los

cuales son creados a partir de distintos componentes, donde cada uno es individualmente responsable de la detección, aislamiento y bioanálisis (Abdelmohsen et al., 2014).

Basados en la interacción de donante-receptor, los micro/nanomotores poseen la habilidad de capturar y transportar diferentes cargas. Un ejemplo de esto son los micro/nanomotres de oro/níquel/polianilina/platino funcionalizados con bioreceptores como lectinas y anticuerpos ConA que son efectivos en el reconocimiento y aislamiento de las bacterias como e-coli y s-aureus (Abdelmohsen et al., 2014). Así mismo, también se han utilizado micro/nanomotores funcionalizados con secuencias de oligonucleótidos como plataformas sensibles para aplicaciones de detección. Por ejemplo, micro/nanomotores a base de silica mesoporosa funcionalizada asimétricamente con ADN de una sola hebra y catalasa con los cuales se logró capturar con éxito y selectivamente ADN solo y ADN funcionalizado con Sulfo-SMCC con cargamento partículas más pequeñas de silica en fluidos biológicos (Gao, et al. Manesh, Hua, Sattayasamitsathit, & Wang, 2011)

1.4.2 Transporte de fármacos

Una de las principales aplicaciones para los micro/nanomotores es el transporte de fármacos, donde se modifican los micro/nanomotores para realizar interacciones específicas con el fármaco (o cargamento), esto con el fin de mejorar la manera en la cual se suministran los fármacos hoy en día.

Se han investigado distintos micro/nanomotores por su capacidad para transportar cargamentos, así como vehículos para el transporte de fármacos, tales como liposomas o microesferas. Algunos ejemplos de micro/nanomotores modificados para el transporte de fármacos son los micro/motores catalíticos de aleaciones de Ni/(AU₅₀ / AG₅₀) / Ni / Pt para transportar microesferas magnéticas de PLA (ácido poliláctico) cargadas de doxorubicina y liposomas magnéticos (Abdelmohsen et al., 2014). Así mismo se han utilizado micromotores tubulares para el transporte de fármacos hacia células cancerígenas, dentro de los motores tubulares se colocaron nanopartículas de platino estabilizadas con cloruro de dialildimetilamonio mientras que en el exterior se colocó doxorubicina un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de gran variedad de formas de cáncer. Dichos motores poseen un tamaño de 12 μm de largo por 5 μm y una fuerza de propulsión tal, que les otorgaba velocidades de 74 $\mu\text{m s}^{-1}$, suficiente para penetrar parcialmente células HeLa y liberar la doxorubicina. Estos motores poseen desplazamiento máximo sobre los 30 centímetros (Li, Wu, Xie, & Ju, 2015).

El problema en utilizar motores catalíticos para el transporte de fármacos, es que por lo general los combustibles utilizados para generar movimiento son tóxicos, y su uso en el cuerpo humano podría traer efectos adversos en lugar de ayudar, es por eso, que para el transporte de fármacos se busca utilizar micro/nanomotores que utilicen otro tipo de combustible o medio para obtener su movimiento.

Para realizar aplicaciones in vivo sin el uso de motores catalíticos, el uso de campos magnético es adecuado ya que las intensidades requeridas de estos campos son inofensivos para los seres humanos. En el trabajo de Gao et al. 2011 se reportan el uso de micro/nanomotores magnéticos flexibles de Ni/Ag funcionalizados para capturar partículas con óxido de hierro y doxorubicina encapsulada a través de partículas de poli (D, L-láctico-co-ácido glicólico) (PLGA, por sus siglas en inglés) para la administración de fármacos en células HeLa, a través de medios de cultivos celular.

El proceso de transporte consiste en aplicar un campo magnético sobre el micromotor de Ni/Ag y desplazarlo hacia las partículas cargadas con doxorubicina para adjuntarla al micromotor, y trasladar estos micromotores cargados a través de microcanales hasta la célula HeLa en cuestión para liberar el fármaco (Gao et al., 2011)

1.4.3 Microcirugía

Una cirugía exitosa requiere de incisiones precisas y de localización exacta. Sin embargo, realizar una cirugía mínimamente invasiva con escalpelos y tijeras puede ser imposible de realizar, por lo cual se le ha prestado atención a microtaladros magnéticos y microjets enrollados debido a que pueden penetrar en biomateriales en presencia de un campo magnético externo o combustible.

Los microjets poseen puntas afiladas y exhiben un movimiento parecido al de un sacacorchos en presencia de peróxido de hidrógeno, lo que les permite perforar células HeLa (células de cáncer cérvico uterino) fijas, esto con la finalidad de algún día poder hacer cortes precisos incluso a nivel celular siendo mínimamente invasivos. Sin embargo, el combustible empleado para impulsar el microjet puede ser tóxico para los sistemas biológicos, lo que restringe su aplicación en seres vivos. Como opción alternativa se utilizan microtubos de Ti / Cr / Fe controlados remotamente bajo un campo magnético externo, el movimiento de estos microtaladros es manipulado y controlado, eliminando el requisito de combustibles tóxicos (Abdelmohsen et al., 2014).

1.5 Virus y cápsides virales

La búsqueda de nuevas aplicaciones para las nanomáquinas nos obligan a crear nanomotores con propiedades únicas, las cuales le permitirán realizar tareas específicas, por ello es necesario apoyarse de componentes que ya se encuentren a escalas de nanómetros y poder transformarlos en nanomotores realizando mínimas modificaciones en su estructura base para otorgarle propiedades de movimiento, tal es el caso de los virus y las cápsides virales.

Los virus son agentes infecciosos, consistentes en material genético (RNA o DNA) rodeado por una capa de proteínas denominada cápside. Los virus al infectar una célula huésped utilizan su maquinaria metabólica para replicarse. Es posible encontrar virus en bacterias, protozoarios, plantas, hongos, animales y humanos.

Las proteínas que constituyen la cápside de algunos virus poseen la capacidad de autoensamblarse en cápsides idénticas al virus nativo, generando nanoestructuras bien definidas, con características similares a los virus del cual provienen. Muchas partículas virales pueden ser utilizadas y ensambladas de tal forma que no contengan el material genético, de esta manera dejan de ser partículas infecciosas y pierden su capacidad de auto propagarse. De esta manera se generan partículas que mantienen sus estructuras geométricas y pueden ser utilizadas como andamios básicos para el diseño y fabricación de materiales nanoestructurados (O'Neil, Reichhardt, Johnson, Prevelige, & Douglas, 2011). Estas nanoestructuras son llamadas partículas tipo virus (VLPs, por sus siglas en inglés) son formadas a partir de las proteínas de la cápside de un virus y pueden contener en su interior alguna molécula de interés o estar vacías, concretamente contenedores proteicos que son llamados VLPs.

Los virus con geometría icosaédrica (CCMV o BMV por ejemplo), poseen un rango amplio de diámetros que pueden van desde menos de 17 nm hasta 40 nm y el virus nativo es de 28 nm de diámetro. Los virus poseen poros que permiten la difusión de moléculas pequeñas del exterior hacia el interior y viceversa. Esta característica permite su uso como bionanorreactores, es decir, como estructuras de protección para reacciones catalíticas cuando se tienen enzimas como cargamento, de tal manera que por medio de poros se hace posible la entrada de sustrato y la salida del producto, lo cual las hace de gran interés para la creación de bionanomotores, en especial el virus del virus del

moteado clorótico del frijol caupí (CCMV, por sus siglas en inglés)(figura 6), dado que la proteína de la cápside del CCMV ha demostrado tener la capacidad de autoensamblarse de forma espontánea de manera *in vitro*, además posee la capacidad de llevar en su interior cargamento no viral (Azizgolshani, Garmann, Cadena-Nava, Knobler, & Gelbart, 2013).

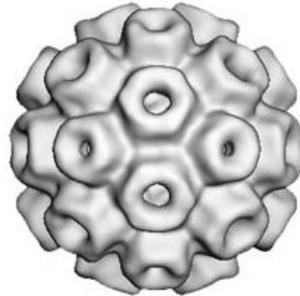


Figura 6. Reproducción de cápside del CCMV por medio de cryo-TEM (Fox et al., 1998).

Las propiedades del virus de CCMV antes mencionadas las convierten en los candidatos perfectos para ser utilizados como base para la creación del primer bionanomotor con capacidad de transporte de fármacos.

En este trabajo se propone la fabricación de un bionanomotor utilizando como base la cápside del virus de planta CCMV, a través de la modificación de una de las caras de su superficie con un recubrimiento metálico, semejante a los nanomotores tipo Janus (Gao *et al*, 2013), los cuales obtienen su movimiento debido al empuje de las burbujas de oxígeno asociadas con la descomposición catalítica del peróxido de hidrógeno en el revestimiento asimétrico de platino, pretendiendo conservar las propiedades de retención, encapsulamiento, y protección de la cápside viral.

Capítulo 2. Antecedentes

La fabricación de sistemas a escala nanométrica capaces de auto-propulsión a través del movimiento lineal o de la rotación de sus partes representa uno de los retos más interesantes para la ciencia y la tecnología en los campos de la física, la química y la biología (Delogu, 2009).

En 2009, Deloug presentó un trabajo donde se simula el movimiento por medio del uso de dos cápsulas de nanotubos de carbono de una sola pared con una configuración en zig zag y una sección circular estable una dentro de la otra (figura 7). Se utilizaron nanotubos dado que poseen excelentes propiedades electrónicas, mecánicas, así como la posibilidad única que ofrecen de generar y controlar diferentes formas de movimiento (Delogu, 2009).

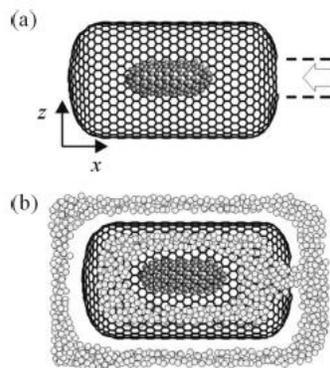


Figura 7. (a) Dos cápsulas de nanotubos de carbono en su configuración rígida. Las dos líneas paralelas punteadas y la flecha indican la posición y el tamaño del agujero en el extremo del nanotubo de carbono exterior. (b) Una vista en sección transversal del conjunto del nanotubo de carbono relajado que contiene átomos de Ar en fase líquida. Las zonas claras y oscuras indican respectivamente, átomos Ar y C (Delogu, 2009).

Las simulaciones de dinámica molecular clásica sugieren que un conjunto de nanotubos de carbono como el que realizó Deloug en 2009 es capaz de impulsarse. Posiblemente puedan realizarse ensambles más complejos en una fase líquida bajo la influencia de un campo eléctrico superpuesto (Delogu, 2009).

Trabajos como el de Deloug ayudaron a continuar las investigaciones en generar movimiento a escalas pequeñas, las cuales han dieron lugar a micro/nanmotores más potentes y que utilicen distintos estímulos para obtener su movimiento. Dichos estímulos pueden ser a base de

combustibles como aquellos que se mueven a base de reacciones químicas como nanohilos de Pt-Au o motores de microtubos enrollados. También existen aquellos micro/nanomotores que no necesitan de estímulos que involucren el uso de combustibles, como aquellos que ofrecen propulsión efectiva accionada magnéticamente o eléctricamente.

En 2011 Gao, *et al* describieron el diseño de un modo dual de locomoción, y las ventajas de un motor de nanohilo híbrido en paralelo que puede tener dos fuentes de propulsión, química y magnéticamente. Los nanomotores híbridos podrían ampliar el alcance de la operación de nanomáquinas hechas por el hombre en ambientes diversos y cambiantes (Gao et al., 2011).

Tal motor de nanohilos híbrido es preparado tras la adición de un segmento de Pt en su segmento de Au para crear una “cabeza” catalítica de Pt-Au (Figura 8) y su capacidad de propulsión es accionada por combustible que está en contacto con el Pt mientras que el impulso magnético ocurre al hacer rotar la sección de Ni al interactuar con un campo magnético (Gao et al., 2011).

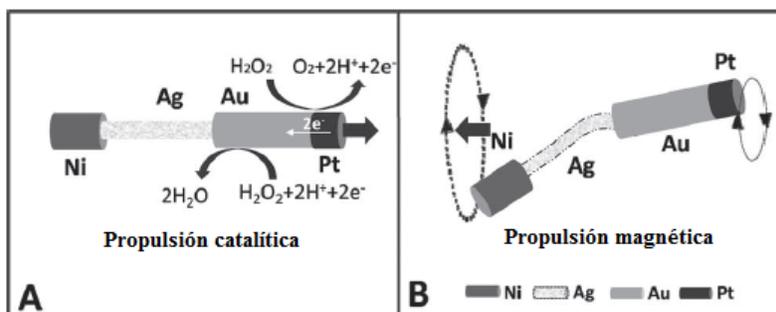


Figura 8. Propulsión a) catalítica y b) magnética de un nanomotor híbrido (Gao et al., 2011).

El modo de propulsión dual del nanomotor híbrido aumenta la versatilidad y amplía el alcance de la operación de nanomáquinas hechas por el hombre. El diseño de tal nanomotor híbrido compromete sólo mínimamente el rendimiento de los modos de propulsión individuales y puede abordar el agotamiento de combustible y la limitación de sal común en motores accionados químicamente (Gao et al., 2011).

Los nanomotores híbridos representan un diseño atractivo y novedoso de nanovehículos autorregulados que pueden adaptar y reconfigurar su funcionamiento de acuerdo con el entorno y acontecimientos inesperados, hacia varias aplicaciones importantes tales como la entrega de cargamentos, fármacos, o recolección de sustancias peligrosas, entre otras (Gao et al., 2011).

En 2013 Gao, *et al* continua trabajando con los micro/nanomotores y describe el uso de un micromotor tipo Janus que puede ser impulsado a través de la reacción de 3 combustibles diferentes: ácidos, básicos y peróxido de hidrogeno. Los micromotores Janus de Al/Pd eran preparadas depositando una capa de paladio en un lado de las micropartículas de aluminio (5–30 μm), el paladio era utilizado como catalizador para fomentar la degradación del peróxido de hidrogeno y generar burbujas de oxigeno que le otorgan la propiedad de movimiento mientras que el aluminio era utilizado en medios altamente ácidos o básicos (HCl y NaOH) para producir empuje a raíz de burbujas de hidrogeno en distintas reacciones (figura 9), obteniendo una velocidad máxima de 200 $\mu\text{m/s}$ y un tiempo de vida de 8 minutos.

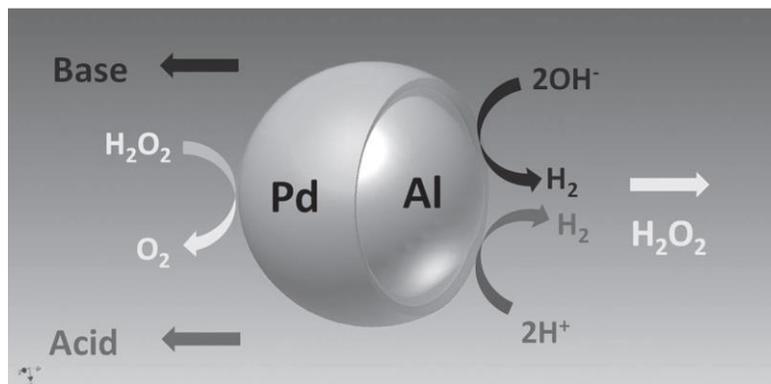


Figura 9. Representación esquemática de un micromotor Janus de Al/Pd (Gao, D'Agostino, Garcia-Gradilla, Orozco, & Wang, 2013)

Este micromotor tipo Janus de Al/Pd fue el primer ejemplo de un micromotor que podía operar en un medio altamente alcalino ($\text{pH} > 11$) y el primero en el que se observaba claramente la estela de burbujas que propulsan estos motores. Así mismo este micromotor tenía la posibilidad de cambiar su combustible según el medio en el que estuviera embebido, esta capacidad de operación de multicomcombustible los hace atractivos ofreciendo un alcance de operación más amplio.

Sin embargo limitantes como el tamaño, el tipo de micromotor (Janus), y su mecanismo de propulsión los hacen ineficientes en cuestiones de biocompatibilidad y transporte de fármacos, moléculas o cualquier otro componente a escalas nanométricas.

La entrega de cargamentos de una manera definida y rápida representa una de las principales aplicaciones de los micromotores sintéticos. El desafío principal, es cómo diseñar, fabricar y optimizar nuevos motores con funciones apropiadas para el transporte y la liberación de cargamentos útiles de manera eficaz y eficiente. Se busca que un micro/nanomotor tenga la capacidad de llevar una gran cantidad de cargamentos, que libere dichos cargamentos de manera sensible (por ejemplo, la liberación controlada de fármacos), y que se desintegre cuando haya cumplido su tarea (Sattayasamitsathit et al., 2014).

Para cumplir con estos requisitos críticos de multifuncionalidad, en 2014 Sattayasamitsathit *et al* construyeron con éxito un micromotor a base de zinc impulsado químicamente que muestra capacidades de carga, entrega y liberación (figura 10).

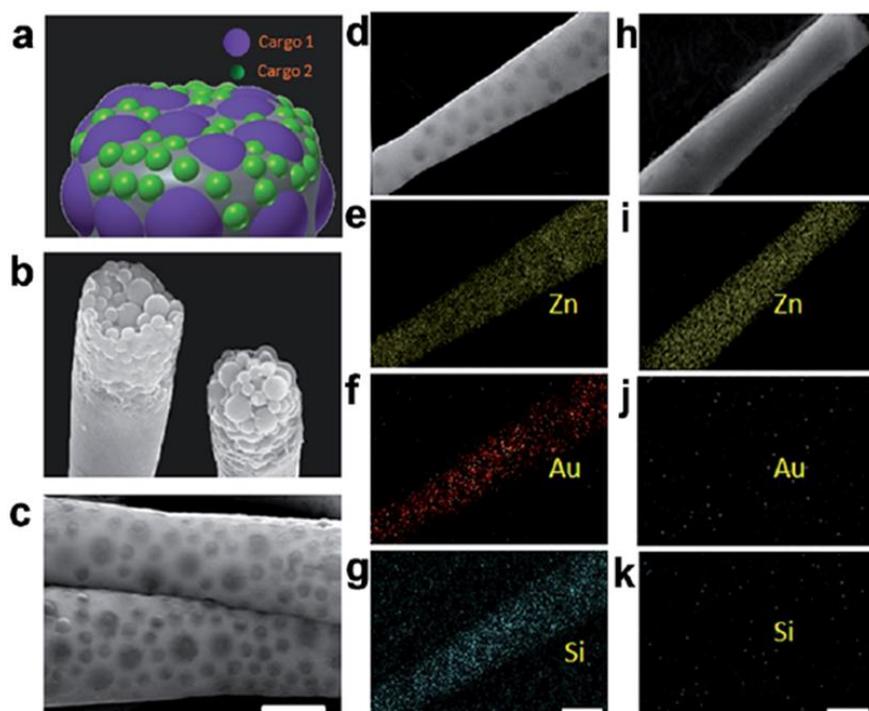


Figura 10. Micromotores multicargados. (a) Modelo representativo de la encapsulación de diferentes tipos de cargas, (b-c), imágenes de SEM muestran la vista superior (b) y lateral (c) de los micromotores totalmente cargados con dos tamaños diferentes partículas de SiO_2 (500 y 250 nm de diámetro). (d-g), imagen de SEM (d) y análisis EDX (e-g) de los micromotores completamente cargados con nanopartículas de SiO_2 (500 nm) y nanopartículas de oro (25 nm). (h-k), Imagen de SEM (h) y análisis EDX (i-k) de un control de un micromotor de zinc sin ninguna carga de partículas. Todas las barras poseen una escala de $1 \mu\text{m}$ (Sattayasamitsathit et al., 2014).

El micromotor auto propulsado de Sattayasamitsathit *et al* posee múltiples funciones potencialmente útiles para aplicaciones biomédicas, tales como: una muy alta capacidad de carga, entrega de diferentes tipos cargas y liberación de carga de manera autónoma. Por otra parte, a diferencia de la mayoría de los micromotores existentes que están diseñados para resistir el deterioro, estos nuevos micromotores se destruyen a sí mismos después de completar su misión de entrega (Sattayasamitsathit et al., 2014).

A pesar de que ya se ha experimentado con micro/nanmotores para su potencial uso en aplicaciones biomédicas, aún existen limitantes que impiden su total uso en dichas aplicaciones, tales como el tamaño, biocompatibilidad, y transporte de cargamentos a escalas nanométricas.

Es por eso que en el presente trabajo se propone el desarrollo de un bionanomotor híbrido, biocompatible y capaz de trasladar cargamentos a escalas 100% nanométricas. Esto es posible al utilizar como base la cápside viral del virus CCMV dado sus propiedades de contracción, expansión o subdivisión en torno a cambios de pH, permeabilidad al sustrato y al producto, y protección que ofrecen las proteínas que conforman la cápside viral del virus CCMV al cargamento que se encuentre en su interior. Al realizar un recubrimiento asimétrico de platino de pocos nanómetros de espesor sobre la cápside viral del virus CCMV y al estar embebido H_2O_2 , semejante o basado en los motores tipo Janus (Gao et al., 2013), se espera obtener un bionanomotor que obtendrá propulsión a través de la descomposición de dos moléculas de H_2O_2 en dos moléculas de H_2O y O_2 , donde el O_2 genera las burbujas de un lado del bionanomotor lo que resulta en la fuerza de propulsión del motor en dirección opuesta al recubrimiento (figura 11). Además, se propone su uso para el transporte del profármaco Tamoxifen, efectivo en el tratamiento de cáncer de mama, debido a su capacidad de retención de moléculas.

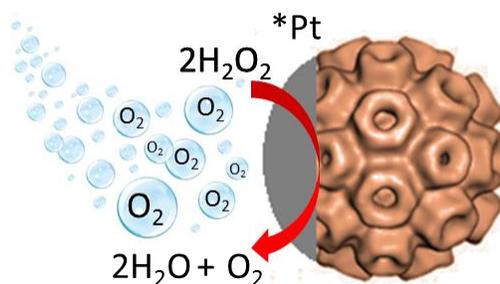


Figura 11. Representación esquemática de bionanomotor utilizando como base la cápside viral del virus CCMV.

Capítulo 2. Hipótesis y Objetivo

2.1 Hipótesis

Es posible crear un nanomotor recubriendo virus icosaédricos asimétricamente con platino, generando propulsión a base de burbujas sin alterar su capacidad de retención de moléculas.

2.2 Objetivo

Fabricar bionanmotores utilizando como base la cápside viral icosaédrica de los bromovirus CCMV y BMV para el transporte de fármacos.

2.3 Objetivos particulares

- Fabricar un bionanomotor a base de cápside viral de CCMV y BMV a través de un recubrimiento metálico de platino asimétrico.
- Estudiar al bionanomotor por medio de microscopía óptica a través de la inserción de un marcador fluorescente (NanoOrange) y un fármaco anticancerígeno fluorescente (Tamoxifen).
- Estudiar la liberación del marcador fluorescente NanoOrange del bionanomotor
- Estudiar los recubrimientos de platino sobre virus para determinar las condiciones esenciales para crear un bionanomotor.
- Estudiar las velocidades de bionanmotores de CCMV y BMV con respecto a distintas concentraciones de combustible.
- Estudiar el potencial uso de lo bionanmotores sintetizados en cultivos celulares.

Capítulo 3. Materiales y Métodos

En este capítulo se describen los materiales y procedimientos utilizados para el desarrollo del bionanomotor. Entre los materiales principales en encuentran los virus CCMV y BMV los cuales se utilizan como base para los bionanmotores. Como procedimiento se describe la manera en la cual se recubren metálicamente las cápsides virales para inducir la propulsión y su funcionalización con un marcador fluorescente para su correcta visualización (NanoOrange) y el profármaco anticancerígeno Tamoxifen, la manera en la cual se realizan los depósitos metálicos, pruebas de liberación de cargamento utilizando el marcador fluorescente NanoOrange, movimiento del bionanomotor a distintas concentraciones de peróxido de hidrogeno, e internalización a células de cáncer de mama MDA-231.

3.1 Virus CCMV y BMV.

3.1.1 Los virus **CCMV** y **BMV**, virus del moteado clorótico del frijol caupí y del mosaico del bromo son virus de plantas que se compone de una cápside constituida de proteínas que protegen a su material genético, en este caso ARN de cadena sencilla. Su cubierta de proteína, o cápside es de forma icosaédrica, se compone de capsómeros de proteínas en este caso 12 pentámeros y 20 hexámeros constituidos por subunidades proteicas idénticas, y poseen un tamaño de 28 nm. Las cápsides de estos virus servirán como base para fabricar el bionanomotor debido a sus propiedades de fácil manejo, producción, capacidad de expansión y desensamble en función de cambios de pH, y fuerza iónica (Ma, Nolte, & Cornelissen, 2012). El virus es cultivado y purificado en los laboratorios del Departamento de Bionanotecnología del CNYN-UNAM.

3.2 Marcador fluorescente

La visualización de partículas nanométricas es complicado a través de microscopia óptica convencional, es por eso que es necesario apoyarnos de componentes que nos permitan observarlas aun en condiciones no favorables para un microscopio óptico, tal es el caso de los marcadores fluorescentes como el NanoOrange.

3.2.1 NanoOrange® es un colorante fluorescente adecuado para uso con espectrofluorómetros y lectores de microplacas. La química única del reactivo NanoOrange® permite la detección precisa de proteínas en solución a concentraciones entre 10 ng/ml y 10 mg/ml. Este nivel de sensibilidad es considerablemente superior a la obtenida con el método BCA, ensayo de Bradford, ensayo de Lowry, o absorción a 280 nm. Posee un pico de excitación centrado en 470 nm y un pico de emisión en 570 nm (figura 12) Este colorante fluorescente es utilizado para poder visualizar las cápsidas virales en el microscopio óptico al utilizarlo en conjunto con un filtro de luz azul.

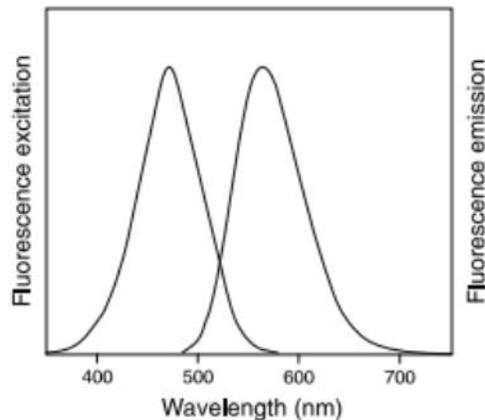


Figura 12. Pico de emisión y de excitación de colorante fluorescente NanoOrange®. Imagen tomada de: tools.thermofisher.com

3.3 Fármaco

3.3.1 Tamoxifen es un profármaco utilizado para el tratamiento del cáncer de mama. Este profármaco posee cualidades de fluorescencia por sí mismo, y al insertarse en los sitios hidrofóbicos de los virus CCMV y BMV hace posible visualizarlos. Se pretende utilizar el profármaco Tamoxifen insertado en las cápsides virales, como prueba de concepto para probar la capacidad del bionanomotor a base del CCMV o BMV como acarreador y su posible uso en el tratamiento de enfermedades.

3.4 Inserción de marcador fluorescente

Para realizar la inserción del marcador fluorescente a la cápside viral de CCMV y BMV se utilizó el Kit de Cuantificación de Proteínas NanoOrange®. Se colocó en un tubo de microcentrifuga (1) de 1.5ml, 50µl de diluyente en 450µl de agua desionizada (filtrada utilizando un filtro MILLEX®-GV con diámetro de poro de 0.22µl), posteriormente se colocaron 3µl de NanoOrange® en 497µl de la solución (1), creando la solución (2), por último en un nuevo tubo de microcentrífuga se agregan 10µg de virus CCMV (o BMV en su defecto) en 490µl de la solución (2), recubrir completamente con aluminio y dejar incubar por 15 minutos en total oscuridad para permitir que el marcador fluorescente se adhiera a las secciones hidrofóbicas de la cápside viral de CCMV.

3.5 Visualización de virus con NanoOrange

Con el objetivo de determinar si era posible observar los virus funcionalizadas con NanoOrange se utilizó el microscopio Nikon® Eclipse Ti de transmitancia, con un objetivo fluorescente de 20x, con el software Nis Elements versión 4.4 y cámara Hamamatsu modelo Orca-Flash 4.0

La preparación de las muestras para su visualización fue la siguiente:

- Control: 1µl de Dodecilsulfato sódico (SDS, surfactante de sigma aldrich 99%) al 2%, y 9µl de solución de virus 1 µg/ml sin marcar.

- Prueba de Fluorescencia: SDS 2%: 1 μ l y solución de virus marcada fluorescentemente con Kit de Cuantificación de Proteínas NanoOrange®.
- Prueba de virus recubiertos con Pt: SDS 2%: 1 μ l y solución de virus marcada fluorescentemente con Kit de Cuantificación de Proteínas NanoOrange® con recubrimiento metálico (Pt): 9 μ l.

Una vez preparada las muestras, se colocó la solución final (10 μ l) sobre un porta objetos delgado de la marca VWR 22x50mm, y al mismo tiempo la lámpara de mercurio de amplio ancho espectral con el filtro azul B-2A (excitación en 490 nm y emisión en 516 nm) de la marca Nikon® (Figura 13) para poder observar los viruss marcados con el fluoróforo esto con el propósito de confirmar que los virus de CCMV habían sido marcadas fluorescentemente. Los resultados se pueden consultar en la sección 5.1.



Figura 13. Filtro de luz azul B-2A Nikon®.

3.6 Liberación de marcador fluorescente

Se aprovechó la capacidad de expansión y desensamble en torno a cambios de pH de los virus, pretendiendo utilizar esta propiedad para liberar compuestos previamente cargados en el interior de las cápsides, en este caso se utilizó como primera prueba de liberación del marcador fluorescente NanoOrange.

Con el fin de probar que los virus poseen la capacidad de liberar su contenido al ser expuestas a distintas condiciones de pH, se crearon las siguientes pruebas:

- Prueba de control. Se expone la cápside cargada con NanoOrange a condiciones en las que se mantenga la cápside estable y no libere cargamento, sirviendo como punto de comparación con los experimentos de liberación. Se utilizó un grupo control, el cual nos permitirá tener un punto de comparación, en este caso será utilizado para comparar los virus marcados fluorescentemente en un pH y condiciones en las cuales sabemos que retendrá la molécula fluorescente. El control fue elaborado de la siguiente manera: 5µl de solución amortiguadora de Virus a pH 6, y 5 µl solución de virus marcada fluorescentemente con Kit de Cuantificación de Proteínas NanoOrange®, esperando mantener las partículas fluorescentes al mantenerlas en condiciones ideales de contracción utilizando un pH ácido.
- Prueba de liberación. Se expone el virus cargada con NanoOrange a condiciones de desensamble para comprobar la capacidad de liberación. En la prueba de liberación se sometieron los virus cargados con el marcador fluorescente NanoOrange a condiciones de pH que desensamble la cápside viral en subunidades liberando el marcador fluorescente, la prueba de liberación fue realizada de la siguiente manera: 5µl Buffer de Fosfato de Sodio 0.5M pH 8, y 5µl solución de virus marcada fluorescentemente con Kit de Cuantificación de Proteínas NanoOrange®. Al utilizar un pH básico se espera que las cápsides virales se desensamble en subunidades de proteínas liberando el marcador fluorescente, perdiendo su fluorescencia; lo cual indicaría una liberación exitosa.

Los tiempos de visualización de muestras fue a los tiempos: 0 horas, 24 horas y 48 horas respectivamente por medio del microscopía de fluorescencia. Esto con el fin de mostrar la evolución de la liberación y difusión del cargamento fluorescente con respecto al tiempo.

3.7 Depósitos metálicos

En esta sección se darán a conocer las técnicas y proceso utilizado para realizar los depósitos metálicos sobre las cápsides virales de BMV y CCMV.

Se utilizó la técnica de pulverización catódica (sputtering) para recubrir las cápsides con una capa delgada metálica de platino. Para poder obtener un recubrimiento metálico sobre las cápsides virales que fuese uniforme, pero a su vez lo suficientemente delgado para mantener las propiedades de la misma, era necesario conocer los espesores generados por el equipo en cuestión. Los depósitos metálicos se realizaron por medio de la técnica de pulverización catódica o erosión iónica (sputtering), utilizando una pequeña oblea de silicio y un pequeño pedazo de vidrio de un tamaño aproximado de 1.5 cm x 1.5 cm, sobreponiendo uno sobre el otro y sujetados por un clip de papelera, con el propósito de crear un perfil en el que se pueda caracterizar su espesor posteriormente por microscopía AFM.

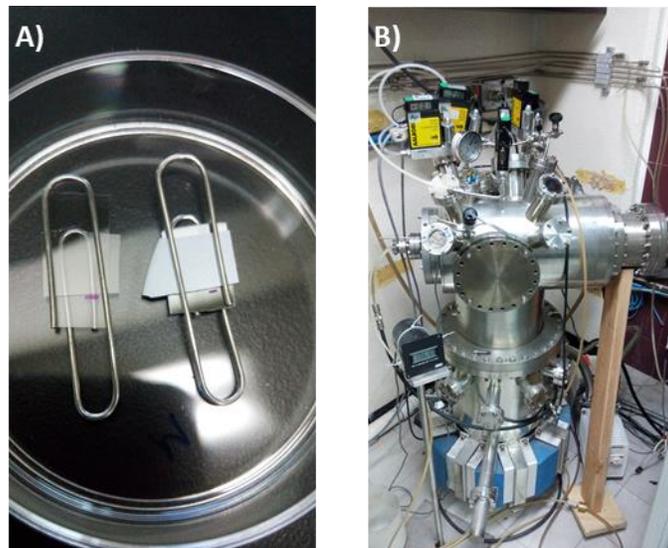


Figura 14. Elementos para realizar depósitos metálicos. A) Muestras a colocar en cámara de sputtering. B) Cámara de sputtering.

Posteriormente fueron introducidos a la cámara de Sputtering donde las condiciones de la cámara fueron: un vacío base de 0.3 mTorr, un flujo de Argón de 3cm^3 y una presión de trabajo de 4.5 mTorr, y un blanco de platino de 2 pulgadas de diámetro, 0.125 pulgadas de espesor al 99.99 % de pureza.

Se realizaron varias pruebas para poder identificar los parámetros ideales de depósitos metálicos sobre cápsides virales para obtener recubrimientos homogéneos y tasas de depósito bajas, variando tiempos de depósito y potencia del plasma:

1. 10 segundos de depósito a Pt, 75 Watts de intensidad en plasma.
2. 20 segundos de depósito a Pt, 75 Watts de intensidad en plasma.
3. 60 segundos de depósito a Pt, 10 Watts de intensidad en plasma.

Una vez obtenidos los recubrimientos, la sección inferior de las obleas de silicio, así como las secciones de vidrio fueron analizadas por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, por sus siglas en inglés) para poder medir los espesores de los recubrimientos y poder identificar las condiciones requeridas para recubrir las cápsides virales con una capa metálica delgada y uniforme.

3.8 Recubrimiento y purificación de cápsides virales

Una vez identificadas las condiciones esenciales de recubrimiento metálico asimétrico, el espesor, y homogeneidad sobre los virus como se explica en la sección 5.3 de resultados más adelante, se realizó el depósito de platino por medio de la técnica de pulverización catódica o erosión iónica (sputtering) sobre los virus cargados con NanoOrange para fabricar un nanomotor tipo Janus que fuera posible de observar por fluorescencia. Como primer paso se vertió de manera homogénea los virus, esto se consigue al utilizar un portaobjetos limpio y colocándolo en un ángulo aproximando de 30°: utilizando una micropipeta extraemos 200µl de la solución con el virus marcado y se escurre de la parte superior del portaobjetos hacia abajo, recuperando el exceso en la parte inferior (repetir 3 veces) y se coloca en campana de extracción por 10 minutos o hasta que se seque por completo. Hecho lo anterior, se sustrae el porta objetos, es colocado en una base que tiene un ángulo de 65° tal como se observa en la figura 15 siguiendo el protocolo de depósito de Ogata *et al.* con la finalidad de obtener un recubrimiento asimétrico y es llevado a la cámara de depósito por sputtering para recubrir las cápsides con platino con un espesor aproximado de 5 nm con las siguientes condiciones en cámara: flujo de 3cm³ de Argón, vacío base de ~0.3 mTorr (1 hora 30 minutos de espera), un presión de trabajo ~4.5 mTorr y para el depósito: 60 segundos de exposición a Pt con 10 Watts de intensidad en plasma.



Figura 15. Portaobjetos con virus y base a 65° para realizar el depósito metálico de platino.

Con la finalidad de poder recuperar las cápsides virales ya recubiertas para poder visualizarlas se retiró el portaobjetos de la base, y se colocó en una caja Petri de plástico o vidrio limpia, se agregó 1 μ l de agua desionizada sobre la sección recubierta evitando derrames, y se raspó dicha sección con la punta de la micropipeta hasta re suspender aproximadamente 95% (figura 16, A)) de la muestra, se colocó en un tubo eppendorf de 1.5ml y se sónico 4 veces por periodos de 5 segundos. Se utilizó un filtro de la marca MILLEX® con diámetro de poro de 0.22 μ m junto con una jeringa convencional de 5ml para eliminar excedentes y partículas de gran tamaño de Pt y se coloca en un nuevo vial. Posteriormente se centrifuga por 20 minutos a una velocidad de 9,000 RPM para formar un precipitado de cápsides virales recubiertas, se extrae el excedente hasta dejar aproximadamente 100 μ l de muestra concentrada. Una vez realizada esta serie de paso se obtiene una muestra libre de impurezas y en solución que solo contendrán los virus recubiertas con Pt para su posterior visualización.

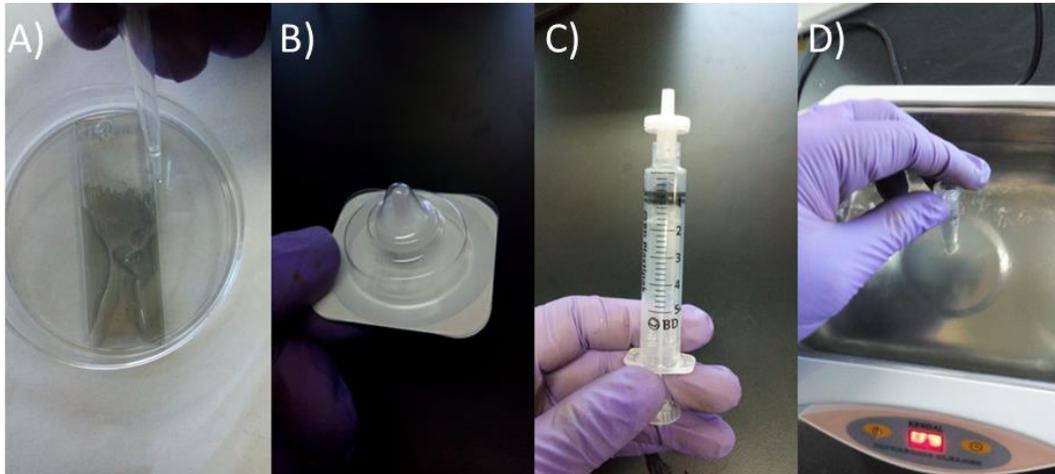


Figura 16. Metodología de purificación de muestra. A) Resuspensión y recuperación de muestra. B) Filtro de la marca MILLEX®. C) Colocación de filtro en jeringa convencional. D) Sonicación de muestra.

3.9 Preparación de muestra para análisis en TEM

Ya identificadas las condiciones ideales de tiempo de depósito e intensidad de plasma para obtener un recubrimiento metálico homogéneo y delgado, se realizó la preparación de la muestra para el análisis de los recubrimientos metálicos sobre los virus para asegurar que dichos recubrimientos sean delgados (~ 2.5 nm) y asimétricos al realizar un análisis por TEM. Dicha preparación fue llevada a cabo utilizando una rejilla circular de cobre con una malla de 400 poros y de 3.0 mm de diámetro de la marca TedPella sobre la cual se colocaron $6\mu\text{l}$ de una solución diluida (1-100) de la solución madre de virus CCMV (o BMV) $\text{mg}/\mu\text{l}$ y se deja reposar 3 minutos (figura 17); se eliminó el exceso de muestra adjuntado un pequeño pedazo de papel Whatman 42 y se esperó 2 minutos a que se secase la rejilla. Para los controles se colocó $5\mu\text{l}$ de solución madre de virus de CCMV y $1\mu\text{l}$ de acetato de uranilo para poder observar las cápsides virales sin depósito metálico.



Figura 17. Preparación de muestra de TEM

Una vez seca la rejilla de TEM, sobre un portaobjetos se colocó una sección de Scotch™ tape transparente, y sobre dicha sección se colocaron las rejillas de TEM y se fijaron con una pieza fina de tape en una orilla de la rejilla sin tocar el centro de la rejilla (figura 18).

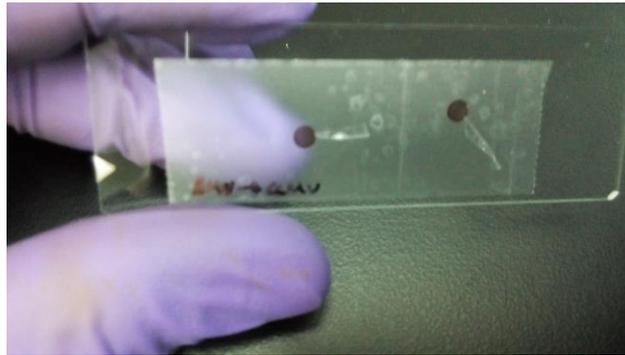


Figura 18. Rejillas de TEM fijadas sobre Scotch tape para realizar depósito metálico.

3.10 Pruebas de movimiento

- Para determinar si los virus recubiertos con platino y marcadas con NanoOrange poseían el movimiento característico de los motores a base de combustible y su velocidad con respecto a la concentración de combustible se realizaron pruebas de movimiento con respecto a distintas concentraciones de combustible (H_2O_2) el cual es catalizado por medio del Pt liberando burbujas que nos generan movimiento (más información en sección 1.2). Se utilizó dodecilsulfato sódico (SDS) al 2% como surfactante, una solución de peróxido de hidrógeno al 50% de la marca Sigma-Aldrich® como combustible, y una solución de virus recubiertos con platino. Las pruebas de movimiento con peróxido fueron elaboradas por triplicado variando la concentración de peróxido de hidrogeno de 1-3% en 1µl de SDS 2%, y el resto de solución de virus recubiertos con platino aforando a 10 µl.

Las pruebas de movimiento fueron realizadas en un porta objetos delgado (0.15 mm) colocado el microscopio óptico invertido con epifluorescencia Nikon® Eclipse Ti, con un objetivo de 20x y filtro de luz azul B-2A Nikon®, agregando en última instancia el peróxido de hidrógeno y accionando rápidamente la opción de grabar video en el software Nis Elements versión 4.4. (Resultados en la sección 5.6.1 y 5.6.2).

3.11 Inserción del profármaco a virus

Una de las metas principales de la creación del bionanomotor es poder otorgarle una aplicación, tal como lo es la entrega dirigida de fármacos y para llegar a este punto es necesario realizar pruebas que nos indiquen que vamos en la dirección correcta, por ello se realizó una prueba de transporte de fármacos.

Una vez comprobado el movimiento del bionanomotor, se dispuso a continuar con la inserción del profármaco a los virus para su transporte. Se utilizó 1mg del profármaco Tamoxifen al 99% de pureza de Sigma-Aldrich, el cual fue diluido en 20µl de dimetilsulfóxido (DMSO) al 99.9% de pureza de Sigma-Aldrich, y 980µl de buffer fosfato salino (PBS), para obtener una disolución del profármaco a 1µg/µl.

Ya que se obtuvo el profármaco en dilución se procedió a la inserción del mismo en el virus de CCMV. Se colocó en un eppendorf de 1.5ml, 50µl de diluyente en 450µl de agua desionizada (filtrada utilizando un filtro MILLEX®-GV con diámetro de poro de 0.22µl) esta será la solución (1), posteriormente se colocaron 20µl Tamoxifen en 480µl de la solución (1), creando la solución (2), por último en un nuevo eppendorf se agregan 40µl de virus CCMV en 460µl de la solución (2), recubriendo completamente con aluminio y dejar incubar por 15 minutos en total oscuridad para permitir que el profármaco se asiente en los sitios hidrofóbicos de la cápside del BMV y CCMV. Estos resultados pueden consultados en la sección 5.7

3.11.1 Visualización de los virus cargados con profármaco

La visualización de los virus BMV y CCMV marcadas con el profármaco Tamoxifen se realizó por medio del Microscopio confocal Nikon LMS-50 del departamento de microbiología en Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Las condiciones del

microscopio confocal para observar los virus marcadas con Tamoxifen fueron las siguientes: Longitud de onda de excitación 480 nm, y una longitud de onda de emisión de 520 nm utilizando un objetivo de 60x. El objetivo de esta visualización es confirmar el anclaje del profármaco Tamoxifen en la cápside del virus. Los resultados pueden ser consultados en la sección 5.7.

3.12 Internalización de bionanomoteros virales en células cancerígenas

Para conocer las propiedades de internalización de los bionanomoteros virales en células cancerígenas se realizó una prueba de concepto donde se realizó la inserción de virus cargados con Tamoxifen en células de cáncer de mama (MDA 231). La inserción se realizó de la siguiente manera:

- Prueba 1: Se agregaron 33µl de virus funcionalizados con Tamoxifen en 20µl de peróxido de hidrogeno al 50% y 947µl de medio DEM sobre células de cáncer de mama (MDA 231) y se dejó incubar durante 1 hora a 36°C y 5% de CO₂.
- Prueba 2: Se agregaron 33µl de virus funcionalizados con Tamoxifen y recubiertas asimétricamente con platino en 20µl de peróxido de hidrogeno al 50% y 947µl de medio DEM sobre células de cáncer de mama (MDA 231) y se dejó incubar durante 1 hora a 36°C y 5% de CO₂.

3.12.1 Internalización bionanomoteros virales marcados con NanoOrange® en células cancerígenas

Así mismo se realizó el experimento virus recubiertos con Platino y funcionalizadas con NanoOrange® en células de cáncer de mama (MDA-231) para determinar si los virus recubiertas con platino poseían la habilidad de insertarse con mayor éxito dentro de estas células que los virus sin platino. Se utilizó como control 33µl de virus cargados con NanoOrange® y 977µl de medio DEM sobre células de cáncer de mama (MDA-231) y se dejó incubar durante 1 hora a 36°C y 5% de CO₂. Esto con el fin de tener un punto de comparación en condiciones óptimas. Así mismo 3 pruebas que consistían en 33µl de bionanomoteros virales cargados con NanoOrange® con recubrimiento metálico (Pt) asimétrico en 20µl de peróxido de hidrogeno al 1% y 947µl de medio DEM sobre células de cáncer de mama (MDA-231) y se dejó incubar durante 20,40 y 60 minutos a 36°C y 5% de CO₂. Para la visualización de estos virus se utilizó el microscopio Nikon® Eclipse Ti y el software Nis Elements versión 4.4 en los tiempos correspondientes.

Capítulo 4. Técnicas de caracterización

4.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) es una herramienta muy poderosa en la ciencia de materiales, opera con los mismos principios básicos del microscopio de óptico convencional, pero utilizando electrones en lugar de luz. Dado que la longitud de onda de los electrones es mucho menor que la de la luz, la resolución óptima alcanzable para imágenes de TEM es del orden de unos pocos angstroms (10^{-10} m).

El principio de operación del TEM se basa en una "fuente de luz" o cátodo en la parte superior del microscopio que emite los electrones que viajan hacia la parte inferior a través del vacío en la columna del microscopio como se muestra en la figura 19. En lugar de lentes de cristal para enfocar la luz en el microscopio de luz, el TEM usa lentes electromagnéticas para enfocar los electrones en un haz muy fino. El haz de electrones se desplaza a través de la muestra que se desea estudiar. Dependiendo de la densidad del material presente, los electrones pueden ser dispersados, absorbidos o simplemente atravesar la muestra. En la parte inferior del microscopio los electrones dispersados golpean una pantalla fluorescente, lo que da lugar una "imagen de sombra". Las imágenes generadas son monocromáticas y estas están en dos dimensiones.

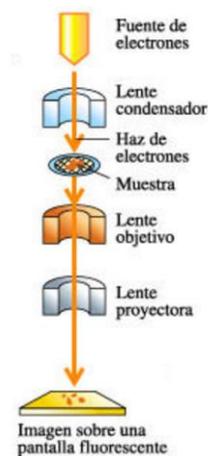


Figura 19. Esquema de microscopio electrónico de transmisión. Imagen tomada de:

<http://es.slideshare.net/el-microscopio-40328119>

4.2 Espectroscopia de energía dispersa (EDX)

Espectroscopia de energía dispersa (EDS o EDX) es una técnica de microanálisis químico donde se detectan los rayos X emitidos desde la muestra durante el bombardeo de un haz de electrones para caracterizar la composición elemental de la muestra a analizar.

Cuando la muestra es bombardeada por haz de electrones (A, figura 20), estos expulsan electrones de capas interiores del átomo, posteriormente los electrones de capas más externas ocupan los lugares vacantes (B, figura 20), y el exceso energético resultante de esta transición se disipa en forma de fotones o mejor conocidos como rayos X (C, figura 20), los cuales poseen una energía característica del elemento del que se emite.

El TEM posee un detector de rayos X, que mide la abundancia relativa de los rayos X emitidos los en comparación con su energía. Cuando un rayos X incidente golpea el detector, se crea un impulso de carga que es proporcional a la energía de los rayos X. El pulso de carga se convierte en un pulso de voltaje (que sigue siendo proporcional a la energía de rayos X) por un preamplificador de carga-sensible. La señal se envía a un analizador multicanal donde los pulsos están ordenados por voltaje. La energía, que fue determina a partir de la medición de voltaje, para cada rayo X incidente es enviada a una computadora para su visualización y evaluación de datos adicionales. Se evalúa el espectro de energía de rayos X contra cuentas para determinar la composición elemental de la muestra observada.

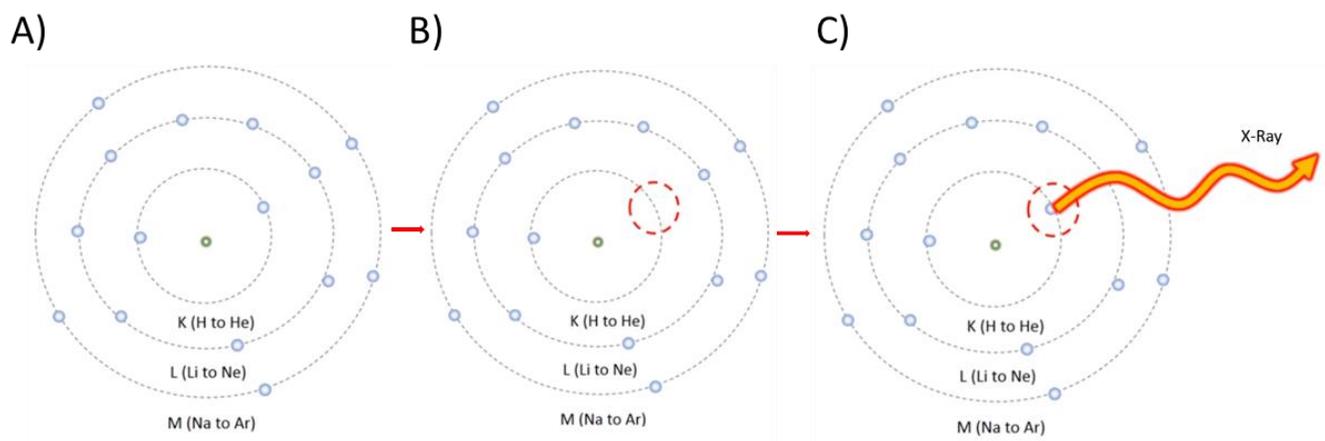


Figura 20. Proceso de generación rayos X en EDX. A) Se hace incidir electrones hacia muestra. B) Vacante generada. C) Liberación de exceso de energía en forma de rayo X. Imagen tomada de:

<http://www.cei.washington.edu/education/science-of-solar/energy-dispersive-x-ray-spectroscopy/>

4.3 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica es una de las técnicas de microscopía más versátil y potente para el estudio de muestras a escala nanométrica. Un microscopio de fuerza atómica puede generar una imagen de la topografía tridimensional a resolución atómica, con escalas a niveles de Angstroms, con un mínimo de preparación de la muestra. También puede ser utilizada para medición propiedades mecánicas de la muestra de una manera controlada, así como también la manipulación atómica y litografía.

La topografía de la superficie en una muestra se realiza mediante el barrido del cantiléver sobre una región de interés como se muestra en figura 21. Se hace incidir un rayo láser sobre el cantiléver, que al seguir los movimientos de la superficie refleja dicho rayo hacia un fotodetector. Un fotodiodo sensible a la posición (PSPD, por sus siglas en inglés) se puede utilizar para realizar un seguimiento de estos cambios. Por lo tanto, si la punta de AFM pasa sobre una superficie característica elevada, la deflexión en el cantiléver resultante (y el posterior cambio de dirección del haz reflejado) se registra por el PSPD. Las características de subida y bajada en la superficie de la muestra influyen en la deflexión del láser sobre el cantiléver, monitoreada por el PSPD. Mediante el uso de un lazo de retroalimentación para controlar la altura de la punta por encima de la superficie manteniendo constante la posición del láser, el AFM puede generar un mapa topográfico exacto de las características de la superficie.

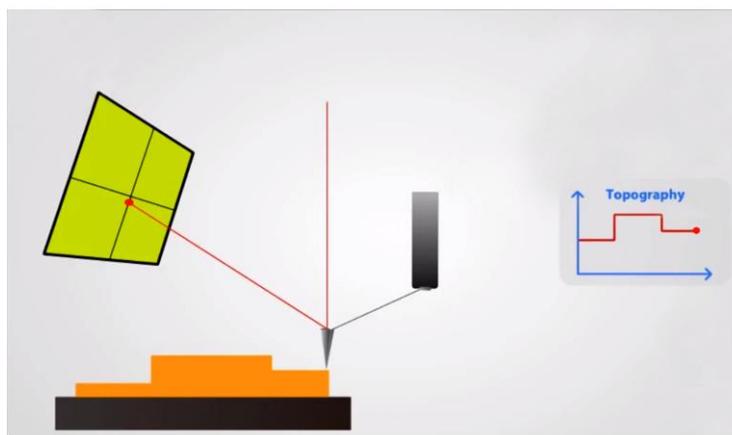


Figura 21. Esquema de método de detección del AFM. Imagen tomada de: <http://www.parkafm.com/index.php/medias/nano-academy/how-afm-works>

4.4 Depósito por erosión iónica o pulverización catódica (Sputtering)

El depósito por pulverización catódica (Sputtering) es una técnica para depositar películas delgadas de algún material sobre una superficie (substrato). Donde se expulsan partículas de un blanco ("target") sólido debido al bombardeo de partículas energéticas, particularmente iones de gas. Esto solo ocurre cuando la energía de las partículas incidentes es mucho más alta que las energías térmicas convencionales ($\gg 1\text{eV}$).

En el proceso de sputtering a menudo se emplean magnetrones que utilizan fuertes campos eléctricos y magnéticos para confinar partículas de plasma cargadas cerca de la superficie del blanco. En un campo magnético, los electrones siguen trayectorias helicoidales alrededor de líneas de campo magnético, sometiéndose a colisiones con un gas inerte que los ioniza cerca de la superficie del blanco. Los electrones libres al chocar con un átomo del gas inerte generan un ion cargado positivamente, el cual se acelera hacia al magnetron con suficiente energía para desprender átomos del blanco (figura 22), los cuales son colectados en la superficie del sustrato a recubrir, formando una película delgada. Cuando un electrón libre se recombina con un ion del gas de proceso, se libera el exceso de energía en forma de luz, el cual es el plasma que se observa.

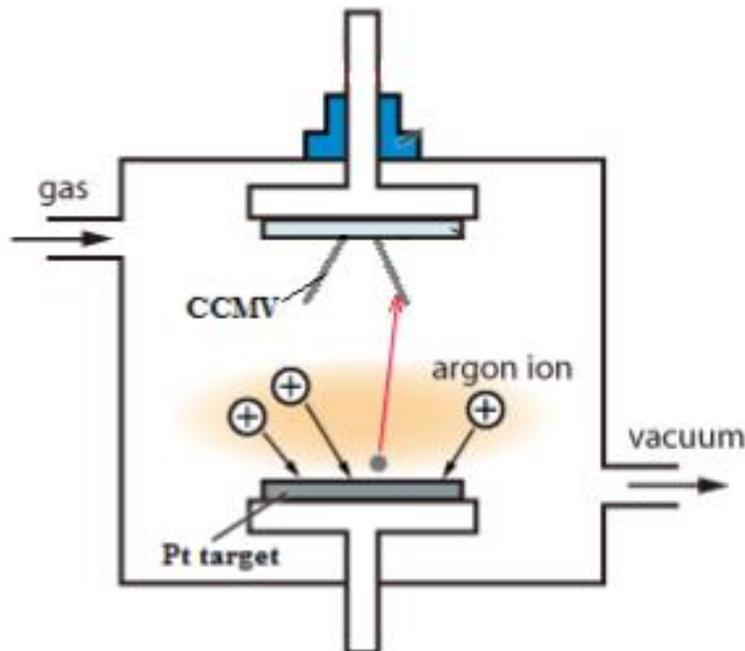


Figura 22. Esquema de proceso de sputtering. Imagen tomada de: <http://en.rigaku-mechatronics.com/case/sputtering-systems.html>

4.5 Microscopia de fluorescencia

La técnica de la microscopía de fluorescencia es una herramienta esencial en la biología y las ciencias biomédicas, se utiliza a menudo para visualizar características específicas de pequeños especímenes tales como lo son los microbios. También se utiliza para mejorar visualmente las características tridimensionales a pequeñas escalas que no serían posibles con la microscopía óptica convencional.

En la mayoría de los casos, la muestra de interés se etiqueta con una molécula fluorescente conocida como fluoróforo. El fluoróforo es excitado con un haz de luz de una determinada longitud de onda que es absorbida y que posteriormente emite luz de longitud de onda de energía más larga. Esta luz fluorescente puede separarse de la radiación circundante con filtros diseñados para esa longitud de onda específica, permitiendo observar sólo aquella que es fluorescente.

Primero, el microscopio tiene un filtro que sólo deja pasar la radiación con la longitud de onda específica que coincide con la excitación del material fluorescente. La radiación choca con electrones que se encuentran en los átomos del espécimen, y los excita a un nivel de energía superior, cuando se relajan a un nivel inferior, liberan el exceso de energía en forma de luz. Para poder detectar la fluorescencia emitida de la muestra se utiliza un segundo filtro que separa la luz de excitación que es más brillante como se muestra en la figura 23. Esto es posible dado que la luz emitida es de menor energía y posee una longitud de onda más grande que la luz utilizada para excitar la muestra.

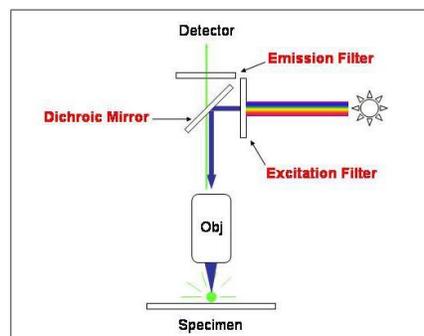


Figura 23. Proceso de microscopía de Fluorescencia. Imagen tomada de:

<http://serc.carleton.edu/microbelife>

4.6 Microscopia confocal

La microscopía confocal ofrece varias ventajas sobre la microscopía óptica de campo ancho convencional, tales como la capacidad de controlar la profundidad de campo, la eliminación o la reducción de la información de fondo lejos del plano focal (lo que produce degradación de la imagen) y la capacidad de analizar secciones ópticas en serie de muestras gruesas. El uso de la microscopia confocal se ha popularizado rápidamente debido en parte a la relativa facilidad con la que se pueden obtener imágenes de muy alta calidad a partir de especímenes preparados para microscopía convencional de fluorescencia y el creciente número de aplicaciones en biología celular.

Un microscopio confocal utiliza la iluminación puntual y un “pin hole” en un plano ópticamente conjugado delante del detector para eliminar la señal fuera de foco.

Sólo se detectará la luz producida por fluorescencia muy cercana al plano focal, la resolución óptica de la imagen, particularmente en la dirección de profundidad de la muestra, es mucho mejor que la de los microscopios de campo ancho. Sin embargo, una gran parte de la luz de la fluorescencia de la muestra es bloqueada en el “pin hole” (figura 24), el aumento de resolución de imagen surge a costa de la disminución de la intensidad de la señal por lo se requieren exposiciones de la muestra a estas intensidades por mayor tiempo. Para compensar la caída de la señal después del “pin hole”, la intensidad de la luz es detectada por un detector sensible, generalmente un tubo fotomultiplicador (PMT, por sus siglas en inglés) o un fotodiodo de avalancha, transformando la señal luminosa en una señal eléctrica que puede ser registrada por una computadora ordenador.

Dado que sólo se ilumina un punto de la muestra a la vez, la obtención de imágenes en 2D o 3D requiere escanear un patrón rectangular de líneas de exploración paralelas en la muestra. El haz se escanea a través de la muestra en el plano horizontal usando uno o más espejos oscilantes (servo controlados). Este método de exploración suele tener una latencia de reacción baja y la velocidad de exploración puede variar. Los escaneos más lentos proporcionan una mejor relación señal-ruido, lo que da como resultado un mejor contraste y una mayor resolución.

El grosor alcanzable del plano focal se define principalmente por la longitud de onda de la luz usada dividida por la apertura numérica de la lente objetivo, pero también por las propiedades ópticas de la muestra. La sección óptica fina hace que estos tipos de microscopios sean particularmente buenos en la formación de imágenes en 3D y en el perfilado superficial de las muestras.

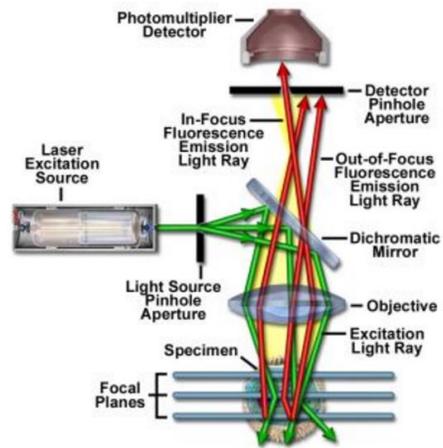


Figura 24. Microscopia confocal. Imagen tomada de: <https://www.biology4.wustl.edu/>

Capítulo 5. Resultados y discusión

5.1 Pruebas de fluorescencia

Una vez realizada la metodología de inserción de fluoróforo NanoOrange discutida en la sección 3.4, se hizo una prueba rápida de visualización de los virus marcadas con NanoOrange. Después de la incubación, se colocaron virus marcadas fluorescentemente y el marcador solo en dos viales separados, los cuales se colocaron sobre una plancha de luz UV para comprobar rápidamente la inserción de NanoOrange®. En la figura 25 se puede apreciar como los virus marcados poseen un brillo intenso de color naranja mientras que en la solución de NanoOrange® sola no presenta fluorescencia. Esto es debido a que NanoOrange® por si solo es no fluorescente, sin embargo, una vez que ha interactuado con las proteínas y los sitios hidrofóbicos del virus, adquiere un alto índice de fluorescencia, es por esto que no es posible observarlo en una solución sin proteínas (Data sheet NanoOrange®, <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp06666.pdf>)

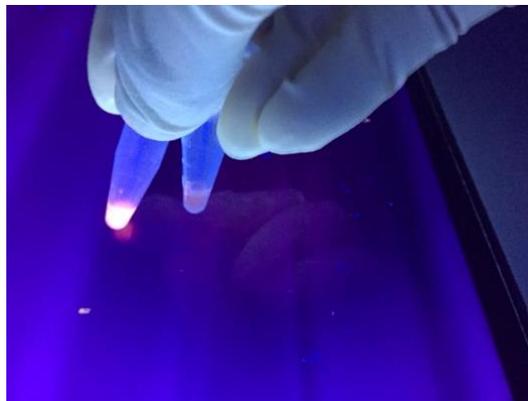


Figura 25. Comparación de intensidad de luz en virus marcados fluorescentemente (izquierda) y solución sin virus (derecha).

Posteriormente se observaron los virus de CCMV marcadas con NanoOrange® en el microscopio Nikon® Eclipse Ti y el software Nis Elements versión 4.4, tiempo de exposición de 250 mseg, utilizando un objetivo de 20x y filtro de luz azul B-2A de la marca Nikon®.

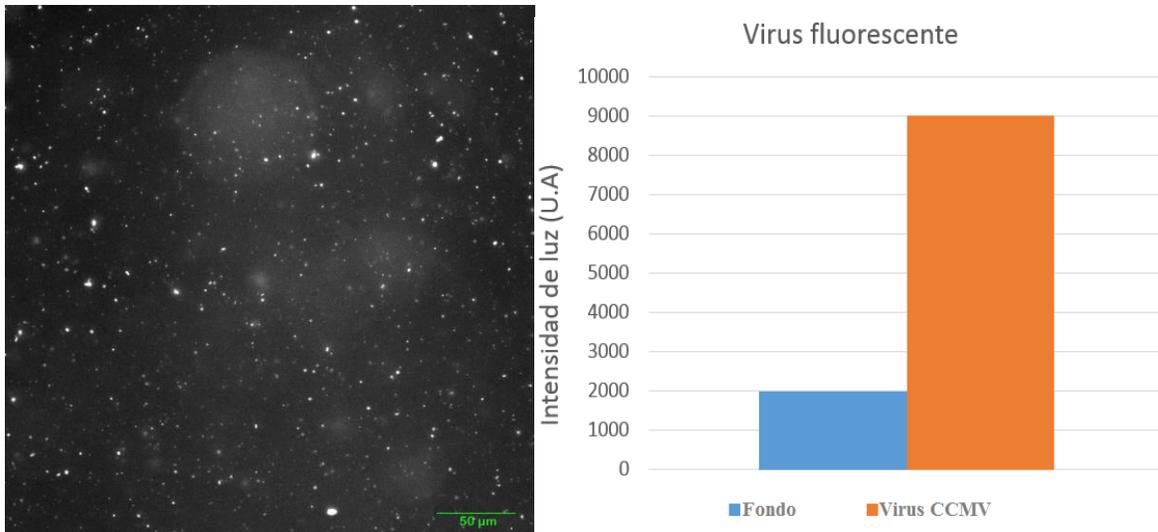


Figura 26. Visualización por microscopía óptica de fluorescencia de virus de CCMV marcados fluorescentemente (izquierda) y cuantificación de intensidad de luz del fondo con respecto a los virus CCMV marcados fluorescentemente (derecha). Objetivo 20x, filtro azul B-2A (Excitación en 490 nm y Emisión en 516 nm), escala 50 μ m.

En la figura 26 se observa una alta concentración de virus marcados fluorescentemente donde las partículas de mayor tamaño son aglomerados de virus, mientras que las partículas más pequeñas pueden ser un virus individual marcado fluorescentemente. La medición de la intensidad se encuentra en unidades arbitrarias, donde se aprecia fácilmente una intensidad en los virus marcados casi 5 veces mayor (9000 cuentas) con respecto al fondo, confirmando que de esta manera será posible ubicar o analizar el movimiento de los virus marcados fluorescentemente.

5.2 Prueba de liberación de marcador fluorescente en virus

Debido a su propiedad de expansión, contracción y estructura hueca de los virus las hace un promisorio candidato como acarreadores de cargamento y fármacos. Al tener las virus previamente cargadas del marcador fluorescente NanoOrange[®], se realizó una prueba de liberación donde el componente a liberar era el mismo marcador fluorescente NanoOrange[®], utilizando como control los virus en condiciones estables pH 6 y en condiciones de liberación pH 8.

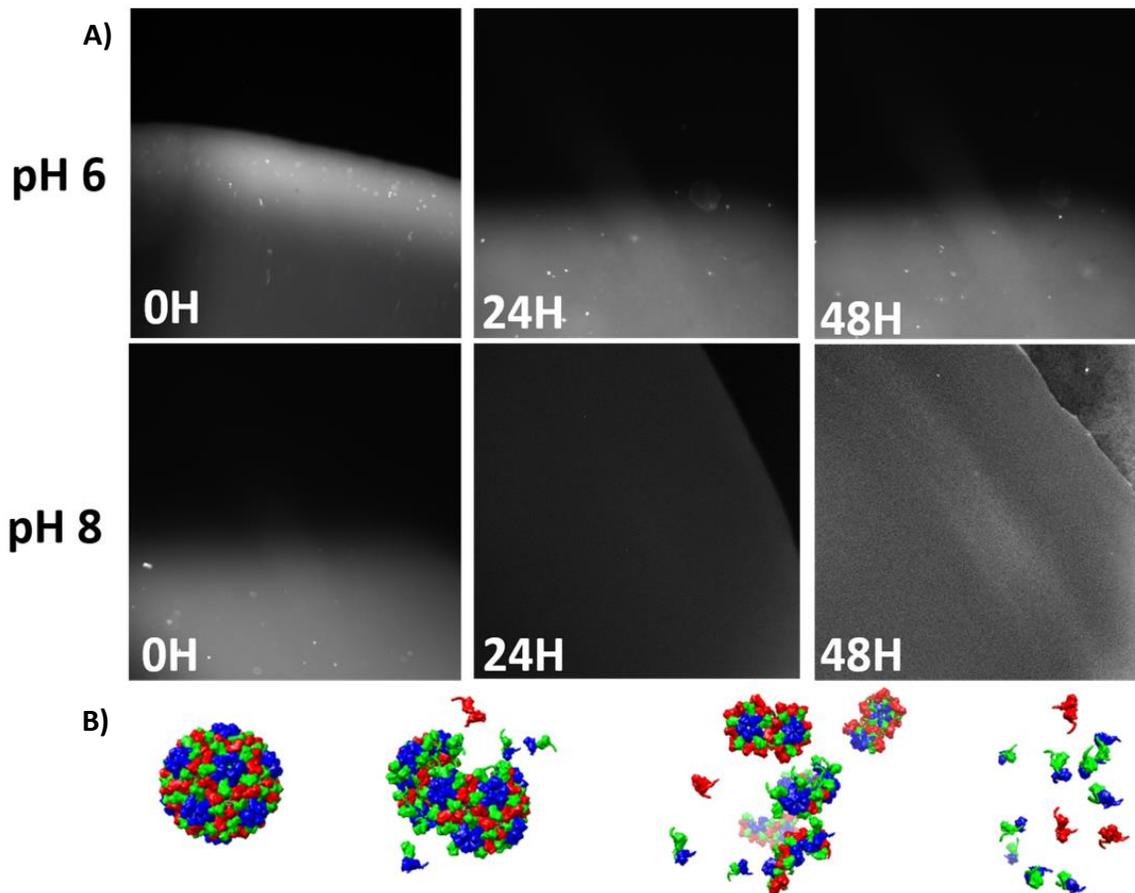


Figura 27. Liberación de moléculas en virus de CCMV. A) Liberación de marcador fluorescente con respecto al pH y el tiempo. B) Esquema de liberación.

Las imágenes en la figura 27 en inciso A), nos muestran a los virus con tiempos de incubación de 0 a 48 horas, en pH 6 y pH 8, en el borde de la gota (muestra) en un pH 6 (ácido) se puede observar puntos brillantes, indicativo de que la cápside conserva su estado base típico del marcador fluorescente, pero al incrementar el pH a 8, la cápside viral se empieza a dividir en subunidades, hasta una desintegración total liberando lo que está en su interior, como se muestra en el inciso B). Al realizar un cambio de pH en el medio en el que se encuentran los virus, pasando de un pH ácido a uno básico, los enlaces de hidrógeno que existen entre los grupos carboxilos adyacentes en las cápsides virales se rompen, al ionizarse y repelerse entre sí. Las intensidades del fondo cambian de 2000 U.A (unidades arbitrarias) (pH 6) a 460 U.A (pH 8) indicando una posible disminución de fluorescencia en el medio en torno al desensamble de los virus.

5.3 Recubrimientos metálicos de platino

El realizar distintas pruebas de recubrimientos metálicos de platino fue con la finalidad de caracterizar los espesores obtenidos para encontrar las condiciones necesarias que nos generen un espesor de película lo suficientemente delgado ($\sim 2-5$ nm) y homogéneo que nos permita posteriormente recubrir los virus sin saturarlas.

Los primeros depósitos metálicos fueron realizados en los laboratorios NANO3 de la Universidad de California en San Diego (UCSD), utilizando la cámara de depósito de sputtering Denton Discovery 18 , un blanco circular de platino de 3 pulgadas de diámetro, 8 cm^3 de Argón, y una intensidad de plasma de 75 Watts por un periodo de 5 segundos. Posteriormente los depósitos fueron caracterizados en la Unidad de Nanocaracterización del Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNyN), UNAM por medio del microscopio de fuerza atómica (AFM) modelo Park System modelo XE-70, por el método de no contacto, utilizando una punta de silicio que realiza un barrido sobre una área de $40 \mu\text{m} \times 40 \mu\text{m}$ (figura 28).

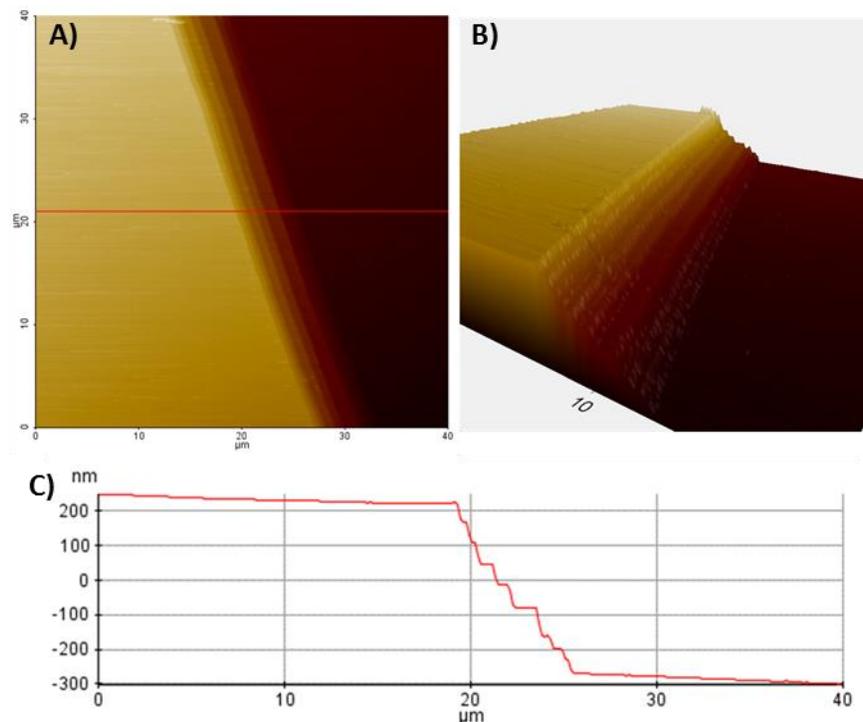


Figura 28. Análisis topográfico de depósitos de platino sobre superficies de silicio. A) Visualización en 2D de parte superior de depósito metálico. B) Visualización en 3D de depósito metálico. C) Histograma de amplitud de recubrimiento metálico.

En este primer depósito metálico se observa un recubrimiento de aproximadamente 450 nm, lo cual es ineficiente al momento de recubrir los virus, dado que un depósito de este espesor haría imposible recuperar la partícula de 30 nm, esto debido a que el recubrimiento metálico cubriría completamente las partículas.

Existen distintas complicaciones al utilizar los parámetros de depósito antes mencionados, como: La tasa de depósito en estas condiciones es de 90 nm/seg lo cual que genera recubrimientos gruesos e ineficientes para nuestro propósito, el control de tiempos de exposición de depósitos metálicos menores a 1 segundo es muy complicado en este equipo (sin embargo existen equipos como el de ablación láser y sputtering pulsado con el que se puede controlar pulsos del orden de nanosegundos pero utilizan altas temperaturas que pueden degradar la cápside viral), así mismo el acceso al equipo de depósito de sputtering Denton Discovery 18 es costoso.

Para poder tener un mejor control y rápida caracterización de los recubrimientos de platino sobre los virus, se realizaron una serie de pruebas descritas en la sección 3.7 en el CNYN por medio de la cámara de sputtering del laboratorio de espectroscopias de superficies que se muestra en la figura 14. Se redujo la potencia y flujo con el fin de reducir las tasas de depósito y poder obtener un tiempo de exposición a los depósitos metálicos más controlables; utilizando un depósito de 60 segundos, 3 cm³ de Argón y una intensidad de plasma a 10 Watts, se logró obtener un recubrimiento de aproximadamente 2.5 nm, uniforme y homogéneo con una tasa de depósito de 0.42 angstroms/seg o 0.042 nm/seg (figura 29). En esta figura se muestra únicamente la prueba de 60 segundos de depósito a Pt a 10 Watts de intensidad en plasma de la sección 3.7, esto debido a que en las demás pruebas no se obtuvo resultado alguno al realizar las mediciones por AFM, esto debido a que estas pruebas generaban a tasas de depósito muy grandes en base a sus condiciones de intensidad de plasma y tiempo de exposición. En la figura 29 se muestra un barrido por AFM de una sección de 10 μm x 10 μm, donde en el inciso A) y B) la sección oscura es aquella que no fue expuesta al depósito metálico mientras que la sección clara fue expuesta totalmente al depósito de platino debido al acomodo en de la muestra (silicio) como se muestra en la figura 14 en la sección 3.7, se utilizó este acomodo debido a que se buscaba obtener un perfil donde se pudiera medir el espesor del recubrimiento de platino.

En el inciso B) de la figura 29 se observa una uniformidad y homogeneidad plana en el recubrimiento metálico que no está presente en el inciso B) de la figura 28, mientras que en el inciso C) de la figura 29 se muestra el histograma de amplitud del depósito metálico el cual nos indica que este depósito tiene un grosor aproximado de 2.5 nm el cual se utiliza más adelante para recubrir los virus ya que se considera un grosor óptimo para que éstas retengan su funcionalidad y puedan moverse con el recubrimiento metálico.

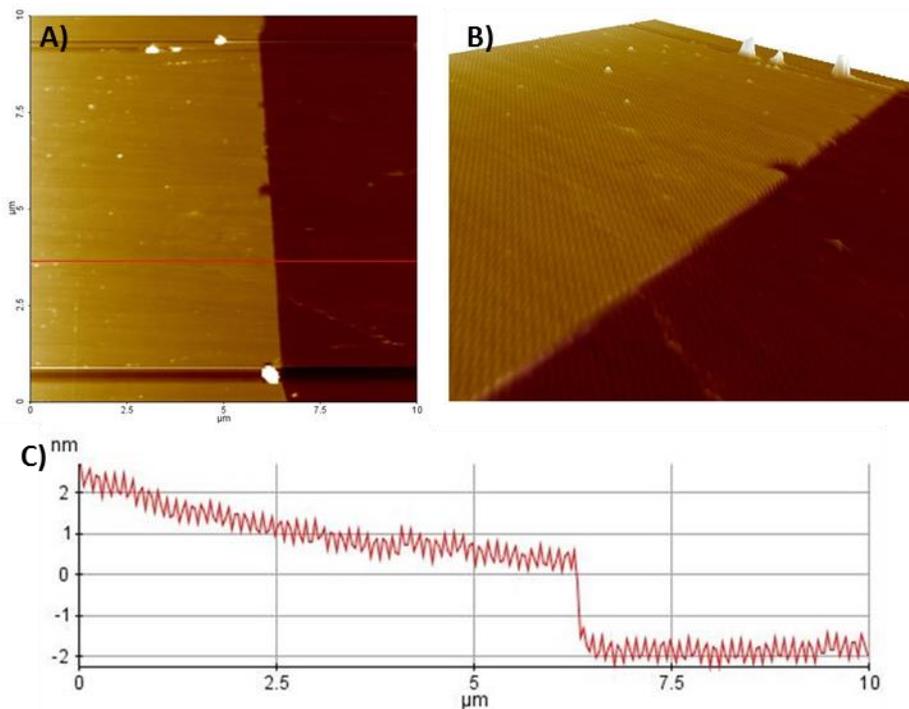


Figura 29. Análisis topográfico de último depósito de platino sobre superficies de silicio. A) Visualización en 2D de parte superior de depósito metálico. B) Visualización en 3D de depósito metálico. C) Histograma de amplitud de recubrimiento metálico.

5.4 Caracterización TEM de virus recubiertos con platino

Ya obtenidos los parámetros necesarios para recubrir una capa delgada de platino (~2nm), se prosiguió a recubrir los virus utilizando el procedimiento de la sección 3.8, y se caracterizó por TEM obteniéndose los siguientes resultados.

Se comenzó por la caracterización por microscopía TEM para obtener una imagen más detallada de los virus con y sin recubrimiento de platino; dado su tamaño nanométrico, no es posible obtener imágenes de alta resolución por otras técnicas. Para observar los virus sin recubrimiento metálico por medio de microscopía electrónica de transmisión, fue necesario teñirlas con acetato de uranilo, esto debido a que el uranilo se adhiere a las proteínas de la cápside viral cubriéndolas homogéneamente sin degradarlas (Minten, Hendriks, Nolte, & Cornelissen, 2009) y al ser un metal pesado dispersa fácilmente los electrones, otorgándonos una imagen de los virus. Con esta técnica de tinción, fue posible observar la morfología icosaédrica casi esférica propia de estas partículas, su tamaño y definir que estas partículas pueden estar separadas (figura 30, inciso A)). De igual manera, se realizó el análisis de virus recubiertas con platino, las cuales fueron recubiertas con platino asimétricamente agregando un ángulo de 65° con respecto a la normal por la técnica de pulverización catódica (sputtering), y con un espesor aproximado de 2.5 nanómetros.

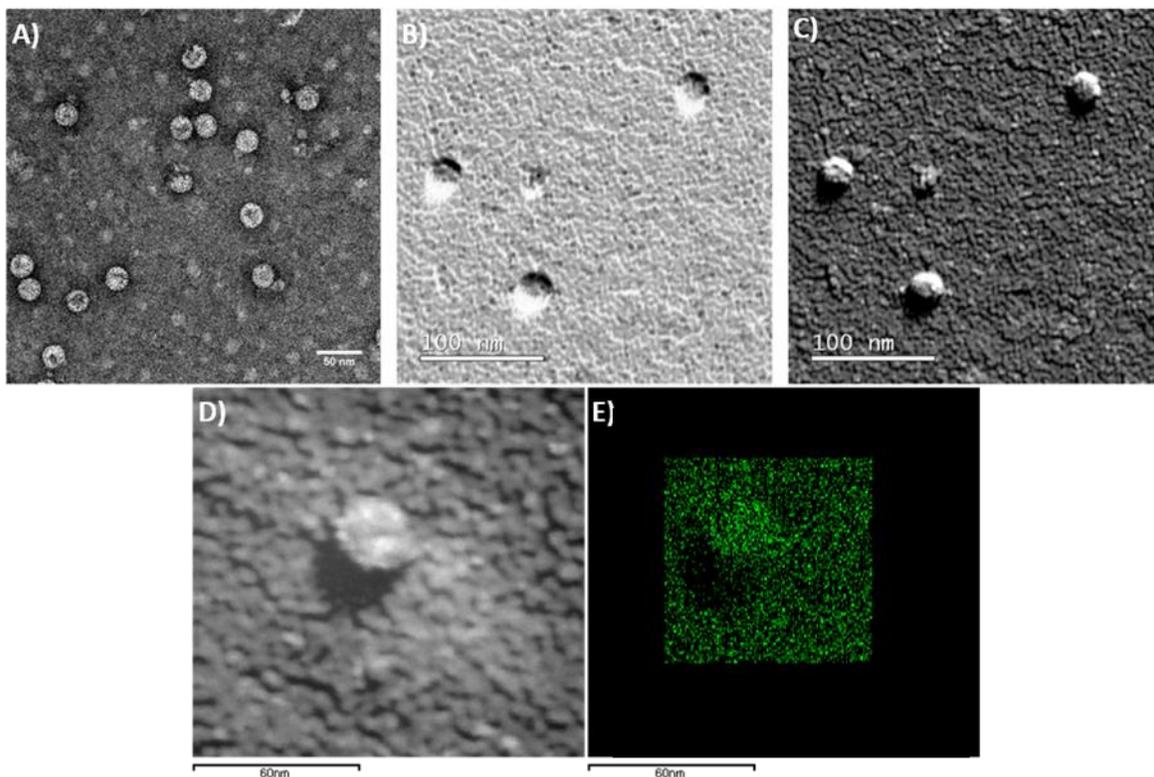


Figura 30. Análisis de microscopía electrónica de transmisión del virus CCMV y bionanomotores virales a base de CCMV. A) Virus de CCMV marcadas con acetato de uralino (control). B) Imagen en 2D de virus CCMV recubiertos con platino. C) Imagen en 3D de los virus recubiertas con platino. D) Acercamiento en 3D a un virus recubierto con platino. E) Análisis de EDX del virus CCMV recubierto con platino.

En la figura 30 inciso B) se puede observar la imagen en 2D de los virus recubiertos con platino en la modalidad campo claro y en la imagen C) se observa la misma sección en 3D en la modalidad campo oscuro otorgándonos una mejor apreciación de los virus recubiertas. En el inciso B) y C) se observa una especie de sombra detrás de cada una de los virus , esta sombra corresponde a una sección donde existe menor densidad de átomos de platino, esto es debido al depósito metálico es realizado en ángulo (65°) con respecto a la normal, por lo que el flujo del material no incide en tal sección, creando el efecto “sombra” (Ogata, Tuan, Takase, & Mizutani, 2010) otorgándonos un recubrimiento asimétrico. Posteriormente para confirmar dicho recubrimiento asimétrico, se realizaron estudios de espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDX, por sus siglas en inglés) para analizar la composición química del recubrimiento, en la cual se corrobora una densidad mucho menor de átomos de platino en la parte posterior de los virus que corresponde a la región de sombra que se observa en la imagen en 3D, esto quiere decir que al estar en ángulo con respecto a la normal fomenta un interacción preferencial de un lado de los virus, lo que nos genera un recubrimiento asimétrico.

Así mismo, se realizó la caracterización por medio de TEM a virus del Mosaico del Bromo (BMV, por sus siglas en ingles), al cual se dio un recubrimiento metálico asimétrico con las mismas condiciones que el virus CCMV, esto con el fin de comprobar que las propiedades de recubrimiento asimétrico no eran únicas de los virus de CCMV, lo cual nos otorgaría el conocimiento de crear nuevos nanomotores en distintas partículas a escalas nanométricas.

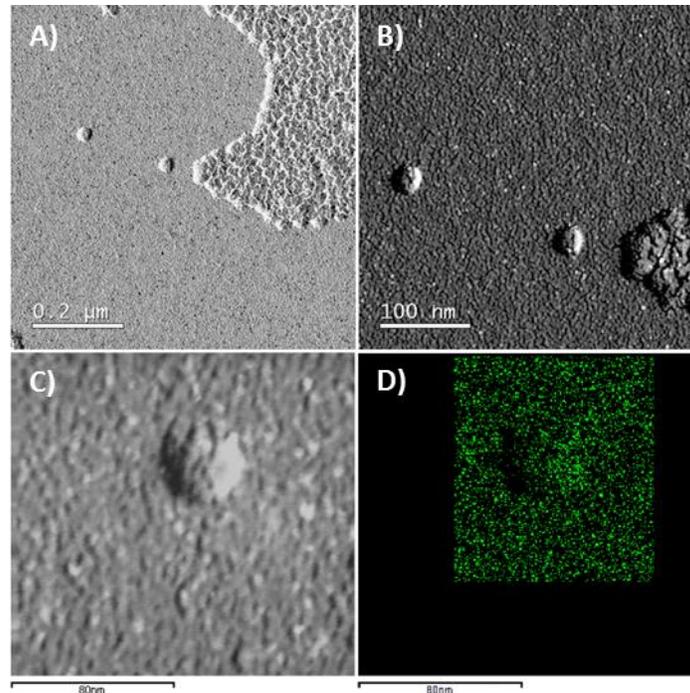


Figura 31. Análisis de microscopía electrónica de transmisión de BMV con y sin recubrimiento de platino. A) Imagen de BMV recubiertas con platino y un agregado de virus recubiertos con platino. B) Acercamiento en 3D de virus de BMV recubiertas con platino. C) Acercamiento en 3D a un virus de BMV recubierto con platino. D) Análisis de EDX sobre C).

En la imagen A) y B) de la Figura 31 se aprecia la misma sombra detrás de cada virus de BMV que en los virus de CCMV, debido al depósito metálico en ángulo que ha generado un recubrimiento asimétrico. Posteriormente se confirmó dicho recubrimiento asimétrico, con EDX, observando una densidad menor de átomos de platino en la parte posterior del BMV, lo que representa la obtención de un recubrimiento asimétrico; al igual que CCMV esto es debido a que los depósitos fueron realizados con un ángulo de 65° con respecto a la normal de depósito, lo cual otorga preferencia de depósito a una zona en particular de la cápside del virus. Sin embargo, en comparación a CCMV, el virus BMV presenta una mayor densidad de átomos de Pt en su parte posterior lo cual indica que estas partículas están mayormente recubiertas. Esto debido posiblemente a que los átomos de platino al ser depositados sientan mayor atracción a la superficie positivamente cargada de los virus de BMV en comparación con la carga superficial negativa de los virus de CCMV, es necesario realizar nuevos experimentos que permitan corroborar esta afirmación.

5.6 Visualización y movimiento de bionanmotores virales

Los bionanmotores virales fueron visualizados por medio de microscopía de fluorescencia para caracterizar su dinámica. Utilizando virus de CCMV marcadas fluorescentemente y al ser excitadas en una longitud de onda cercana a los 470 nm, comienza a emitir luz en por encima de 570nm. Los virus al tener un recubrimiento metálico asimétrico permite el paso de la luz hacia el exterior a través de la sección no recubierta, permitiéndonos observar dichas partículas como se muestra en la figura 32. Las partículas de mayor densidad son aglomerados de virus, mientras que las partículas más pequeñas pueden ser un virus individual marcada fluorescentemente o un grupo muy pequeño de virus. Estas partículas poseen una intensidad promedio de 9000 U.A al igual que los virus no recubiertos, mientras que el fondo posee una intensidad de 2000 U.A.

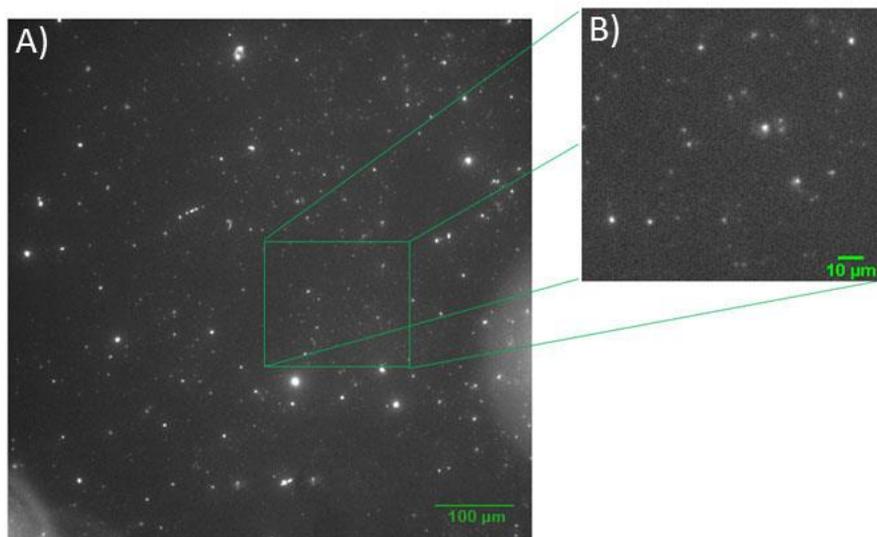


Figura 32. Virus de CCMV recubiertos con platino. A) Virus de CCMV marcadas fluorescentemente y con recubrimiento metálico asimétrico, escala 50 µm. B) Acercamiento a una sección de A) mostrando los virus recubiertos y marcadas de mucho menor tamaño, muy posiblemente virus individuales, escala 10 µm.

5.6.1 Propulsión de virus de CCMV recubiertas de platino (bionanmotores de CCMV)

Posteriormente se realizaron experimentos con respecto al movimiento del virus CCMV recubiertos asimétricamente con platino, embebiéndolas en distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno, con el objetivo de estudiar su comportamiento y variación de velocidades.

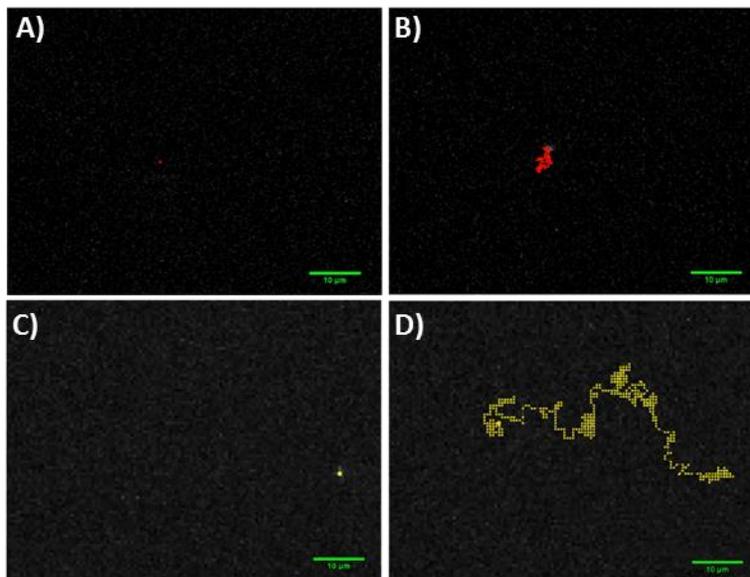


Figura 33. Comparación de movimiento en bionanomotores de CCMV. A) Posición inicial de bionanomotor libre de H_2O_2 . B) Posición final de bionanomotor libre de H_2O_2 , velocidad promedio $0.97\mu\text{m/s}$. C) Posición inicial de bionanomotor embebido en H_2O_2 . D) Posición final de bionanomotor embebido en H_2O_2 , velocidad promedio $3.91\mu\text{m/s}$.

En la figura 33, se muestra la dinámica del nanomotor en ausencia y presencia de peróxido de hidrógeno, en el inciso A) se muestra el bionanomotor embebido agua al principio del experimento (0 segundos) mientras que en el inciso B) se muestra la trayectoria del bionanomotor embebido en agua después de 60 segundos donde el movimiento que se genera es debido a al choque de partículas en el medio o movimiento browniano, por lo cual otorga un movimiento muy cerrado y corto, recorriendo una distancia aproximada de $3.7\mu\text{m}$ en una trayectoria aleatoria. En el inciso C) se muestra el bionanomotor embebido H_2O_2 al principio del experimento (0 segundos), mientras que en el inciso D) se muestra la trayectoria del bionanomotor embebido H_2O_2 después de 60 segundos de exposición, donde el platino comienza a funcionar como un catalizador, reduciendo la energía de activación sobre el H_2O_2 , descomponiéndolo según la siguiente ecuación: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$, donde el O_2 genera las burbujas del lado recubierto con platino del bionanomotor lo que resulta en la propulsión del motor en dirección opuesta a las burbujas y al catalizador generando el movimiento irregular característico de los motores a base de combustibles, una velocidad de $3.91\mu\text{m/s}$ y una fuerza de arrastre de 1.03 pN (dicha fuerza de arrastre está determinada por la fórmula $F = 6\pi\mu a v$, donde μ es la viscosidad del agua, a es el radio de la esfera, y v es la velocidad del nanomotor) (Gibbs & Zhao, 2009). Para experimento del bionanomotor de la imagen 32, inciso C) y D) se utilizó una concentración de H_2O_2 al 1% en solución, recorriendo una distancia de 73.90

μm , una distancia 19.97 veces mayor que el movimiento generado por el choque de partículas en el medio (movimiento browniano).

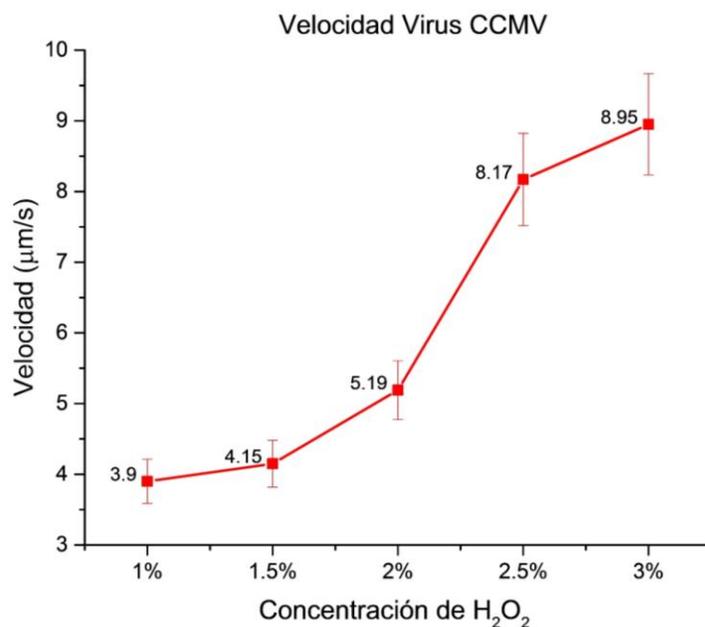


Figura 34. Análisis de velocidad de bio-nanomotores de CCMV con respecto a distintas concentraciones de H₂O₂.

En la figura 34 podemos observar el análisis de velocidades con respecto a distintas concentraciones de H₂O₂, el cual fue llevado desde 1% hasta 3% de H₂O₂, donde se observa un incremento lineal en la velocidad de los bionanomotores virales al incrementar de la concentración de H₂O₂, obteniendo una velocidad mínima promedio de 3.9 $\mu\text{m/s}$ y una velocidad máxima promedio de 8.95 $\mu\text{m/s}$, este incremento de velocidad ocurre debido a que al tener una mayor concentración de combustible en el medio, el catalizador (Pt) sobre nuestro virus genera una mayor cantidad de burbujas otorgando una mayor propulsión. El incremento de la concentración de H₂O₂ se llevó hasta 3% dado que sobre este valor es muy difícil seguir el rastro a los bionanomotores virales debido a la gran cantidad de burbujas generadas en el medio.

5.6.2 Propulsión de BMV recubiertas de platino (bionanmotores virales de BMV)

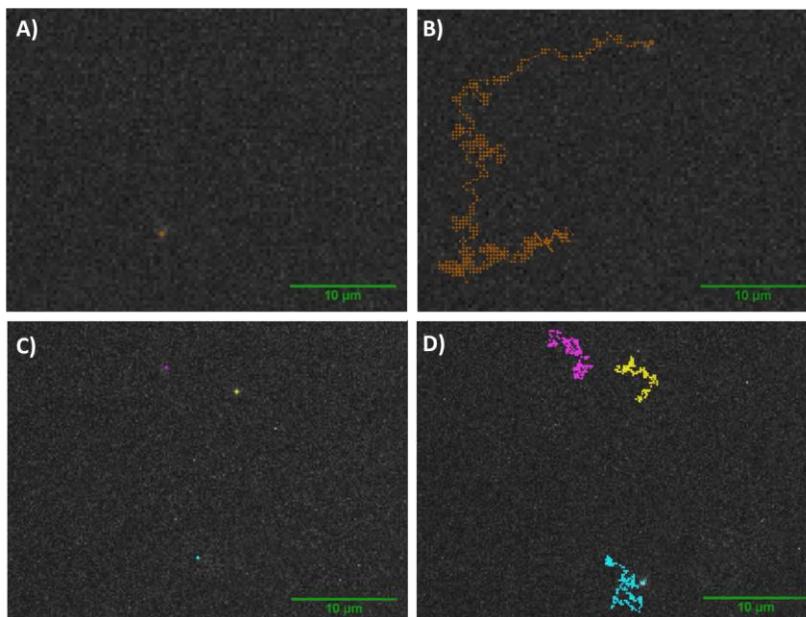


Figura 35. Movimiento de bionanmotores de BMV. A) Posición inicial de bionanomotor embebido en H_2O_2 . B) Posición final de bionanomotor embebido en H_2O_2 , velocidad promedio $8.02 \mu\text{m/s}$. C) Posición inicial de bionanomotors embebido en H_2O_2 . D) Posición final de bionanomotor embebido en H_2O_2 , velocidad promedio amarillo $9.02 \mu\text{m/s}$, velocidad promedio azul $8.42 \mu\text{m/s}$, velocidad promedio morado $8.96 \mu\text{m/s}$.

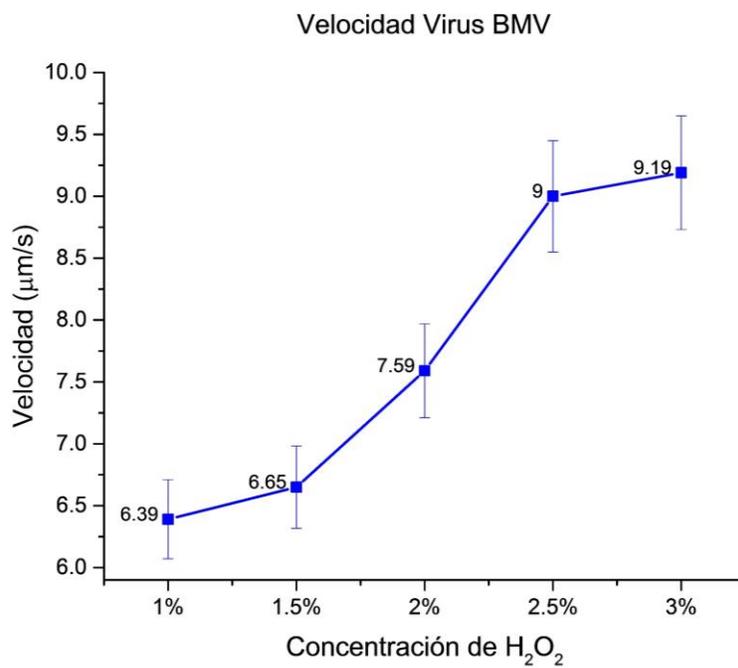


Figura 36. Analisis de velocidad de bio-nanmotores de BMV con respecto a distintas concentraciones de H_2O_2 .

Es posible crear un bionanomotor a partir de otra cápside viral como la BMV, en la figura 35 se observa la dinámica de este bionanomotor viral BMV en presencia de 2% de peróxido de hidrógeno donde en A) observamos la posición inicial del bionanomotor viral BMV y en la imagen B) la posición final del bionanomotor, recorriendo una distancia de 107.89 μm a una velocidad máxima de 8.02 $\mu\text{m/s}$ y una fuerza de arrastre de 2.12 pN, así mismo en C) se observa la posición inicial de múltiples bionanmotores de BMV y en D) bionanmotores virales BMV moviéndose al mismo tiempo y de manera independiente al estar embebidos en una concentración de 2.5% de peróxido de hidrogeno, obteniendo velocidades de 9.02 $\mu\text{m/s}$ (amarillo), 8.42 $\mu\text{m/s}$ (azul), y 8.96 $\mu\text{m/s}$ (morado), recorriendo una distancia de 23.89 μm , 40.36 μm , y 30.75 μm y una fuerza de arrastre de 2.28 pN, 2.22 pN, y 2.36 pN respectivamente, todos los recorridos de los bionanmotores fueron en una trayectoria aleatoria.

En la figura 36 se observa un incremento lineal en la velocidad los bionanmotores virales BMV al aumentar la concentración de H_2O_2 al igual que con bionanmotores virales a base del CCMV, sin embargo, las velocidades de los bionanmotores virales BMV son mayores (hasta 63%) con respecto a CCMV, esto posiblemente al incremento en el recubrimiento de platino sobre el virus de BMV como se mencionó en la sección 5.4. Al tener mayor recubrimiento, se tiene mayor concentración de catalizador que fomenta una mayor descomposición de H_2O_2 generando una mayor liberación de burbujas de O_2 y por ende una mayor velocidad del bionanomotor. Cabe recalcar que la velocidad promedio de los bionanmotores sin la presencia de combustible es de 0.97 $\mu\text{m/s}$ mientras que en presencia de combustible la velocidad máxima promedio es de 9.19 $\mu\text{m/s}$ lo que representa un incremento de 9.5 veces en su velocidad estándar.

5.7 CCMV para transporte de fármacos

Con la finalidad de identificar si el virus CCMV podría servir como acarreador de fármacos, se procedió a realizar una prueba de inserción del profármaco anticariógeno Tamoxifen.

Una vez realizada la metodología de inserción de profármacos en virus de CCMV de la sección 3.11, se procedió a la visualización de los virus marcados con el profármaco Tamoxifen, utilizando el microscopio confocal modelo LMS-50, el cual nos permite aumentar el contraste, eliminar luz

desenfocada, enfocar en un solo plano y el uso de fluorescencia, con el propósito de una visualización óptima de los virus marcados con el profármaco Tamoxifen.

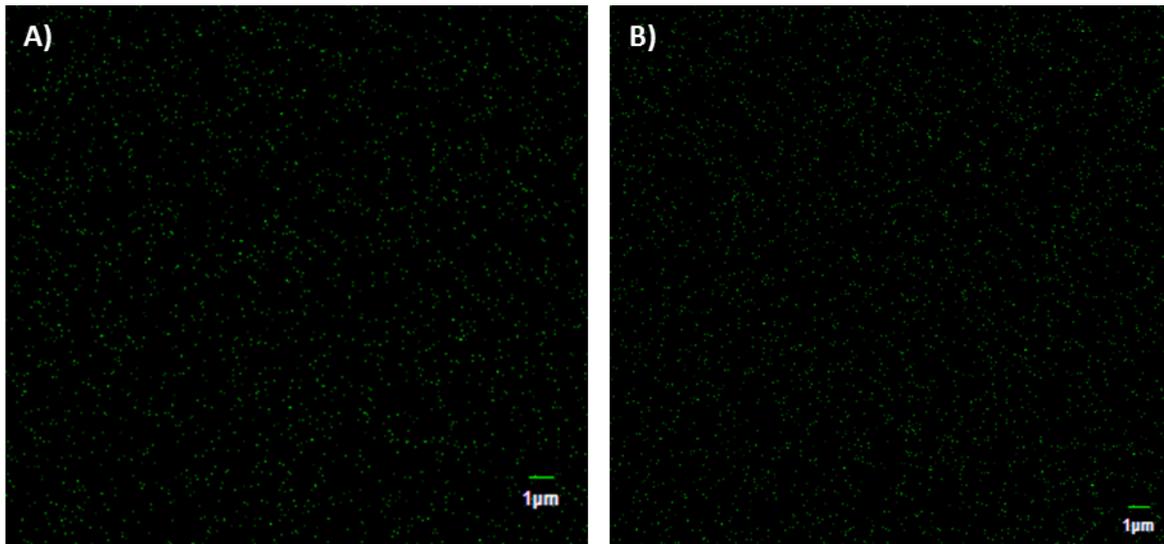


Figura 37. CCMV marcados con Tamoxifen. A) Virus CCMV cargados con Tamoxifen. B) Virus CCMV recubiertas con platino asimétricamente y cargados con Tamoxifen.

En la figura 37, podemos observar pequeños puntos verdes, los cuales son generados debido a la fluorescencia emitida por el profármaco anticancerígeno Tamoxifen que se encuentra dentro de las virus de CCMV. En el inciso A) se muestran virus de CCMV marcadas con Tamoxifen mientras que en el inciso B) se muestran los virus recubiertas con platino asimétricamente, y en ambas imágenes es posible visualizar la fluorescencia emitida por el profármaco. Se utilizó un objetivo de 60x para obtener una mayor resolución, lo cual permite fácilmente apreciar los pequeños resplandores emitidos por el virus marcado por el Tamoxifen. En este caso lo que se observa es la fluorescencia emitida por el profármaco, dado que el Tamoxifen por sí mismo es fluorescente al ser excitado en una longitud de onda de 480 nm; emite en 580 nm. Este profármaco al ser altamente hidrofóbico tiene preferencia a acoplarse a los sitios hidrofóbicos que se encuentran dentro de la cápside viral, esto ocurre de manera aleatoria al estar embebidos en la misma solución.

Una vez insertado el profármaco, los virus de CCMV pueden ser utilizadas como acarreadores, dado que el profármaco se encuentra dentro de las proteínas que forman el virus, con lo cual podría transportarse de forma dirigida.

5.8 Virus en células de cáncer de mama

La constante evolución de los tratamientos médicos nos impulsan a mejorar la manera en la que los fármacos son suministrados, desarrollando micro/nanomotores capaces de retener y liberar algún medicamento, esto con la visión de que en un futuro seamos capaces de entregar un fármaco selectivamente a tejidos y células con una eficacia incrementada, y a su vez reducir los efectos secundarios. En la actualidad ya se han utilizado micro/nanomotores para el transporte de fármacos, tal es el caso de los micro/nanomotores magnéticos (Gao et al., 2012), micro/nanomotores catalíticos (Mou et al., 2014), incluso ya se ha pensado en utilizar virus para el tratamiento de enfermedades insertando agentes terapéuticos (Ma et al., 2012) pero ninguno con la propiedad de ser un bionanomotor.

Con el propósito de conocer si los bionanmotores podrían ser utilizados como transportadores de fármacos e insertarse dentro de células cancerígenas, y siguiendo el protocolo de la sección 3.12 se realizó la inserción de virus de CCMV recubiertas con platino y sin recubrir a células de cáncer de mama, caso particular de la MDA-231.

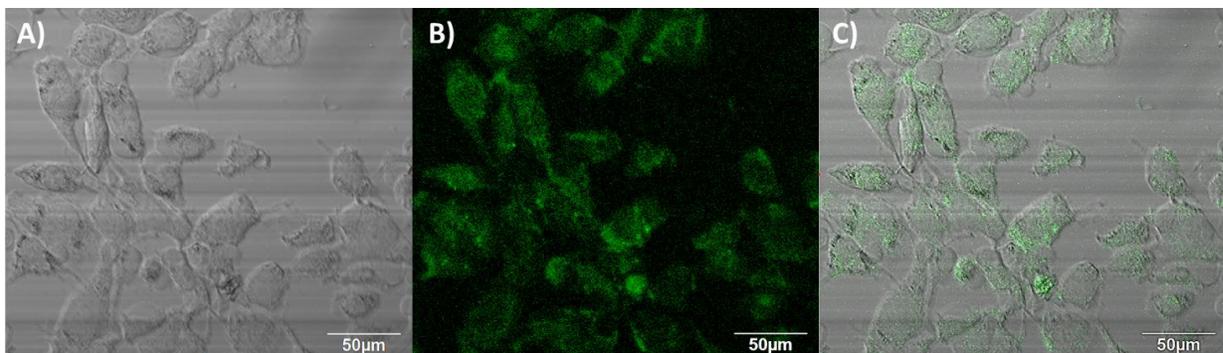


Figura 38. Internalización de virus de CCMV cargadas con Tamoxifen en células de cáncer de mama MDA-231.

A) Células MDA-231 con virus de CCMV cargadas con Tamoxifen bajo luz visible. B) Células MDA-231 con virus de CCMV cargadas con Tamoxifen interactuando con una longitud de onda de 480 nm, emitiendo en 520 nm. C) Superposición de imágenes A) y B).

En la figura 38 en el inciso A) se muestran las células cancerígenas MDA-231 con virus de CCMV cargadas con Tamoxifen bajo luz visible, donde no es posible apreciar los virus dado que al excitar con todas las longitudes de onda en el rango de lo visible la emisión de fluorescencia del Tamoxifen es opacada, mientras en el inciso B) se muestran las mismas células MDA-231 con virus de CCMV

cargadas con Tamoxifen, que al ser excitadas en una longitud de onda de 480 nm comienzan a emitir fluorescencia (520 nm), y es posible observar que los virus de CCMV poseen la propiedad de internalizarse por sí solas en la membrana celular de células animales (Azizgolshani et al., 2013), esto muy probablemente debido a su tamaño tan pequeño y el tiempo en contacto con las células (1 hr). En el inciso C) se observa el empalme de las imágenes A) y B).

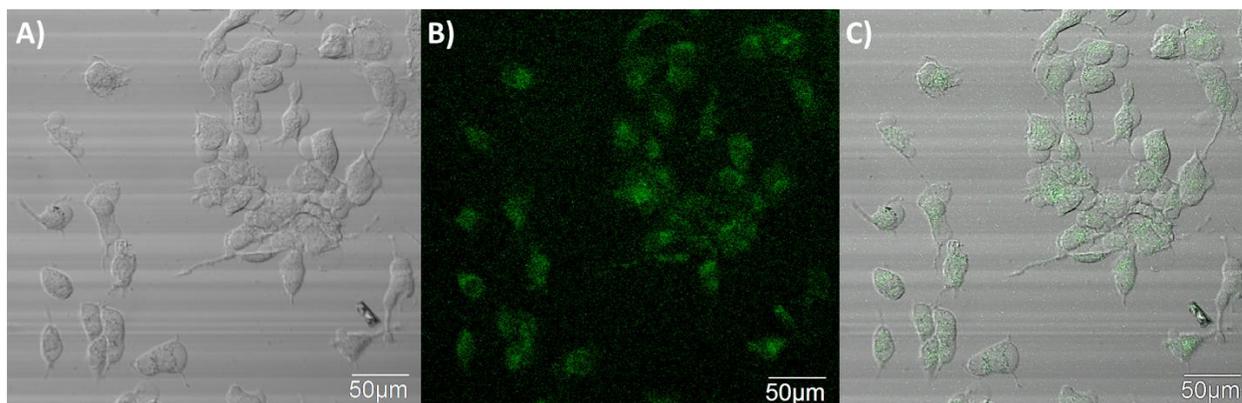


Figura 39. Internalización de bionanomotores cargados con Tamoxifen dentro de células de cáncer MDA-231. A) Células cancerígenas MDA-231 con bionanomotores cargados con Tamoxifen bajo luz visible. B) Células cancerígenas MDA-231 con bionanomotores cargados con Tamoxifen siendo excitadas por una longitud de onda de 480 nm, emitiendo en 520 nm. C) Superposición de imágenes A) y B).

En la figura 39, en la imagen A) se muestran las células cancerígenas MDA-231 con bionanomotores cargados con Tamoxifen bajo luz visible, donde no es posible apreciar los virus dado que al excitar con todas las longitudes de onda en el rango de lo visible la emisión de fluorescencia del Tamoxifen es opacada, mientras que en la imagen B) se muestra la imagen de fluorescencia en las mismas células MDA-231 con bionanomotores cargados con Tamoxifen, y es posible observar que los bionanomotores al igual que las virus sin recubrir poseen la propiedad de internalizarse por sí solos en la membrana celular de células animales debido muy probablemente su tamaño pequeño (28 nm) (Azizgolshani et al., 2013), aún se desconoce el proceso exacto por el cual se insertan los bionanomotores dentro de la célula animal. En el inciso C) se observa el empalme de las imágenes A) y B). El recubrimiento asimétrico metálico no es un impedimento para la internalización de los bionanomotores, lo cual indica que es posible utilizar estos bionanomotores para el transporte de fármacos hacia células cancerígenas y muestra biocompatibilidad en estos motores. El profármaco Tamoxifen al ser altamente hidrofóbico se acopla aleatoriamente a los sitios hidrofóbicos que se encuentran dentro de la cápside viral de CCMV.

5.9 Prueba de internalización con respecto al tiempo

Por último, con la idea de poder determinar la capacidad de internalización de los bionanmotores en comparación con virus se realizaron pruebas de internalización en distintos periodos de tiempo de bionanmotores contra virus de CCMV sin recubrimiento metálico, ambas funcionalizadas con NanoOrange®.

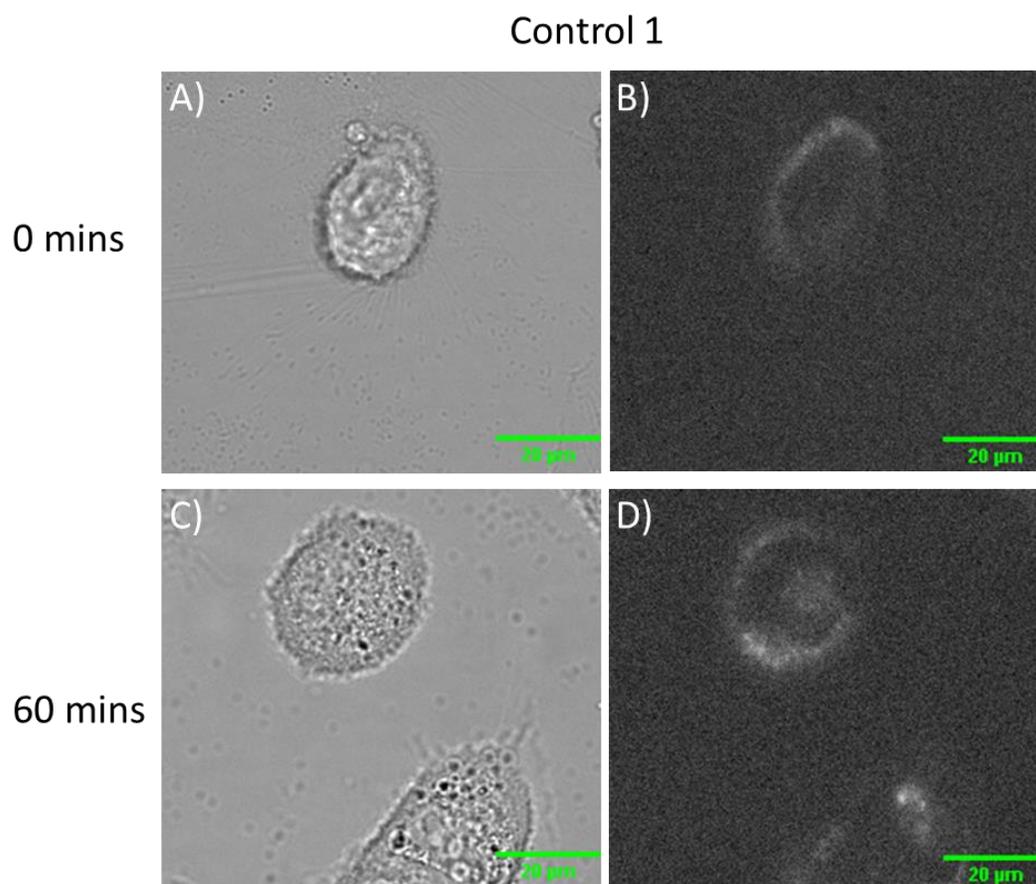


Figura 40. Control de experimentos de internalización. A) y C) Células de cáncer de mama (MDA-231) bajo luz visible en tiempo 0 y 60 minutos respectivamente. B) y D) Células de cáncer de mama (MDA-231) bajo filtro de luz azul (480 nm) en tiempo 0 y 60 minutos respectivamente.

Utilizando el microscopio Nikon® Eclipse Ti y software Nis Elements versión 4.4 se contabilizó el incremento de intensidad de luz en las Células de cáncer de mama (MDA-231) con respecto al tiempo (figura 40). La intensidad de fluorescencia de los virus en B) y D) En tiempo 0 y 60 minutos respectivamente se mantuvo estable durante el periodo de incubación. Cabe recalcar que el control se encuentra en condiciones óptimas (temperatura, estabilidad, etc.). Las imágenes de los incisos B) y D) difieren un poco debido a cuestiones de enfoque en el software.

Como experimento final se realizó la internalización de bionanmotores funcionalizados con NanoOrange®, llevando a 1% de H_2O_2 la solución de DEM, para otorgarle propiedad de movimiento a los bionanmotores a distintos tiempos (20, 40, y 60 minutos) para observar si es que existe alguna mejora en la internalización en comparación con los virus sin recubrir.

Muestras

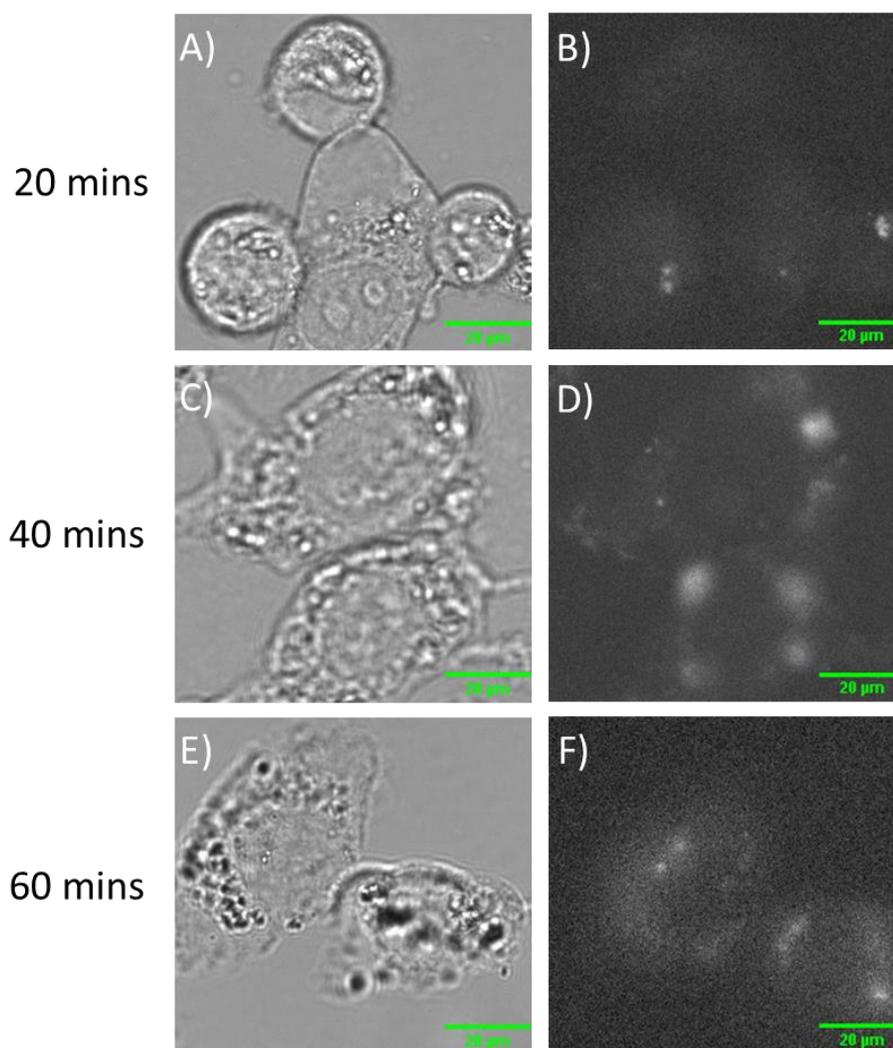


Figura 41. Internalización de bionanmotores de virus de CCMV en células de cáncer de mama (MDA-231). A), C), D) Células de cáncer de mama (MDA-231) bajo luz visible en tiempo 0, 40 y 60 minutos respectivamente. B), D) y E) Células de cáncer de mama (MDA-231) bajo filtro de luz azul (480 nm) en tiempo 0, 40 y 60 minutos respectivamente.

Es posible intuir por la intensidad de la fluorescencia obtenida a 40 minutos en el inciso D) de la figura 41 que hayamos obtenido una mayor internalización a las células cancerígenas en menor tiempo, en comparación al control de la figura 35 inciso A) donde a 60 minutos se ha perdido casi toda la fluorescencia, sin embargo, es necesario realizar más experimentos e investigación bibliográfica más profunda en torno a la internalización para poder determinar si efectivamente, el otorgarle las propiedades de movimiento a los virus genera un efecto positivo en la internalización en células cancerígenas los cuales no fueron posibles realizar en este trabajo de tesis debido a los tiempos de entrega en el presente trabajo. Además es necesario modificar cuestiones del experimento, tal como el uso de menores concentraciones de H_2O_2 para reducir el efecto nocivo del H_2O_2 en las células de cáncer de mama MDA-231, fabricar una especie de cámara que selle alrededor del microscopio óptico en la cual podamos mantener una atmósfera de CO al 5% (condición necesaria para mantener estables las células) y erradicar la necesidad de traslado de muestras, donde se generan movimientos bruscos que fomentan el desprendimiento de las células cancerígenas de la base de la caja Petri causando la muerte de la célula de cáncer de mama MDA-231.

Capítulo 6. Conclusiones

- Es posible fabricar bionanmotores virales realizando un recubrimiento asimétrico de platino en las cápsides virales de CCMV y BMV, el platino al actuar como catalizador del peróxido de hidrogeno lo descompone generando burbujas de O₂ de un lado del bionanomotor lo que resulta en la propulsión del motor en dirección opuesta a las burbujas y al catalizador.
- Es posible obtener recubrimientos metálicos asimétricos de platino sobre las virus por medio de la técnica de “sputtering” utilizando un ángulo de 65° del blanco con respecto a la normal de la muestra, durante el proceso de depósito, generado un recubrimiento preferencial sobre un lado de las partículas a recubrir. Esta manera de recubrir los virus produce bionanmotores donde el platino actúa como catalizador del peróxido de hidrogeno descomponiéndolo y generando burbujas de O₂ de un lado del bionanomotor lo que resulta en la propulsión del motor en dirección opuesta a las burbujas y al catalizador.
- Los virus de CCMV y BMV mantienen su capacidad de retención de moléculas después de ser marcadas fluorescentemente con NanoOrange, el profármaco Tamoxifen y posteriormente recubiertas con platino, así mismo el recubrimiento metálico no es un impedimento para observar la fluorescencia emitida por dichas partículas dado que es posible observarlas después de todo el proceso de modificación antes mencionado.
- La velocidad máxima promedio en los bionanmotores de CCMV es de 8.95µm/s (298 cuerpos por segundo) mientras que en los bionanmotores de BMV fue de 9.19µm/s (306 cuerpos por segundo), aumentando la velocidad estándar de los virus sin recubrimiento metálico y sin combustible 9.5 veces, ambos bionanmotores realizan recorridos con trayectorias aleatorias, y son independientes unos de los otros.
- Los bionanmotores de CCMV funcionalizados con NanoOrange®, así como con el profármaco anticancerígeno Tamoxifen, poseen capacidad de penetrar la membrana celular de las células de cáncer de mama MDA-231 lo que los vuelve un prospecto a utilizar para el transporte de fármacos.

Capítulo 7: Perspectivas

Los resultados antes mencionados, nos motivan a seguir trabajando en el desarrollo de bionanmotores para ser utilizados en el transporte y liberación de fármacos, a seguir trabajando la especialización de estos motores, utilizando componentes metálicos que nos permitan controlar la dirección de estos bionanmotores para un transporte de fármacos mejor dirigido, así mismo utilizar otros métodos de propulsión y utilizarlos en los virus para crear bionanmotores 100% biocompatibles, por último, buscar otros fármacos que nos permitan utilizar estos bionanmotores para el tratamiento o control de otras enfermedades.

Literatura citada

- Abdelmohsen, L. K. E. a., Peng, F., Tu, Y., & Wilson, D. a. (2014). Micro- and nano-motors for biomedical applications. *J. Mater. Chem. B*, 2(17), 2395–2408. <http://doi.org/10.1039/C3TB21451F>
- Azizgolshani, O., Garmann, R. F., Cadena-Nava, R., Knobler, C. M., & Gelbart, W. M. (2013). Reconstituted plant viral capsids can release genes to mammalian cells. *Virology*, 441(1), 12–17. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2013.03.001>
- Calvo-Marzal, P., Sattayasamitsathit, S., Balasubramanian, S., Windmiller, J. R., Dao, C., & Wang, J. (2010). Propulsion of nanowire diodes. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 46(10), 1623–1624. <http://doi.org/10.1039/b925568k>
- Delogu, F. (2009). Molecular Dynamics of a Nanomotor Based on Carbon Nanotubes. *J. Phys. Chem. C*, 113(36), 15909–15913. <http://doi.org/10.1021/jp904609c>
- Fox, J. M., Wang, G. J., Speir, J. A., Olson, N. H., Johnson, J. E., Baker, T. S., & Young, M. J. (1998). Comparison of the native CCMV virion with in vitro assembled CCMW virions by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *Virology*, 244(1), 212–218.
- Gao, W., D'Agostino, M., Garcia-Gradilla, V., Orozco, J., & Wang, J. (2013). Multi-fuel driven janus micromotors. *Small*, 9(3), 467–471. <http://doi.org/10.1002/smll.201201864>
- Gao, W., Kagan, D., Pak, O. S., Clawson, C., Campuzano, S., Chuluun-Erdene, E., ... Wang, J. (2012). Cargo-towing fuel-free magnetic nanoswimmers for targeted drug delivery. *Small*, 8(3), 460–467. <http://doi.org/10.1002/smll.201101909>
- Gao, W., Manesh, K. M., Hua, J., Sattayasamitsathit, S., & Wang, J. (2011). Hybrid nanomotor: A catalytically/magnetically powered adaptive nanowire swimmer. *Small*, 7(14), 2047–2051. <http://doi.org/10.1002/smll.201100213>
- Gibbs, J. G., & Zhao, Y. P. (2009). Autonomously motile catalytic nanomotors by bubble propulsion. *Applied Physics Letters*, 94(16). <http://doi.org/10.1063/1.3122346>
- Ibele, M., Mallouk, T. E., & Sen, A. (2009). Schooling behavior of light-powered autonomous micromotors in water. *Angewandte Chemie - International Edition*, 48(18), 3308–3312. <http://doi.org/10.1002/anie.200804704>
- Li, Y., Wu, J., Xie, Y., & Ju, H. (2015). An efficient polymeric micromotor doped with Pt nanoparticle@carbon nanotubes for complex bio-media. *Chemical Communications*, 51(29), 6325–6328. <http://doi.org/10.1039/c5cc00546a>
- Ma, Y., Nolte, R. J. M., & Cornelissen, J. J. L. M. (2012). Virus-based nanocarriers for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(9), 811–825. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2012.01.005>
- Mallouk, T. E., & Sen, A. (2009). Powering nanorobots. *Scientific American*, 300(5), 72–77. <http://doi.org/10.1038/scientificamerican0509-72>
- Minten, I. J., Hendriks, L. J. a, Nolte, R. J. M., & Cornelissen, J. J. L. M. (2009). Controlled encapsulation of multiple proteins in virus capsids. *Journal of the American Chemical Society*, 131(49), 17771–17773. <http://doi.org/10.1021/ja907843s>
- Mou, F., Chen, C., Zhong, Q., Yin, Y., Ma, H., & Guan, J. (2014). Autonomous Motion and

Temperature-Controlled Drug Delivery of Mg/Pt-Poly(N-isopropylacrylamide) Janus Micromotors Driven by Simulated Body Fluid and Blood Plasma. *ACS Applied Materials & Interfaces*. <http://doi.org/10.1021/am502729y>

- O'Neil, A., Reichhardt, C., Johnson, B., Prevelige, P. E., & Douglas, T. (2011). Genetically Programmed In Vivo Packaging of Protein Cargo and Its Controlled Release from Bacteriophage P22. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(32), 7425–7428. <http://doi.org/10.1002/anie.201102036>
- Ogata, Y., Tuan, N. A., Takase, S., & Mizutani, G. (2010). Polarization and azimuthal angle dependence of the optical second harmonic generation from Pt nanowires on the MgO(110) faceted template. *Surface and Interface Analysis*, 42(10–11), 1663–1666. <http://doi.org/10.1002/sia.3595>
- Sánchez, S., Soler, L., & Katuri, J. (2015). Chemically Powered Micro- and Nanomotors. *Angewandte Chemie International Edition*, 1414–1444. <http://doi.org/10.1002/anie.201406096>
- Sattayasamitsathit, S., Kou, H., Gao, W., Thavarajah, W., Kaufmann, K., Zhang, L., & Wang, J. (2014). Fully loaded micromotors for combinatorial delivery and autonomous release of cargoes. *Small*, 10(14), 2830–2833. <http://doi.org/10.1002/sml.201303646>
- Wang, W., Duan, W., Ahmed, S., Mallouk, T. E., & Sen, A. (2013). Small power: Autonomous nano- and micromotors propelled by self-generated gradients. *Nano Today*, 8(5), 531–534. <http://doi.org/10.1016/j.nantod.2013.08.009>