



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

TITULO

DISEÑO Y FABRICACIÓN DE NANOTRANSPORTADORES DE MEDICAMENTOS HIDRÓFOS

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA

PATLAN SALAZAR DIEGO ARMANDO

DIRECTOR DE TESIS

Dr. JAIME RUIZ GARCÍA

CODIRECTORA

Dra. ELIZABETH REYNAGA HERNANDEZ

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P

ENERO DEL 2023



El programa de Maestría en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados (PNCP) del CONACyT, registro 519, en el Nivel Consolidado.

Número de registro de la beca otorgada CONACyT: 788069, No. CVU: 1100668

DISEÑO Y FABRICACIÓN DE NANOTRANSPORTADORES DE ...

Por: Diego Armando Patlán Salazar

A partir de: 18 ene 2023 13:59:48
22,127 words - 242 matches - 132 sources

Índice de similitud

26%



DISEÑO Y FABRICACION DE NANOTRANSPORTADORES DE
MEDICAMENTOS HIDRÓFOBOS UASLP by PATLAN SALAZAR
DIEGO ARMANDO UASLP is licensed under a [Creative Commons
Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

San Luis Potosí, SLP.

Enero 2023

**Comité Académico del Posgrado en Ciencias Químicas
Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por el alumno de maestría Diego Armando Patlán Salazar, titulada “Diseño y fabricación de nanotransportadores de medicamentos hidrófobos” ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para iniciar los trámites correspondientes para su titulación. El examen de grado tendrá lugar el próximo 31 de enero del presente año, a las 12 horas en el Auditorio Chico de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP.

Atentamente

Dr. Jaime Ruiz García
Director de tesis

Dra. Elizabeth Reynaga Hernández
Codirectora de tesis

Dra. Mildred Quintana Ruiz
Comité tutelar extendido

Dr. José Luis Cuellar Camacho
Comité tutelar extendido

Jurado

Dra. Mildred Quintana Ruiz
Sinodal

Dr. José Luis Cuellar Camacho
Sinodal

Dra. Elizabeth Reynaga Hernández
Sinodal

Dr. Jaime Ruiz García
Sinodal

Integrantes del Subcomité de Tesis

Dra. Mildred Quintana Ruiz
Sinodal

Dr. José Luis Cuellar Camacho
Sinodal

Dra. Elizabeth Reynaga Hernández
Sinodal

Dr. Jaime Ruiz García
Sinodal

Dedicatoria

A mi madre.....
A mi hermana.....

Le agradezco especialmente a mi madre ya que, con su apoyo, su motivación y sus palabras he podido llegar tan lejos. Eres mi ejemplo más grande de perseverancia, sacrificio y trabajo, te agradezco por siempre estar apoyándome en las buenas y en las malas.

De igual manera agradezco a mi hermana porque siempre apoyó mis decisiones y siempre tuvo palabras de motivación que me ayudaron en momentos complicados para poder terminar con esta etapa.

Estoy agradecido con el Dr. Jaime Ruiz García por permitirme hacer este trabajo en su laboratorio y por las asesorías brindadas durante el desarrollo del proyecto, pero principalmente por la paciencia que me tuvo.

Le agradezco mucho a la Dra. Elizabeth Reynaga Hernández por orientarme durante el desarrollo del proyecto y por siempre estar dispuesta ayudarme en la parte experimental aparte de resolver todas las dudas que surgieron durante el desarrollo de este.

Agradezco a mis amigas Any y Rita por siempre motivarme a seguir adelante y principalmente por ayudarme a creérmela que soy capaz de llegar tan lejos como me lo proponga, muchas gracias.

Agradezco a mis compañeros del laboratorio por apoyarme a desarrollar las metodologías experimentales en las que tuve problemas y por tenerme paciencia durante mi estancia en el laboratorio.

Agradezco a CONACyT por la beca brindada para poder desarrollar este proyecto ya que sin este apoyo me hubiera sido imposible seguir con mis estudios para obtener este grado.

Resumen

La nanotecnología fue desarrollada con la finalidad de mejorar las tecnologías ya existentes, debido a que el uso de ésta ayuda a disminuir la inversión de tiempo y dinero en el desarrollo de sistemas a esta escala. Ha sido de gran importancia en muchas áreas de investigación, pero una en la que más ha resaltado es en la bionanotecnología, esto ya que se han desarrollado sistemas a esta escala que ayudan a identificar y tratar de erradicar muchas enfermedades, entre estas el cáncer. El cáncer ha ido en aumento en los últimos años debido a los malos hábitos que tendemos a tener como sociedad, en cuestiones alimenticias, ritmo de vida, entre otras. Esta enfermedad maligna puede desarrollarse en cualquier tejido del cuerpo de un ser vivo, cuando las células se dividen y crecen de manera incontrolada formando un tumor, si se trata de un cáncer metastásico, este puede migrar de su lugar de origen y proliferar en otros lados del cuerpo. Actualmente los fármacos que se utilizan en las quimioterapias son muy tóxicos para las personas y tienden a tener efectos secundarios graves, debido a esto, es necesario continuar desarrollando sistemas que ayuden a disminuir estos niveles de toxicidad. El desarrollo de las partículas tipo virus (VLPs, por sus siglas en inglés) ha ayudado a combatir muchas enfermedades, debido a que las VLPs son nanotransportadores que consisten en la cápside de un virus purificado, al cual se le extrae su material genético y puede transportar medicamentos, genes externos, vacunas, etc. Al usarse un virus de origen vegetal para el desarrollo de VLPs no hay riesgo de una reacción inmune en contra de partículas virales, ya que estos se caracterizan por solo infectar y replicarse en plantas, no podrían hacerlo en animales. Al introducir medicamentos anticancerígenos en estas partículas, se espera que al entrar a la célula puedan ejercer su acción con la dosis mínima necesaria para ejercer su acción, sin matar muchas células normales. El desarrollo de VLPs con virus como el CCMV ha tenido gran importancia en la actualidad ya que son fáciles y económicos de obtenerse.

Palabras clave: Camptotecina, Paclitaxel, Nanovehículo, Virus, CCMV

Abstract

Nanotechnology was developed with the purpose of improving existing technologies, because the use of it helps to reduce the investment of time and money in the development of systems on this scale. It has been of great importance in many research areas, but one in which it has stood out is in bionanotechnology, since systems have been developed on this scale that help to identify and try to eradicate many diseases, including cancer. Cancer has been increasing in recent years due to the bad habits that we tend to have as a society, in terms of food, lifestyle, among others. This malignant disease can develop in any tissue of the body of a living being, when the cells have an uncontrolled cell division giving a tumor cell, in the case of tumor metastasis, the malignant cells migrate from the origin tumor place and proliferate in a new organs. Currently, the drugs used in chemotherapies are very toxic to people and tend to have serious secondary effects, due to that, it is necessary to continue developing systems to help for reduce these levels of toxicity. The development of virus-like particles (VLP) has helped fight many diseases, because VLPs are nanocarriers that consist of the capsid of a purified virus (from which the genetic material is eliminated from them) and they can carry drugs, foreign genes, vaccines, etc. When using a virus of plant origin for the development of VLPs, there is no risk of an immune reaction against viral particles, since these are characterized by only infecting and replicating in plants, they could not do so in animals. By introducing anticancer drugs into these particles, the aim is when they enter into the cell, they will be able to exert their action with the minimum necessary dose, without affecting normal cells. The development of VLPs like CCMV has been of great importance nowadays since they are easy and cheap to obtain.

Keywords: Camptothecin, Paclitaxel, Nanocarrier, Virus, CCMV

ÍNDICE

Resumen	viii
Abstract.....	ix
1 Introducción y antecedentes.	1
1.1 Nanotecnología	1
1.1.2 Impacto	4
1.1.3 Aplicaciones	4
1.1.4 Beneficios.....	10
1.1.5 Riesgos	10
1.2 La Nanotecnología en el diagnóstico, tratamiento y prevención del cáncer	10
1.2.1 ¿Qué es el cáncer?	10
1.2.2 Estadísticas mundiales del cáncer	14
1.2.3 Estadísticas del cáncer en México	15
1.2.4 Tratamientos.....	19
1.3 Sistemas de transporte y administración de fármacos.....	23
1.3.1 Fármacos	23
1.3.2 Camptotecina	23
1.3.3 Paclitaxel	25
1.3.4 Virus.....	27
1.3.5 Virus como sistema de transporte de fármacos	31
1.3.6 Partículas tipo virus (VLP)	32
1.3.7 VLPs como transportadores de fármacos.....	34
1.3.8 Orientación selectiva de nanotransportadores.....	34
1.3.9 Requisitos de los nanotransportadores para la entrega de fármacos.	35

1.4 Virus del frijol moteado (CCMV)	36
1.4.1 Proteína viral para encapsidar fármacos	38
1. JUSTIFICACION	41
2. HIPOTESIS	41
3. OBJETIVO.....	42
4.1 Objetivo general.....	42
4.2 Objetivos específicos	42
4. Material y métodos.....	43
5.1 Producción de CCMV.....	43
5.1.1 Siembra de frijol california black eye no. 5	43
5.1.2 Inoculación del virus CCMV en plantas de frijol california black eye no.5.....	44
5.1.3 Cosecha de hojas de frijol california black eye no.5 infectadas con virus.....	45
CCMV	45
5.2 Purificación del virión de CCMV	46
5.2.1 Molienda de las hojas.....	46
5.2.2 Separación de componentes celulares	47
5.2.3 Colchón de sacarosa.....	48
5.2.4 Obtención de partículas virales del CCMV.....	49
5.2.5 Precipitación de partículas virales del CCMV.....	50
5.2.6 Purificación de la proteína.....	52
5.3 Encapsidación de fármacos.	53
5.10 Ultravioleta (UV-VIS, NANODROP).....	55
5.11 Dispersión de luz dinámica.	56
5.13 Movilidad electroforética.....	59
5.14 Viabilidad celular	62

5. Resultados	65
6.1 Obtención y caracterización del CCMV	65
6.2 Caracterización del virus mediante geles de retardación.	65
6.2.1 Caracterización del virus CCMV por DLS	66
6.2.2 Caracterización del virus CCMV por UV-Vis con adaptador NANODROP.	67
6.3 Caracterización de la proteína por UV-Vis.	69
6.4 Caracterización por potencial Z de los fármacos Camptotecina y Paclitaxel.	71
6.5 Caracterización por UV-Vis de los fármacos Camptotecina y Paclitaxel	72
6.6 Caracterización por UV-Vis de los sistemas fármaco-proteína	73
6.7 Caracterización por electroforesis de los sistemas fármaco-proteína	74
6.8 Pruebas de viabilidad celular	78
7 Discusión	81
8 Conclusiones	82
9 REFERENCIAS	83
Abreviaturas	94
Lista de figuras	96
Lista de tablas	99

1 Introducción y antecedentes.

1.1 Nanotecnología

El término nanotecnología fue utilizado por primera vez en 1974 por Norio Taniguchi [1] (Universidad de Tokio) para referirse a la capacidad de diseñar materiales con precisión a la escala de nanómetros (abarca desde 1 hasta 100 nm) como se describen en la Figura 1. Durante ese año la nanotecnología comenzó a crecer con fuerza y condujo a los científicos más optimistas a trabajar con empeño en diferentes áreas de investigación.

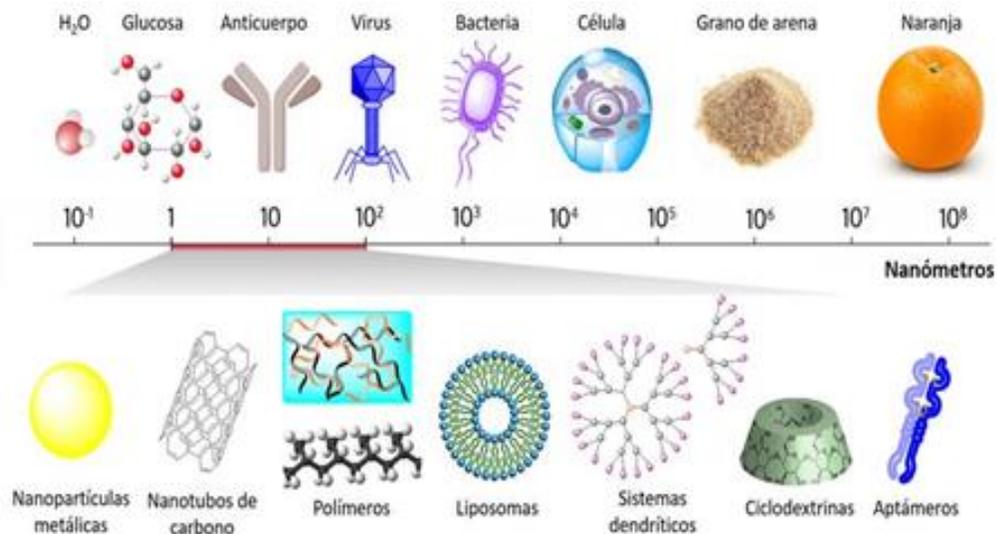


Figura 1. Alcance de la nanotecnología representado con diferentes estructuras en las que se especifica su tamaño, tomada de Prasad y col. 2012[2]

Nanotecnología descendente (top-down) y ascendente (bottom-up)

Haciendo referencia a su significado actual, los “materiales de ingeniería” generalmente se considera que comprenden el diseño, caracterización, producción y aplicación de materiales, y el alcance se ha ampliado en la actualidad a incluir dispositivos y sistemas en lugar de solo materiales. La nanotecnología se define, así como el diseño y fabricación de materiales, dispositivos y sistemas con

control en dimensiones nanométricas. Por tanto, la esencia de la nanotecnología es el tamaño y el control. Se divide en dos clasificaciones, según la técnica de aplicación: técnicas descendentes (top-down) y técnicas ascendentes (bottom-up). En el caso de la nanotecnología top-down, se trata de diseñar y miniaturizar el tamaño de estructuras para obtener a nanoescala sistemas funcionales en el caso de producción de nanoelectrónica (miniaturización de sistemas electrónicos) [2]. Y en el caso de la nanotecnología tipo bottom-up, se centra en la construcción de estructuras y objetos más grandes a partir de sus componentes atómicos y moleculares, es decir, este tipo de nanotecnología es acogida como el enfoque principal de la nanotecnología ya que permite que la materia pueda controlarse de manera extremadamente precisa [3].

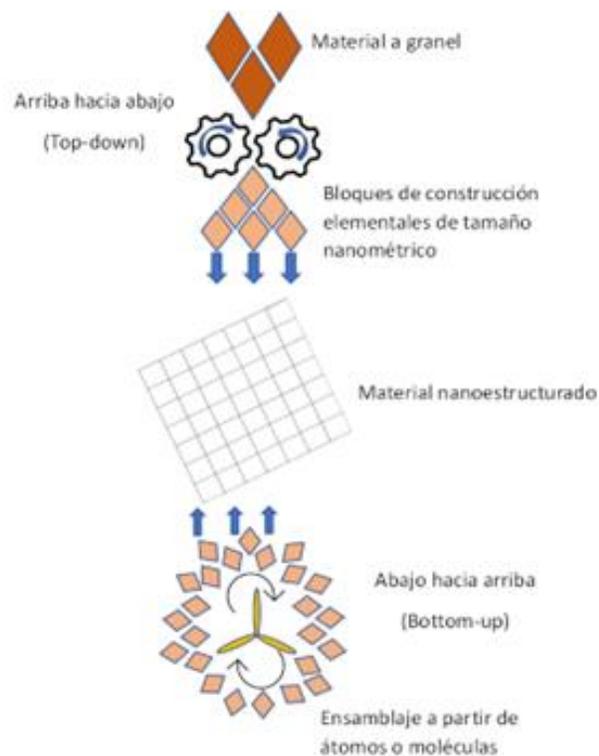


Figura 2. Vista esquemática de los enfoques de nanotecnología descendente y ascendente. Imagen adaptada de [5]

Nanotecnología húmeda y seca

Por otra parte, se puede clasificar o subdividir la nanotecnología según el ámbito de aplicación, de esta forma se puede dividir en húmeda y seca, este tipo de clasificación es determinado según el medio en y para el cual se genera la aplicación, el medio puede ser acuoso (nanotecnología húmeda) y en el caso de la ausencia de un entorno húmedo (nanotecnología seca). La aplicación de la nanotecnología húmeda va dirigida al desarrollo de sistemas biológicos [4], estas incluyen la manipulación del material genético [5][6], membranas [6], enzimas [7] y otros componentes celulares, que están inmersos en un sistema acuoso. Por parte de la nanotecnología seca, se resalta como característica su predominante aplicación en el campo de la electrónica y se puede mencionar por ejemplo el magnetismo [8][9], dispositivos ópticos [10] y desarrollo de materiales inorgánicos.

Cuando pensamos en lo que la nanotecnología puede hacer por nosotros abordamos la cuestión de por qué a menudo se dice que la nanotecnología es revolucionaria, se consideran 3 aspectos distintos: indirecto, directo y conceptual. Al hablar de un aspecto indirecto hacemos referencia a la miniaturización progresiva de las tecnologías existentes, lo que abre nuevas áreas de aplicación de esas tecnologías, el aspecto directo se refiere a la aplicación de nuevos métodos y artefactos de nanoingeniería, ya sea para mejorar el rendimiento de los procesos y materiales existentes, o para propósitos novedosos, por último, el aspecto conceptual de la nanotecnología es en el que todos los materiales y procesos se consideran desde un punto de vista molecular o incluso atómico, como en los sistemas vivos en que las moléculas complicadas (como las proteínas) se descomponen en sus aminoácidos constituyentes que luego se utilizan para la síntesis de plantillas de nuevas proteínas. La contraparte artificial de este proceso es en gran parte un territorio intacto [11].

La nanotecnología se ha manifestado en una amplia gama de materiales que pueden ser utilizados en biología, este tipo de materiales se han diseñado con

superficies químicamente modificables para unir una variedad de ligandos que pueden convertir estos nanomateriales en biosensores [12], etiquetas fluorescentes a escala molecular [13], agentes de formación de imágenes, vehículos de administración de fármacos dirigidos [14] y otras herramientas biológicas de gran utilidad. La libertad para diseñar y modificar nanomateriales a células diana, fármacos acompañantes, procesos biomoleculares de imagen, detectar y señalar respuestas moleculares a agente terapéuticos y guiar procedimientos quirúrgicos es la capacidad fundamental que ofrece la nanotecnología, que promete impactar en el desarrollo de fármacos, diagnósticos médicos, y aplicaciones clínicas en profundidad [15].

1.1.2 Impacto

El desarrollo de tecnologías a nivel nanométrico ha tenido un impacto muy grande en la sociedad a nivel mundial ya que, con el desarrollo de estas, los beneficios son variados y junto con estos se puede observar un crecimiento social que día a día hace más fácil la estadía de la raza humana en el planeta. Es importante mencionar que dentro de los beneficios también se contempla el cuidado del medio ambiente ya que con el crecimiento de estas nuevas tecnologías también se puede hacer un cambio para bien en el entorno que nos rodea.

1.1.3 Aplicaciones

Las aplicaciones de estas nuevas tecnologías han tenido mucho éxito en diferentes áreas las cuales tienen como única finalidad resolver problemáticas que surgen día a día o el simple hecho de contemplarlas ya que en la mayoría de los casos la producción de estas es más viable en varios aspectos en los que cabe resaltar el ámbito económico y facilidad de producción.

- Electrónica

La nanotecnología presenta muchas oportunidades para remodelar la industria electrónica de manera descendente (top-down), esta tecnología gira en torno a la capacidad de fabricar estructuras de alambre a nanoescala mediante el ensamblaje de nanopartículas conductoras. Dentro de los enfoques más atractivos cabe resaltar:

- ✓ Los nanocables de electricidad que se pueden formar utilizando solo técnicas simples y directas
- ✓ Los nanocables resultantes se conectan automáticamente a contactos eléctricos
- ✓ La corriente eléctrica puede pasar a lo largo de los nanocables desde el momento de su formación
- ✓ No se requiere manipulación de los grupos para formar el nanoalambre porque el cable se “autoensambla”
- ✓ El ancho del nanoalambre se puede controlar por el tamaño del grupo que se elige

Unos de los méritos de la técnica es que es extremadamente simple: partículas a nanoescala, formadas por agregación de gas inerte, se depositan a partir de un haz molecular sobre nanocontactos prefabricados. La deposición de grupos es aleatoria, pero se gestiona mediante una nueva estrategia de superficie con plantilla o dentro de la teoría de percolación [16]. En el enfoque de plantillas, las estructuras de superficie guían las partículas a las posiciones “correctas” para formar un alambre [17]. En el enfoque de percolación, se ha utilizado una comprensión profunda de la teoría y sofisticadas simulaciones por computadora para diseñar geometrías de dispositivos que aseguran que se forme una única ruta similar a un cable entre los contactos cerca del umbral de percolación [18].

- Medio ambiente

Se han desarrollado nanopartículas, nanomembranas, nanofiltros y nanocatalizadores para el tratamiento de aguas residuales. Estos tienen un tamaño más pequeño y una mayor proporción de área de superficie a volumen. Debido a estas propiedades, proporcionan más superficie de reacción, lo que da como resultado una mayor eficiencia y selectividad, lo que a su vez le da aplicaciones muy importantes como:

- ✓ Prevención de la contaminación.
- ✓ Detección de contaminantes.
- ✓ Purificación y remediación de contaminación.

Varias nanopartículas como hierro, magnéticas, TiO_2 , ZnO , ferrita y nanopartículas poliméricas y bioactivas dan una respuesta rápida y también ayudan a la erradicación de los contaminantes [19].

- Energías renovables

La nanotecnología se puede utilizar para mejorar la renovación de fuentes de energía renovables; por ejemplo, la eficiencia de la energía eólica se puede mejorar utilizando nanomateriales ligeros y más resistentes para las palas del rotor. En energía de biomasa utilizando agricultura de precisión basada en nanotecnología para optimizar el cultivo generado para producir biocombustibles. Los nano-revestimientos se pueden utilizar para prevenir la corrosión de los equipos de energía mareomotriz, mientras que los nanocompuestos se utilizan para hacer que las perforadoras en energía geotérmica sean más resistentes a la fatiga. Así la aplicación de estas tecnologías puede beneficiar esta área en varios aspectos [20].

- Alimentos y agricultura

Las crecientes preocupaciones de los consumidores sobre la calidad de los alimentos y los beneficios para la salud están impulsando a los investigadores a encontrar la forma que pueda mejorar la calidad de los alimentos y al mismo tiempo alterar al mínimo el valor nutricional del producto. La demanda de materiales basados en nanopartículas se ha incrementado en la industria alimentaria, ya que muchos de ellos contienen elementos esenciales y también se ha descubierto que no son tóxicos [21].

Las aplicaciones de la nanotecnología en el sector alimentario se pueden resumir en dos grandes grupos que son los ingredientes nanoestructurados alimentarios y la nanosensibilidad alimentaria. Los ingredientes nanoestructurados de los alimentos abarcan una amplia área, desde el procesamiento de los alimentos hasta su envasado. En el procesamiento de alimentos, estas nanoestructuras se pueden utilizar como aditivos alimentarios, portadores para la entrega inteligente de nutrientes, agentes antiaglomerantes, agentes antimicrobianos, rellenos para mejorar la resistencia mecánica y la durabilidad del material envasado, etc. Mejor evaluación de la calidad e inocuidad de los alimentos [22].

En el sector agrícola en particular, la nanotecnología juega un papel importante en la producción de cultivos, procesamiento y empaque de alimentos, seguridad alimentaria y purificación de agua, remediación ambiental, mejoramiento de cultivos y protección de plantas. La productividad agrícola se puede mejorar a través de animales y plantas mejorados genéticamente inducidos por nanomateriales, la administración de moléculas y fármacos específicos del sitio de moléculas a niveles celulares/moleculares en animales y plantas, y la modificación genética basada en nanomateriales en animales y plantas en condiciones de estrés.

La nanotecnología tiene el potencial de suministrar con precisión agroquímicos para mejorar la resistencia a las enfermedades, el crecimiento de las plantas y el uso de nutrientes. Los productos nanoencapsulados muestran la capacidad de un uso más eficaz y específico del sitio de pesticidas, insecticidas y herbicidas de una manera más ecológica. Se utiliza con éxito en postcosecha para mantener la frescura, la calidad y la vida útil del producto almacenado y prevenir la aparición de enfermedades de una manera bastante más segura [23].

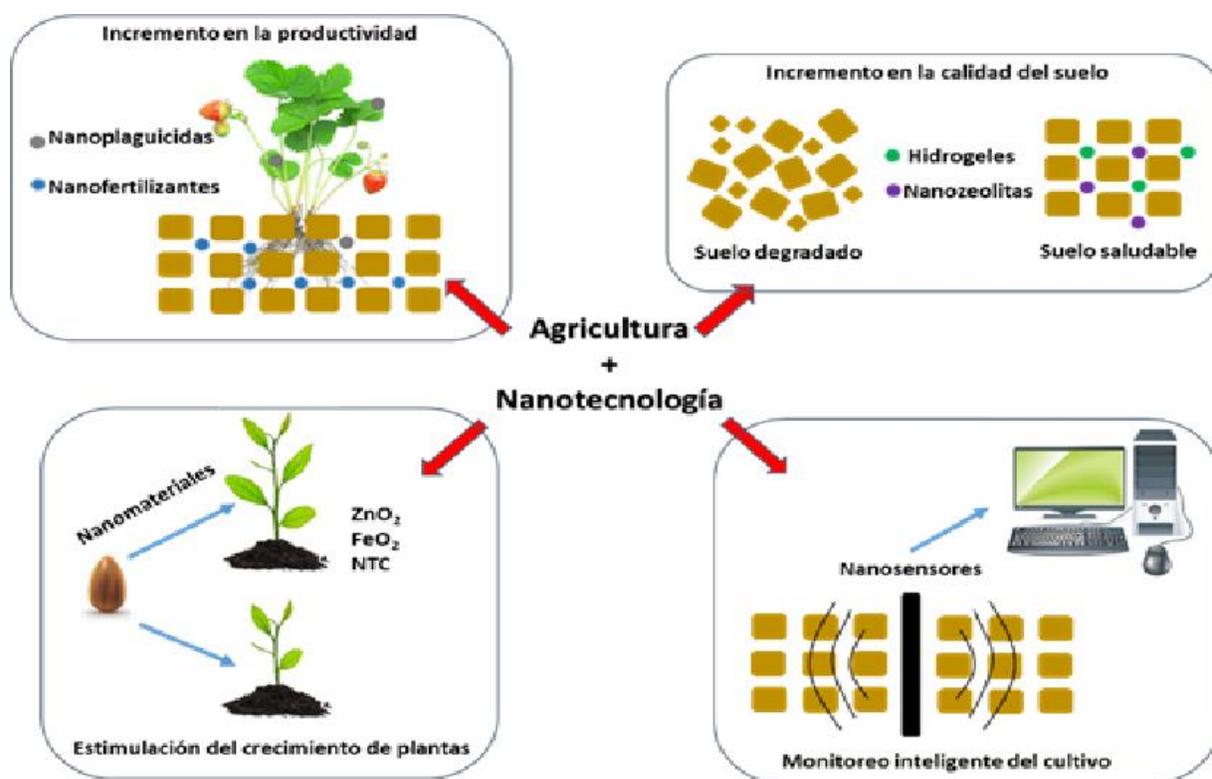


Figura 3. Aplicaciones más importantes de la nanotecnología en el área de agricultura, tomada de [24].

- Industria

El uso de la nanotecnología en la industria textil se ha incrementado rápidamente debido a sus propiedades únicas y valiosas. Existe un potencial considerable para aplicaciones rentables de la nanotecnología en el algodón y otras

industrias textiles. Su aplicación puede extender económicamente las propiedades y valores de procesamiento y productos textiles. El uso de nanotecnología permite que los textiles se vuelvan multifuncionales y produzcan tejidos con funciones especiales, que incluyen antibacteriano, protección UV, fácil de limpiar, permeables y anti-olor. El éxito futuro de la nanotecnología en las aplicaciones textiles radica en áreas donde los nuevos principios se combinarán en sistemas textiles multifuncionales y duraderos sin comprometer las propiedades textiles inherentes, incluida la procesabilidad, la flexibilidad, etc. [25].

- Bionanotecnología

En la biología se aplican como plataformas de administración de fármacos [26], agentes de contraste de imagen mejoradas [27], nanolabs basados en chips capaces de monitorear y manipular células individuales [28] [28], sondas a nanoescala que pueden rastrear los movimientos en las células [29] y moléculas individuales [30] a medida que se mueven en su entorno. Este tipo de avances sin duda, son de mucha utilidad ya que nos permite observar el movimiento de los organismos en el medio y de esta forma sea más sencillo determinar la progresión de una enfermedad y ampliándose el conjunto de herramientas existentes para la administración de fármacos y la monitorización no invasiva de fármacos.

A pesar de su pequeño tamaño, las nanopartículas pueden albergar decenas de miles de átomos o moléculas pequeñas, como el agente de contraste gadolinio para imágenes por resonancia magnética (RM), lo que brinda la oportunidad de mejorar la sensibilidad de detección de enfermedades como el cáncer en su etapa más temprana [31].

1.1.4 Beneficios

Actualmente la aplicación de estas tecnologías trae consigo diversos beneficios que ayudan de diferente manera en las actividades cotidianas, por ejemplo, la nanotecnología puede resolver muchos problemas humanos, las computadoras y dispositivos de visualización serían increíblemente baratos, los productos de alta tecnología pueden permitir a la gente vivir con mucho menos impacto ambiental y sobre todo los avances en esta área apoyan en gran medida al campo de la medicina (herramientas de diagnóstico, nanotransportadores, etc.).

1.1.5 Riesgos

Al igual que cualquier nueva tecnología desarrollada, la nanotecnología podría ser utilizada para perjudicar a la sociedad con beneficios personales de aquellos que lo desarrollen, de esta manera, por ejemplo, con la nanotecnología se podrían desarrollar armas que serían extremadamente poderosas y peligrosas, puede generar daños ambientales y en la salud todo aquello que no esté regulado. Las soluciones sencillas para estos retos no serían la mejor opción, ya que sería improbable encontrar la respuesta más adecuada a estos sistemas de planificación tan meticulosa.

1.2 La Nanotecnología en el diagnóstico, tratamiento y prevención del cáncer

Actualmente la aplicación de la nanotecnología para la detección temprana de diferentes enfermedades y padecimientos, entre estos el cáncer, ha disminuido la mortalidad de la población a nivel mundial ya que con el apoyo de sistemas nanométricos se ha conseguido desarrollar diferentes metodologías y tratamientos para diferentes tipos de padecimientos que algunas veces llegan a ser mortales.

1.2.1 ¿Qué es el cáncer?

El cáncer es un aumento descontrolado de crecimiento celular que se puede dar en un órgano o tejido, debido a una desregulación molecular genética, propiciada

por condiciones heredadas o ambientales. Dependiendo de donde se presenta este cambio a nivel celular modificando un tejido u órgano, será el tipo de cáncer. Los 30 billones de células de un cuerpo sano viven en un complejo intercondominio colgante regulando uno la proliferación del otro. De hecho, normalmente las células se reproducen solo cuando se les indica hacerlo por otras células de su vecinidad. Tal colaboración incesante asegura que cada tejido mantiene un tamaño y arquitectura adecuada a las necesidades del cuerpo [32].

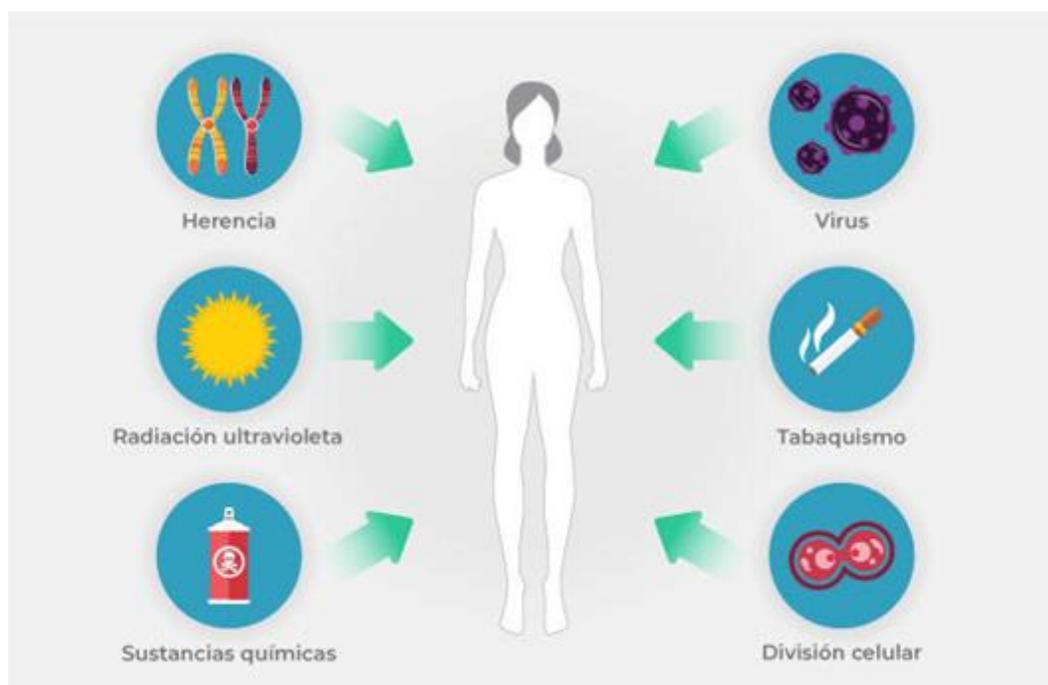


Figura 4. Factores que influyen en el desarrollo de cáncer, tomado de [33]

Las células cancerosas, en marcado contraste, violan este esquema: se vuelven sordas a los controles habituales sobre proliferación y seguimiento bajo su propia agenda interna para producción. También poseen una uniforme propiedad más insidiosa: debido a que pierden adherencia celular, fenómeno conocido como metástasis, las células cancerosas tienen la capacidad de migrar desde el sitio donde comenzaron, invadiendo los tejidos cercanos y formando masas en sitios distantes del cuerpo. Tumores compuestos de tales células malignas tienden a

volverse cada vez más agresivos con el tiempo, y se vuelven letales cuando interrumpen a los tejidos y órganos necesarios para la supervivencia del organismo en su conjunto [32].

Como sabemos actualmente las células de un tumor descienden de una célula ancestral común que a la vez inicio un programa de reproducción inapropiada. Mas allá, la transformación maligna de una célula se produce a través de la acumulación de mutaciones en genes específicos en la célula.

Los genes, son un grupo de secuencias de bases púricas o pirimídicas (A, T, G, C), que conforman el ADN (ácido desoxirribonucleico) localizado en el núcleo de la célula. Dependiendo de las necesidades de la célula, un gen se transcribe y genera una secuencia de aminoácidos para producir una proteína en particular; la proteína luego lleva a cabo el trabajo de la génesis. Las mutaciones en un gen pueden cambiar las cantidades o funciones de una proteína específica, necesaria para una actividad en particular en la célula.

Dos clases de genes, los protooncogenes y genes supresores de tumores, juntos constituyen solo una pequeña proporción del conjunto genético total, juegan un papel importante en el desencadenamiento del cáncer, en su configuración normal, participan y juegan papeles importantes en el ciclo de vida de la célula, la división celular. Los protooncogenes fomentan tal crecimiento, mientras que los genes supresores de tumores lo inhiben. Colectivamente, estas dos clases de genes tienen un papel fundamental en la proliferación incontrolada de células observada en cánceres humanos.

Cuando mutan, los protooncogenes pueden convertirse en oncogenes cancerígenos que impulsan la multiplicación excesiva de células. En el caso de los genes supresores de tumores, por el contrario, contribuyen al crecimiento del cáncer

cuando son inactivos por mutaciones, en consecuencia, la pérdida de producción de supresor funcional priva a la célula de controles importantes en la división celular que previenen un crecimiento inadecuado [34].

Para que se desarrolle un tumor canceroso, las mutaciones deben ocurrir en media docena o más genes de arrastre del crecimiento de la célula fundadora. Formas alteradas de otras clases de genes también pueden participar en la creación de una malignidad por permitir específicamente que una célula en proliferación pueda volverse invasiva o capaz de propagarse (metástasis) en todo el cuerpo. Además, las células cancerosas pueden ignorar las señales que normalmente dicen a las células que dejen de dividirse o que empiecen un proceso que se conoce como muerte celular programada, o apoptosis, el cual de forma natural utilizan las células de aquellas que no son necesarias.

Las células cancerosas pueden tener la capacidad para influir en las células normales, en las moléculas y en los vasos sanguíneos que rodean y alimentan las células de un tumor, una zona que se conoce como el microambiente. Por ejemplo, las células cancerosas pueden inducir a las células normales cercanas a que formen vasos sanguíneos que suministren oxígeno y nutrientes, necesarios para que crezcan los tumores. Estos vasos sanguíneos también retiran los productos de desecho de los tumores [32].

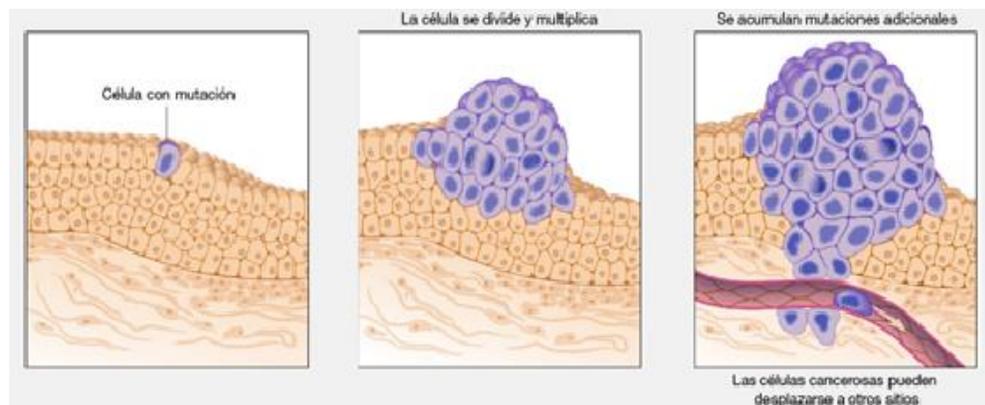


Figura 5. Origen y crecimiento de células cancerosas [35]

Al contrario de los tumores malignos, los tumores benignos no se extienden a los tejidos cercanos y no los invaden, pero pueden llegar a ser grandes. Al extirparse, a veces los tumores benignos pueden ser bastante grandes. Al extirparse, generalmente no vuelven a crecer, mientras que los tumores malignos si vuelven a crecer algunas veces. Los tumores benignos pueden poner en riesgo la vida cuando se presentan en el cerebro.

El sistema inmunitario elimina del cuerpo las células dañadas o anormales. Sin embargo, las células cancerosas, con frecuencia, son capaces de evadir el sistema inmune. Los tumores utilizan componentes del sistema inmune para seguir vivos y crecer. Por ejemplo, con la ayuda de algunas células del sistema inmunitario que impide ordinariamente una respuesta inmunitaria descontrolada, las células cancerosas pueden de hecho hacer que el sistema inmunitario no destruya las células cancerosas [36].

1.2.2 Estadísticas mundiales del cáncer

Actualmente el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, con un estimado de 9.6 millones de muertes, o una de cada seis muertes, en 2018. El cáncer de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado son los tipos más comunes de

cáncer en los hombres. El cáncer de mama, cáncer colorrectal, de pulmón, de cuello uterino y de tiroides son los más comunes entre las mujeres. Este padecimiento se encuentra por detrás de las enfermedades cardiovasculares en países desarrollados, y de las enfermedades infecciosas en países en vías de desarrollo. Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer se deben al consumo de tabaco, a un elevado índice de masa corporal, al consumo de alcohol, a una baja ingesta de frutas y verduras y a la falta de actividad física. El tabaquismo es el principal factor y ocasiona aproximadamente el 25 % de las muertes por cáncer. Las infecciones oncogénicas, entre ellas las causadas por virus de la hepatitis o por virus de papiloma humano, ocasionan el 30 % de los casos de cáncer en los países de ingresos medios y bajos [37].

A pesar de décadas de investigación básica, clínica y de ensayos de nuevas terapias prometedoras, el cáncer sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. La carga del cáncer sigue creciendo a nivel mundial, lo que ejerce una enorme presión física, emocional y financiera en las personas, las familias, las comunidades y los sistemas de salud. Muchos sistemas de salud en países de ingresos bajos y medianos están menos preparados para manejar esta carga, y un gran número de pacientes con cáncer en todo el mundo no tienen acceso a un diagnóstico y tratamiento de calidad oportunos. En países donde los sistemas de salud son sólidos, las tasas de supervivencia de muchos tipos de cáncer, están mejorando gracias a la detección temprana accesible, el tratamiento de calidad y la atención de supervivencia[38].

1.2.3 Estadísticas del cáncer en México

En 2019, las tasas de defunciones por tumores malignos indica que en las personas que estaban en una edad inferior a los 30 años no superan las 12 defunciones por cada cien mil habitantes en la que las tasas más altas son los hombres en comparación con las mujeres, aspecto que se revierte después de los 30 años y

hasta los 59 años. La tasa de defunción por sexo aumenta conforme avanza la edad y es de 1 140.10 defunciones por cada cien mil hombres de 80 años y más, en este grupo la brecha respecto a las mujeres casi se duplica (674.43 defunciones por cada 100 mil mujeres) [39].

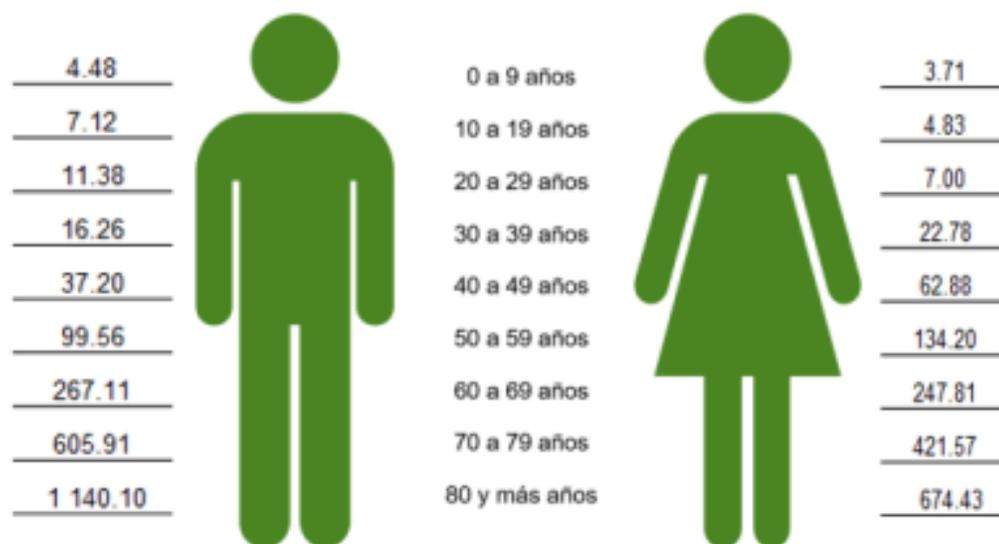


Figura 6. Tasa de defunción de tumores malignos por grupo decenal de edad y sexo 2019. Defunciones por cada 100 mil habitantes para cada grupo de edad y sexo [39]

Por tipo de tumor maligno, la leucemia es la principal causa de muerte en la población con menos de 15 años (51 % en hombres y 56 % en mujeres) y en los jóvenes de 15 a 29 años (33 % en hombres y 32 % en mujeres). La segunda causa en la población infantil (menores de 15 años) es el tumor maligno de las meninges, del encéfalo y de otras partes del sistema nervioso central (18 % en hombres y 15 % en mujeres); mientras que en las mujeres de 15 a 29 años es el tumor maligno de cuello de útero (9 %) y el de ovario (6 %); en los hombres de la misma edad, es el linfoma no Hodking (6 %) [39].

Tabla 1. Distribución porcentual de defunciones de los principales tumores malignos por grupos de edad (0 a 14 años y 15 a 29 años) y sexo 2019 [39].

Principales causas de muerte en hombres		Principales causas de muerte en mujeres	
De 0 a 14 años	100	De 0 a 14 años	100
Leucemia	51	Leucemia	56
Tumor maligno de las meninges, del encéfalo y de otras partes del sistema nervioso central	18	Tumor maligno de las meninges, del encéfalo y de otras partes del sistema nervioso central	15
Tumor maligno del hígado y de las vías biliares intrahepáticas	4	Tumor maligno del hígado y de las vías biliares intrahepáticas	3
Linfoma no Hodgkin	3	Linfoma no Hodgkin	3
Otras causas de tumores malignos	24	Otras causas de tumores malignos	23
De 15 a 29 años	100	De 15 a 29 años	100
Leucemia	33	Leucemia	32
Linfoma no Hodgkin	6	Tumor maligno del cuello del útero	9
Tumor maligno de las meninges, del encéfalo y de otras partes del sistema nervioso central	5	Tumor maligno de las meninges, del encéfalo y de otras partes del sistema nervioso central	7
Tumor maligno del estómago	3	Tumor maligno del ovario	6
Otras causas de tumores malignos	53	Otras causas de tumores malignos	46

En la población masculina de 30 a 59 años que falleció por tumores malignos, 12 % se debió a tumor maligno de colon, recto y ano, seguido por los tumores malignos del estómago (10 %) y los de tráquea, bronquios y pulmón (8 %). En las mujeres, el tumor maligno de mama ocupa el primer lugar (23 %) y le sigue el tumor de cuello de útero (13 %) y el tumor de ovario (9 %).

En lo que respecta a los adultos mayores de 60 años y más, en las mujeres la principal causa de muerte es el tumor maligno de mama (13 %), seguida por el tumor maligno de hígado y de las vías biliares intrahepáticas (10 %); mientras en los hombres las dos primeras causas son el tumor maligno de próstata (22 %) y el tumor maligno de la tráquea, de los bronquios y del pulmón (11 %) [39].

Tabla 2. Distribución porcentual de defunciones de los principales tumores malignos por grupos de edad (30 a 59 años y 60 años y más) y sexo 2019

Principales causas de muerte en hombres		Principales causas de muerte en mujeres	
De 30 a 59 años	100	De 30 a 59 años	100
Tumor maligno del colon, del recto y del ano	12	Tumor maligno de la mama	23
Tumor maligno del estómago	10	Tumor maligno del cuello del útero	13
Tumor maligno de la tráquea, de los bronquios y del pulmón	8	Tumor maligno del ovario	9
Leucemia	7	Tumor maligno del colon, del recto y del ano	6
Otras causas de tumores malignos	63	Otras causas de tumores malignos	49
De 60 años y más	100	De 60 años y más	100
Tumor maligno de la próstata	22	Tumor maligno de la mama	13
Tumor maligno de la tráquea, de los bronquios y del pulmón	11	Tumor maligno del hígado y de las vías biliares intrahepáticas	10
Tumor maligno del hígado y de las vías biliares intrahepáticas	9	Tumor maligno del colon, del recto y del ano	8
Tumor maligno del colon, del recto y del ano	8	Tumor maligno de la tráquea, de los bronquios y del pulmón	7
Otras causas de tumores malignos	50	Otras causas de tumores malignos	62

Entre enero y agosto de 2020 se registraron 683 823 defunciones, de las cuales 9 % se deben a tumores malignos (60 421), la distribución porcentual por sexo indica que en este período hay más fallecimientos de mujeres (51 %) que en hombres (49 %) por esta causa, lo que ubica a los tumores malignos como la cuarta causa de muerte para este período.

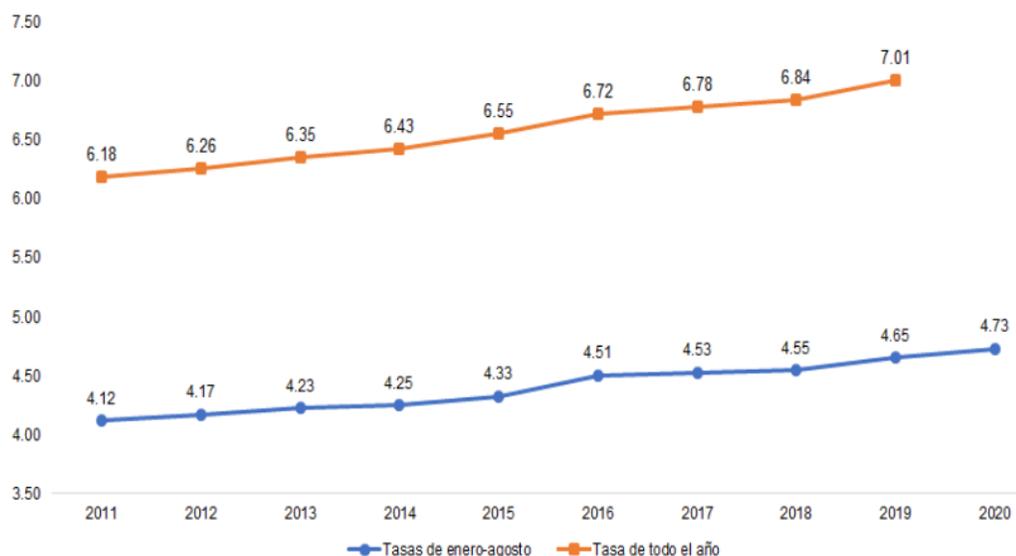


Figura 7. Tasas de defunciones por tumores malignos por cada 10 000 habitantes Enero-Agosto (2011-2020) y cierre de año (2011-2019)

A nivel nacional, la tasa de mortalidad por tumores malignos para el año 2019 es de 70 defunciones por cada 100 mil habitantes. Las entidades federativas donde se ubican las tasas de defunciones por tumores malignos más altas (73.48 a 97.10) son: la Ciudad de México, Sonora, Chihuahua, Veracruz, Nuevo León, Sinaloa y Nayarit. En contraste, las entidades que registran las tasas más bajas (50.93 a 62.44) son: Quintana Roo, Guerrero, Tlaxcala, Estado de México, Guanajuato, Chiapas, Tabasco, Aguascalientes y Puebla [39].

1.2.4 Tratamientos

En la actualidad existen muchos tipos de tratamientos para el cáncer los cuales dependerán del tipo y que tan avanzado se encuentre.

- Cirugía para tratar el cáncer

La cirugía es un procedimiento por el que un médico extirpa el cáncer del cuerpo, regularmente se usa cuando los tumores son sólidos y se encuentran en un

solo sitio, este tipo de proceso también es utilizado para realizar la reducción de tumores o para conseguir alivio de los síntomas del cáncer en algunas personas (este último es cuando las personas desarrollan un tipo de cáncer el cual les genera dolor o presión en alguna parte de su cuerpo). Las personas que serán sometidas a este tratamiento son expuestas a diferentes estudios para determinar la viabilidad de la cirugía [40].

- Radioterapia para tratar el cáncer

Es un tipo de tratamiento que usa altas dosis de radiación para destruir células cancerosas y reducir el tamaño de tumores al dañar su ADN. Las células cancerosas cuyo ADN está dañado irreparablemente dejan de dividirse o mueren. Este tipo de tratamiento no destruye de inmediato las células, se requiere de varias sesiones las cuales pueden ser distribuidas en días o semanas, luego las células cancerosas siguen muriéndose semanas o meses después de terminar con la radioterapia. Este tipo de terapia consiste en 2 tipos: de haz externo y radioterapia interna.

El tipo de radioterapia que necesite cada persona depende del tipo de cáncer, el tamaño del tumor, la ubicación del tumor en el cuerpo, que tan cerca esté el tumor a tejidos normales sensibles a la radiación, entre otros [41].

- Quimioterapia para tratar el cáncer

La capacidad de la quimioterapia para destruir las células cancerosas depende de su capacidad para detener la división celular. Usualmente, los fármacos actúan dañando el ARN o ADN que indica a la célula como realizar la copia de sí misma en la división. Si las células no pueden dividirse, mueren. Cuanto más rápido se dividan las células, habrá más probabilidades de que la quimioterapia destruya las células y el tumor reduzca su tamaño. Además, estos fármacos inducen al suicidio celular (muerte celular programada o apoptosis).

Desafortunadamente, la quimioterapia no reconoce la diferencia entre las células normales y cancerosas. Las células “normales” volverán a crecer y ser saludables, mientras tanto, se presentan efectos secundarios. Las células no cancerígenas que se ven más afectadas por los procesos de quimioterapias son las células sanguíneas, las que se encuentran en la boca, el estómago y el intestino, así como los folículos pilosos; lo que provoca recuentos sanguíneos bajos, afecciones bucales, náuseas, diarrea y/o pérdida de cabello. Dependiendo del fármaco que se utilice en los procesos quimioterapéuticos, son los efectos secundarios que se presentaran, afectando diferentes partes del cuerpo [42].

- Inmunoterapia para tratar el cáncer

Es un tratamiento que ayuda al sistema inmunitario a combatir el cáncer el cual se divide en varios pasos, por ejemplo: los inhibidores de puntos de control inmunitario que son fármacos que bloquean los puntos de control inmunitarios para que se estimule más la respuesta inmune y sea capaz de eliminar a las células cancerosas; la terapia de transferencia de células T que consiste en la extracción de células cancerosas de un paciente, las cuales son modificadas para que ataquen y destruyan por completo el tumor que se desarrolla; anticuerpos monoclonales los cuales pueden servir como marcadores para que los tumores sean más visibles para el sistema inmune y de esta forma destruyan las células cancerosas; vacunas de tratamiento las cuales funcionan al fortalecer la respuesta del sistema inmunitario contra células cancerosas; inmunomoduladores, son sustancias que intensifican la respuesta inmunitaria del cuerpo contra el cáncer [41] [43].

- Terapia dirigida para tratar el cáncer

Es un tipo de tratamiento que ataca los cambios en las células cancerosas que les ayuda a crecer, a dividirse y a diseminarse. Esto se hace mediante varios mecanismos que consiste en ayudar al sistema inmunitario a destruir las células

cancerosas, detiene el crecimiento de este tipo de células, impide que se formen vasos sanguíneos alrededor de los tumores para que este no obtenga los recursos necesarios para seguir creciendo, algunos otros llevan sustancias destructoras a las células cancerosas causando su muerte [44].

- Terapia hormonal para tratar el cáncer

Es un tratamiento que hace lento o detiene el crecimiento de cáncer. En el caso del cáncer de seno los tratamientos se usan regularmente después de una cirugía para evitar que el cáncer “regrese” y este puede durar de 5 a 10 años, el principal objetivo de usar este tipo de tratamientos es reducir los niveles de estrógeno o evita que el estrógeno actúe en las células cancerosas del seno [45]. En el caso del cáncer de próstata también es conocida como terapia supresora de andrógenos, teniendo como objetivo reducir los niveles de hormonas masculinas en el cuerpo (andrógenos), los andrógenos estimulan el crecimiento de las células cancerosas de la próstata, los principales son la testosterona y la dihidrotestosterona. Los testículos producen la mayor parte de los andrógenos [46]. Este tipo de terapias ayuda a reducir el tamaño de los tumores antes de que se realice una cirugía o radioterapia, reduce el riesgo de que regrese el cáncer después del tratamiento y a destruir las células cancerosas que han regresado o que se han extendido a otras partes del cuerpo.

- Trasplantes de células madre en el tratamiento del cáncer

Las células madre provenientes de la médula ósea del torrente sanguíneo o del cordón umbilical, son transfundidas al paciente para reemplazar a aquellas células que han sido destruidas por un tratamiento con dosis altas de radio o quimioterapia. El tratamiento se enfoca en recuperar la capacidad de producir células madre. Sin embargo, en el mieloma múltiple y en algunos tipos de leucemia, el trasplante de células madre puede actuar directamente contra el cáncer. Este efecto ocurre cuando los glóbulos blancos del donante (el injerto) atacan las células cancerosas que

permanecen en el cuerpo del receptor después de tratamientos con dosis elevadas [47].

- Pruebas de biomarcadores para el tratamiento del cáncer

Son una forma de identificar genes, proteínas o sustancias llamadas biomarcadores o marcadores biológicos únicos en el paciente que ofrecen información sobre el cáncer y son pruebas enfocadas a personas con cáncer en la sangre o tumores sólidos. Este tipo de pruebas son distintas de las pruebas genéticas que se usan para saber si alguien heredó mutaciones que hacen que sea más probable que tenga cáncer [48].

1.3 Sistemas de transporte y administración de fármacos

1.3.1 Fármacos

Actualmente el uso de fármacos para el tratamiento de los diferentes cánceres que afectan la sociedad es considerado una de las mejores opciones, aunque todos los que se han desarrollado hasta el momento desgraciadamente presentan un alto nivel de toxicidad para las personas ya que estos, al momento de entrar en contacto con el cuerpo no distinguen entre las células sanas y las células cancerosas, atacando a ambos tipos de células, lo que hace que su aplicación como tratamiento no sea el más apto.

1.3.2 Camptotecina

La Camptotecina (CPT) (figura 8) es un derivado alcaloide aislado por primera vez de los extractos de una planta oriental, *Camptotheca acuminata* de origen chino, es un alcaloide de quinolina que consiste en un sistema de anillos de pentaciclo de 2 planos que incluye una pirrolidina, una porción quinolínic, una lactama, un estereocentro con configuración (S) en el sistema alfa-hidroxi lactámico y una fracción aromática deslocalizada [49]. A principios de los años 70's, los estudios iniciales,

centrados en el mecanismo de acción de la CPT, determinaron que la actividad citotóxica del alcaloide podría producirse debido a la capacidad de inhibir la síntesis de DNA y RNA. Se observó que dicha inhibición se producía de forma reversible, pero aumentando la concentración y el tiempo de exposición de la CPT, el bloqueo de las secuencias se volvía irreversible. Las conclusiones generales determinaron que la Camptotecina (CPT) es selectiva en la fase S del ciclo celular, que consiste en la replicación del DNA para tener una copia exacta, una vez que se duplicó el DNA entra en fase G2 que es cuando se condensa y lo organiza para la división celular, fase M, mejor conocida como mitosis. El fármaco detiene la fase G2 e induce la fragmentación del DNA cromosomal [50].

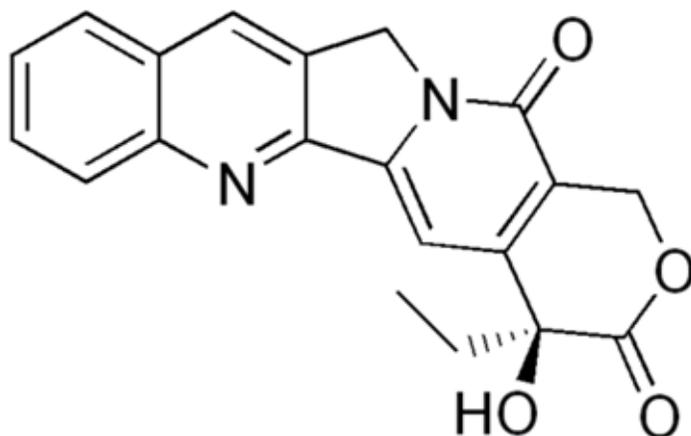


Figura 8. Estructura química del fármaco hidrófobo Camptotecina (CPT).

La CPT se considera uno de los agentes con mayor potencia antitumoral *in vitro* que se conoce, sin embargo, sus aplicaciones terapéuticas se ven comprometidas debido a su nula solubilidad en agua y su extrema toxicidad. La mayoría de estos efectos adversos se deben a la rápida inactivación que sufre el alcaloide en condiciones fisiológicas al abrirse el anillo de lactona para dar lugar a su forma de carboxilato. Si bien, la forma abierta del compuesto pasa a ser soluble en agua, su actividad antitumoral se pierde y la estructura del carboxilato es fácilmente filtrada por

los riñones produciendo, entre otros daños, cistitis hemorrágica severa y extrema mielosupresión [51].

1.3.3 Paclitaxel

El Paclitaxel (figura 9), un nuevo agente anticanceroso aislado por primera vez de la corteza de *Taxus brevifolia*, fue el primer miembro identificado de una nueva clase de medicamentos contra el cáncer conocidos como taxanos, tiene un amplio espectro de actividad antineoplásica [52]. Tiene citotoxicidad *in vitro* contra los cánceres de ovario [53], mama [54], cuello uterino [55], páncreas [56], próstata [57], colon [58], gástrico [59], vejiga [52], pulmón [60], melanoma, hepatoma, y leucemia, a menudo en concentraciones inferiores a las alcanzadas en el suero de pacientes. El aumento del tiempo de exposición al Paclitaxel parece aumentar la actividad del fármaco. El paclitaxel actúa por vía dependiente de la formación de microtúbulos en la fase G2 entrando a mitosis, mientras que otros describen que lo hace independientemente de esta vía, generando apoptosis [61].

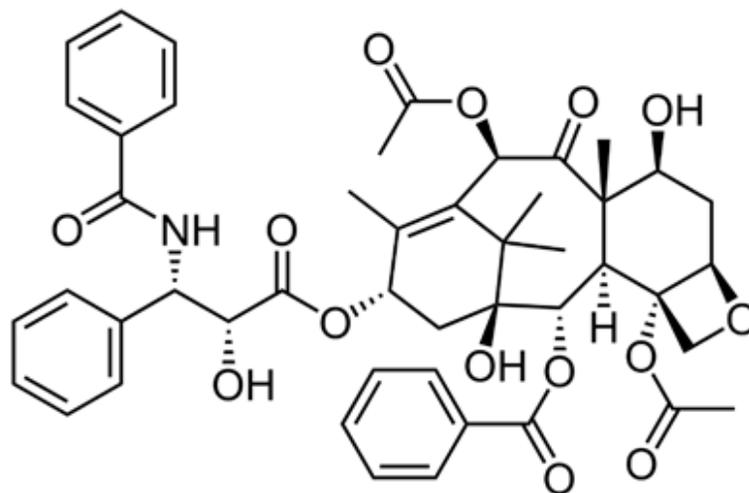


Figura 9. Estructura química del fármaco Paclitaxel

En algunos casos tratados con Paclitaxel se desarrolla neurotoxicidad reversible. El Paclitaxel también produce una supresión dependiente de la concentración de la citotoxicidad de las células asesinas naturales y mononucleares de sangre periférica humana contra las líneas celulares cancerosas. Estos efectos se producen con el pretratamiento con interleucina-2. Por el contrario, la liberación estimulada, pero no sin estimular, de las citocinas proinflamatorias interleucina-1 β y factor de necrosis tumoral- α de los fagocitos mononucleares humanos es potenciada de manera dependiente de la dosis por Paclitaxel. El fármaco también inhibe las funciones de los neutrófilos asociados a los microtúbulos. En algunos otros se producen reacciones graves de hipersensibilidad aguda [62], que en muchos casos requieren intervención terapéutica y / o la interrupción del tratamiento. Sin embargo, la incidencia de estas reacciones se ha reducido a menos del 5 % después de la introducción de premedicación con dexametasona y antagonistas de los receptores H₁ y H₂ de histamina. Las reacciones de hipersensibilidad incluyen con frecuencia disnea, hipotensión, manifestación de angioedema, urticaria, rubor y / o erupción eritematosa y generalmente ocurren durante la administración de la primera o segunda dosis de Paclitaxel, en la mayoría de los casos dentro de los 10 min posteriores a inicio de la infusión del fármaco [63].

La toxicidad limitante de la dosis de Paclitaxel es generalmente neutropenia y leucopenia, aunque la administración de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y una reducción del tiempo de infusión de 24 a 3 h reduce la incidencia de esta toxicidad. En los ensayos clínicos, se desarrolló leucopenia o granulocitopenia de grado 4 en el 16 al 100 % de los pacientes tratados con Paclitaxel de 135 a 250 mg/ml en más de 24 h. Sin embargo, del 21 al 62 % de los pacientes que recibieron el fármaco en infusión de 24 h fueron hospitalizados debido a neutropenia febril, mientras que la sepsis durante la neutropenia provocó la muerte en aproximadamente el 1.3 % de los pacientes [64].

El Paclitaxel causa bradicardia asintomática transitoria [65], pero rara vez se desarrollan arritmias graves. Otros efectos adversos asociados incluyen mucositis, toxicidades gastrointestinales, alopecia, artralgias y mialgias. También se han notificado muchos efectos adicionales normalmente leves (alteración del gusto, diarrea, dolor de garganta, estomatitis, fatiga, fiebre, edema, hipotensión, hipomagnesemia, disnea, dolor de cabeza, enrojecimiento facial, flebitis, azotemia transitoria y difusión hepatocelular transitoria). Otros efectos reportados fueron convulsiones, insuficiencia renal reversible inexplicable, tiflitis o reacciones de recuerdo a la radiación cutánea [66].

Regularmente para su administración, como es poco soluble en agua, se formula un vehículo de aceite de ricino polioxetilado al 50 % y alcohol al 50 % (etanol). Aunque no se han completado ensayos adecuados de dosis-respuesta para Paclitaxel, una dosis de 135 a 175 mg/ml, administrada con una infusión intravenosa de 3 a 24 horas cada 3 semanas, parece ser eficaz en pacientes con cáncer de ovario metastásico. Una infusión de 175 mg/ml durante 3 horas parece eficaz en pacientes con cáncer de mama metastásico después del fracaso de la quimioterapia antineoplásica previa. Los ciclos posteriores de Paclitaxel deben administrarse solo cuando los recuentos neutrófilos y plaquetas sean adecuados, y la dosis debe reducirse en un w si los pacientes experimentan neutropenia grave o neuropatía periférica grave [64].

1.3.4 Virus

La palabra virus se empezó a utilizar a comienzos de la década de 1790, deriva del latín *venenum* y significa “veneno”, se describió a los virus como agentes submicroscópicos capaces de crecer en células vivas [67]. Los virus fueron identificados como agentes causantes de enfermedades en plantas y animales que pasaban a través de los filtros que las bacterias no podían atravesar [68].

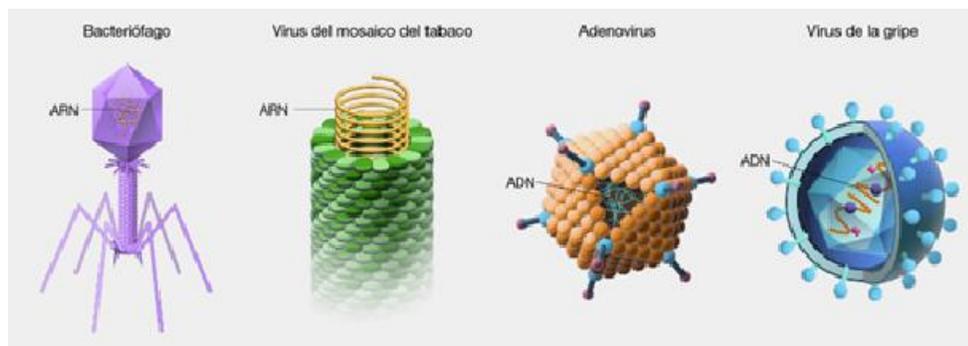


Figura 10. Ejemplos de virus [69]

Los virus son entidades submicroscópicas infecciosas que en el caso más sencillo constan solamente de material genético protegido por una capa de proteínas llamada cápside viral, en el caso de los que infectan plantas, son principalmente útiles ya que son de naturaleza ubicua, biodegradables, biocompatibles y no peligrosos para los humanos. Las cápsides de este tipo de sistemas presentan una morfología icosaédrica y filamentosa, en el caso de las partículas icosaédricas, estas presentan un tamaño que varía desde 18 hasta 500 nm [70].

Los virus son expertos huéspedes en las células. Han desarrollado mecanismos con astucia para sobrevivir en el ambiente del medio extracelular, para adherirse a las células, cruzar membranas para “secuestrar” los sistemas de transporte intracelular y posteriormente entregar sus genomas en el compartimiento subcelular apropiado, por ejemplo, el citosol o el núcleo. Por ello los virus son utilizados como una herramienta para transfectar genes externos en el interior de la célula.

Los virus están compuestos por estructuras hechas por múltiples copias, la gran mayoría, de un mismo tipo de proteína, también conocidas como cápsides (del latín “capsa” que significa caja y “meros” que significa parte), que se ensamblan de diferentes formas con una variedad de tamaños que abarcan desde decenas hasta cientos de nanómetros. La cápside (CP) está constituida por proteínas y tiene dos

funciones importantes: proteger el material genético, el reconocimiento y anclaje a una célula hospedera en la cual se puede replicar el virus. Debido a sus ventajas, incluida la producción xx, características estructurales bien definidas, formas y tamaños únicos, programabilidad genética y química, se han utilizado recientemente en aplicaciones biomédicas y síntesis de materiales [71].

El ciclo de replicación de los virus consta generalmente de las siguientes fases: adhesión, penetración, replicación, ensamblaje/maduración y liberación o descarga [72].

- Adhesión: en esta etapa el virus es capaz de adherirse a la célula huésped mediante receptores o moléculas específicas que se encuentran en la superficie de éstas. La adhesión es debida, generalmente, a interacciones de tipo electrostático o de fuerzas de van Der Waals, y no requiere de energía celular. Este proceso ocurre por la unión específica de una proteína viral de unión conocida como proteína espiga o spike a una molécula o proteína de la membrana celular llamada receptor. Este paso es crítico en el ciclo de replicación viral, ya que si se bloquea la adhesión se impide la infección. De hecho, las vacunas antivirales hacen que el sistema inmune genere anticuerpos, para impedir que el spike viral se adhiera al receptor celular.
- Penetración: después de que un virus se adhiere al receptor celular, éste debe atravesar la membrana lipídica de la célula huésped. Este proceso depende de energía, lo cual significa que la célula debe estar metabólicamente activa. Existen 3 formas por las cuales puede pasar la penetración; translocación, endocitosis, fusión.
- Desnudamiento: proceso en el que se hincha la cápside para dar paso a dejar expuesto los extremos del genoma viral en la célula huésped. Este proceso ocurre dentro del endosoma (producido por el cambio de pH) o en el citoplasma.

Los extremos del 5' y 3' del RNA viral quedan expuestos a la maquinaria celular para su replicación.

- Replicación: consta en la replicación del material genético de la transcripción de su mensaje en un virus con molécula de RNA y de la traducción del mensaje para producir proteínas víricas, tanto las que formaran parte de la cápside como las proteínas enzimáticas necesarias para el ensamblaje de las piezas del virión y para algunas de las funciones anteriores. La estrategia de replicación de un virus depende de la naturaleza de su material genético.
- Ensamblaje: en este proceso se unen los componentes para la formación de la estructura básica viral. El sitio de ensamblaje depende del lugar de replicación del virus y del mecanismo por el cual el virus es liberado de la célula. Generalmente, el genoma con carga negativa interactúa electrostáticamente con la proteína de la cápside la cual tiene cargas positivas en un lado de su "cara".
- Maduración: es cuando el virus se hace infeccioso, este proceso generalmente incluye cambios estructurales en la partícula viral. Las proteasas virales están involucradas, aunque en algunos casos pueden actuar enzimas celulares o una mezcla de enzimas celulares y virales. Las proteasas codificadas por el virus son altamente específicas para determinar secuencias de aminoácidos y estructuras.
- Liberación: los virus formados se liberan al ambiente externo mediante dos mecanismos; lisis y gemación. Para los virus líticos (virus desnudos) la célula infectada se rompe y así libera las partículas virales, en el caso de los virus envueltos pueden "gemar" de las células a través de la membrana celular, y llevándose una parte de la membrana celular, para el caso de virus envueltos.

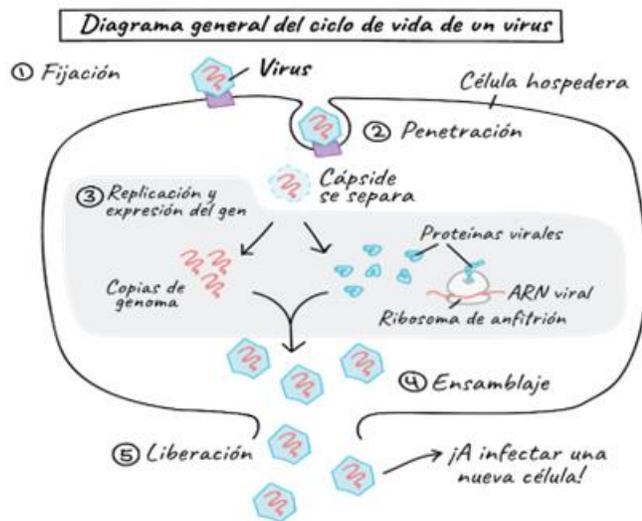


Figura 11. Diagrama del ciclo de replicación de virus [70]

1.3.5 Virus como sistema de transporte de fármacos

Hace aproximadamente 20 años, los virus se definieron por primera vez como nanopartículas virales (VNP del inglés viral nanoparticles). Las VNP son plataformas altamente prometedoras para su aplicación en el diseño de nanovehículos de entrega seguros, ya que permiten que componentes funcionales como fármacos, moléculas y nanomateriales sintéticos se adhieran a la cápside viral, lo que permite el desarrollo de dispositivos para aplicaciones médicas como la administración de medicamentos dirigidos.

La función principal de la cápside es encerrar y proteger a los ácidos nucleicos, aumentando su resistencia a temperaturas y pH extremos. Como la cápside de las VNP está compuesta principalmente de proteínas, sus superficies pueden funcionalizarse con moléculas o ligandos apropiados para dirigirlas a tejidos y células específicas dentro del cuerpo [73]. La porosidad que presentan las cápsides virales permite que pequeñas moléculas se difundan entre el medio externo y el interior de la cápside, la adhesión de moléculas dentro y fuera de la cápside se logra mediante enlaces covalentes, interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas o

interacciones con los ácidos nucleicos encapsidados. Todos estos nuevos desarrollos están dirigidos a mejorar el rendimiento de diversas moléculas, entre ellas cabe resaltar las que son de naturaleza hidrofóbica, haciéndolas más biocompatibles, solubles en agua, mostrando una toxicidad reducida y eficiencias de absorción elevadas [74].

Son conocidos también como vectores de transporte, este tipo de vectores tienen varias restricciones importantes que reducen su uso en la clínica como: una capacidad limitada de transporte de ADN, falta de especificidad celular al obtener un objetivo, mutagénesis insercional.

1.3.6 Partículas tipo virus (VLP)

Una partícula tipo virus (VLP, por sus siglas en inglés *Virus Like Particles*) consiste en un tipo de proteína estructurales que se puedan ensamblar en una cápside, generalmente proteínas de una cápside viral, las cuales tienen la propiedad de auto-ensamblarse e imitar la conformación del virus del que se derivan. También, puede contener un envoltente exterior conformado por lípidos, ya que se ha comprobado que varios virus envueltos tienen una capa que los reviste de este tipo, el principal objetivo de esta capa, al igual que en las células, es proteger su material genético. En algunos casos, los envoltentes pueden contener material del huésped infectado, lo que ayuda al virus a pasar desapercibido en el organismo. Sin embargo, si la membrana contiene las glicoproteínas, estas hacen reaccionar al sistema inmune, el cual crea anticuerpos que bloquean la adhesión de las glicoproteínas a los receptores celulares. Este tipo de partículas no son infecciosas ya que no contienen ningún material genético viral, al ser muy similares a las moléculas virales, su introducción al organismo accionara una inmunorespuesta, las personas no experimentaran ningún síntoma que generalmente le produciría el virus que se le está inyectando. Una vez que el organismo ha tenido una inmunorespuesta a la VLP, reconocerá al virus y prevendrá la infección en el futuro proporcionando inmunidad a las personas a determinado tipo de virus [75].

En los últimos años, se ha producido una diversidad de VLPs compuestas por proteínas de distinto origen, entre ellas, VLPs basadas en la nucleoproteína del virus de Hepatitis B (HBV) [76], nucleoproteína de virus de Hepatitis C (HCV) [77], proteína L1 del Virus del Papiloma Humano (HPV) [78], Hemaglutinina y proteína M1 de virus de influenza A [79], Glicoproteína (GP) [80] y proteína VP40 del virus del Ébola [81].

En la actualidad, la investigación para desarrollar más VLPs de manera exitosa ha orillado a los investigadores a intentar otros sistemas que no solamente sean cápsides virales que infectan animales, se han realizado estudios en tres ejemplos de virus icosaédricos y no icosaédricos los cuales son los virus vegetales, virus animales y retrovirus humano [82] ya que estos pueden ser adaptados fácilmente con pequeñas modificaciones para funcionar con una amplia variedad de nanopartículas orgánicas e inorgánicas. El autoensamblaje de partículas similares a virus puede conducir a materiales que combinan las características únicas de virus, como el control de tamaño preciso y la capacidad de respuesta a las señales ambientales.

Actualmente el uso de cápsides virales como opción para las partículas similares a virus (VLPs) ha tenido muchos usos para el transporte de nanocompuestos con diferentes aplicaciones finales, por ejemplo, se ha usado la cápside del virus necrótico del trébol rojo (RCMMV) para el transporte de nanopartículas de oro [83]. Estas actúan como centros nucleantes promoviendo eficientemente el autoensamblaje de cápsides simétricas. Los compuestos de VLPs obtenidos de esta manera son homogéneos y se pueden cristalizar para estudios estructurales de alta resolución, tales cristales pueden representar un nuevo lugar para metamateriales plasmónicos. Debido a su versatilidad y posibilidad de control de la interacción entre el núcleo aniónico y la capa de proteína, el concepto de nanopartículas VLP proporciona una plataforma futura para plantillas de estudios de autoensamblaje de proteínas.

1.3.7 VLPs como transportadores de fármacos

Las atractivas características de las VLPs han llevado al estudio de su utilidad como andamios acarreadores de antígenos y epítomos. Esta aplicación se orienta a la generación de respuesta inmune contra antígenos o epítomos de origen distinto al virus del que procede la VLP, que puede ser una VLP que infecta a humanos o plantas, generando así VLPs quiméricas. Por otro lado, las VLPs quiméricas basadas en virus que infectan plantas se han desarrollado bajo la premisa de que los virus de origen vegetal no se replican en células animales, por lo tanto, representa una ventaja sobre la posible inmunidad preexistente contra VLPs procedentes de virus que infectan animales o humanos [84]. En cambio, la naturaleza particulada de su CP es similar al de otras plataformas para estimular la respuesta de células del sistema inmune, por lo que las VLPs derivadas de virus vegetales resultan atractivas como andamios acarreadores de antígenos y han demostrado utilidad para el transporte de fármacos [85].

1.3.8 Orientación selectiva de nanotransportadores

Las nanopartículas pueden ser diseñadas y sintetizadas de diferentes maneras dependiendo de su aplicación final dentro de las cuales se deben de contemplar características como su tamaño, forma, propiedades químicas y físicas, etc., para programarlas para que se dirijan a las células deseadas. Pueden apuntar a las células neoplásicas a través del direccionamiento activo o pasivo.

- Direccionamiento activo

En el caso del direccionamiento activo, las nanopartículas que contienen los agentes quimioterapéuticos se diseñan de tal manera que interactúan directamente con las células defectuosas ya que se basa en el reconocimiento molecular. Por lo tanto, la superficie de las nanopartículas se modifica para apuntar a las células cancerosas, por lo general, los agentes de dirección se unen a la superficie de las

nanopartículas para el reconocimiento molecular. El sistema de administración dirigida basado en nanotecnología tiene tres componentes principales: (1) un agente inductor de la apoptosis, (2) un potenciador de la penetración de la porción dirigida y (3) un portador. Actualmente existen numerosos sistemas investigados para desarrollar estos nanotransportadores en los que comúnmente se utilizan cerámica, polímeros, lípidos, metales y virus [86].

- **Direccionamiento pasivo**

Esto se da a medida que se detiene la apoptosis en las células cancerosas, estas continúan absorbiendo agentes nutritivos de forma anormal a través de los vasos sanguíneos anchos y con fugas alrededor de las células inducidas por la angiogénesis, por tanto, aumenta la permeabilidad de las moléculas para atravesar la pared del vaso hacia el intersticio que rodea a las células tumorales. Así, las nanopartículas por debajo de ese tamaño pueden pasar fácilmente a través de los poros, como resultado, facilita la expulsión de las nanopartículas para agruparse alrededor de las células neoplásicas. Las nanopartículas pueden dirigirse a un área específica del endotelio capilar, para concentrar el fármaco dentro de un órgano en particular y perforar las células tumorales mediante difusión pasiva o convección. Por lo tanto, los fármacos que ingresan al área intersticial pueden tener tiempos de retención prolongados en el intersticio del tumor. Las nanopartículas pueden acumularse fácilmente de forma selectiva mediante una mayor permeabilidad y efecto de retención y luego difundirse en las células [86].

1.3.9 Requisitos de los nanotransportadores para la entrega de fármacos.

Actualmente están surgiendo nuevas plataformas de nanoportadores que exhiben un gran potencial para mejorar la eficiencia del empaquetado, la entrega y la focalización de medicamentos. Estos sistemas ofrecen varias ventajas, por ejemplo, la prevención de degradación prematura del fármaco o interacción con su entorno

biológico, la mejora de adsorción del fármaco a los tejidos deseados (por ejemplo, tumores) y el control sobre el perfil de distribución del fármaco en el tejido. Todos estos nuevos desarrollos están destinados a mejorar el rendimiento de los nanotransportadores de fármacos, haciendo que sean más biocompatibles, solubles en agua o coloidales, mostrando una toxicidad reducida y una alta eficiencia de absorción diferencial [87].

1.4 Virus del frijol moteado (CCMV)

El CCMV es un virus que infecta al caupí, *Vigna unguiculata*, fue el primer virus icosaédrico en ser reensamblado *in vitro* desde la proteína de la cápside purificada y el ARN aislado para crear un virión biológicamente activo. La estructura de la cápside icosaédrica del CCMV está formada por 180 proteínas de cubierta idénticas y agrupadas en 20 y 12 unidades hexaméricas y pentaméricas respectivamente, produciendo un diámetro exterior de la cápside de aproximadamente 28 nanómetros. El interior de la cápside tiene un diámetro aproximado de 21 nm y tiene un potencial electrostático fuertemente positivo, mientras que el exterior de la superficie de la cápside tiene un ligero potencial electrostático negativo [88].

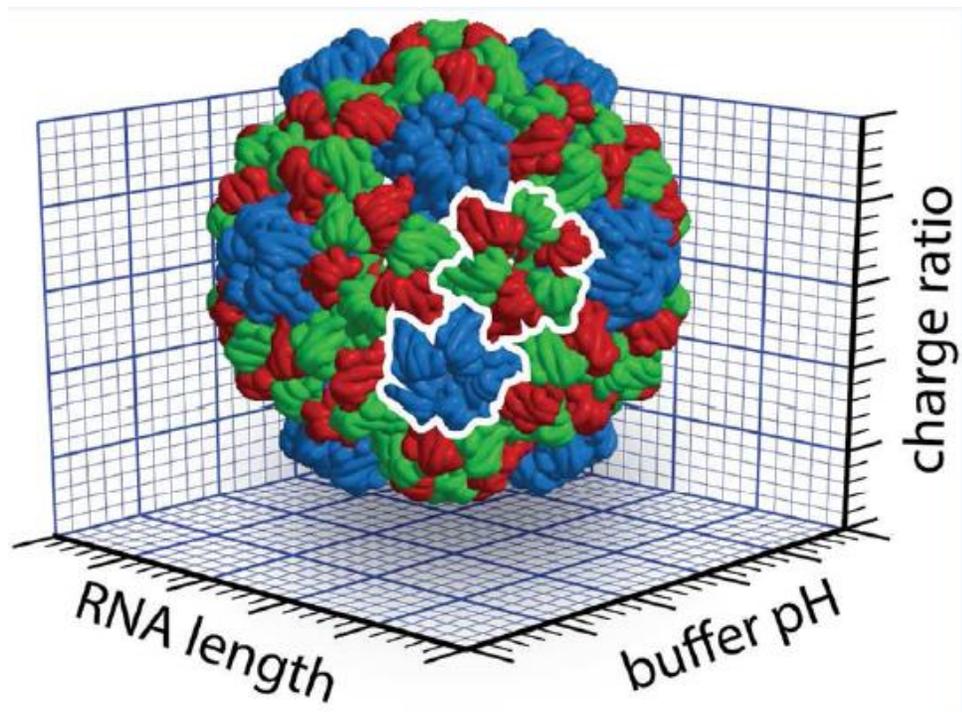


Figura 12. Estructura del virus Cowpea Chlorotic Virus (CCMV) [87].

El CCMV es estable a valores de pH entre 3 y 6, donde este virus existe de forma natural. Mientras que a un pH igual a 7 y una baja fuerza iónica ($I=0.1$ M), la cápside se hincha cerca del 10%, y regresa al estado nativo cuando se reduce el pH a 5. El ensamble de la cápside no es dependiente de una secuencia específica de ARN, y es posible reensamblar las proteínas de cubierta para formar VLPs vacías *in vitro*. Aunque las VLPs vacías se pueden formar *in vitro*, estas pueden formar diferentes estructuras que sus contrapartes que contienen ARN y podrían no exhibir el mismo comportamiento de expansión [88].

Una de las aplicaciones más recientes es el uso de la cápside del virus CCMV para la encapsidación de nanotransportadores. El diseño de nanotransportadores, en este caso, se basa en el desarrollo de nanoestructuras con características similares a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) las cuales se propone utilizar para la entrega del fármaco hidrófobo Camptotecina (CPT) en células cancerosas, después del

desarrollo de estos nanotransportadores se dieron cuenta de que el tamaño cambiaba con respecto al tiempo y es aquí donde se hizo la aplicación de la cápside viral CCMV para evitar que estas estructuras aumentaran de tamaño y de esta forma fueran más estables por más tiempo [89].

Por otra parte, se ha hecho uso del virus del frijol moteado clorótico del caupí (CCMV) el cual se demostró que al encapsidar nanopartículas de diferentes tamaños dentro de él, este tenía una alta o baja eficiencia, por ejemplo al introducir nanopartículas de oro (AuNP) de 7 nm de diámetro al interior de la cápside del CCMV este era muy estable, cuando el tamaño de la partícula se aumentó a 12 nm se dieron cuenta que la eficiencia disminuía, pero cuando se utilizaron AuNP de un tamaño promedio a 17 nm la eficiencia de este sistema aumentaba a pH neutro [90].

1.4.1 Proteína viral para encapsidar fármacos

Estos sistemas suelen constar de varios cientos de moléculas de proteína, que se auto ensamblan para formar una capsula o cápside que empaqueta el ácido nucleico viral, contiene una estructura dinámica ya que sufre un hinchamiento reversible dependiente a cambios de pH y de fuerza iónica, lo que resulta en la formación de aberturas de la cápside, con diámetros de aproximadamente 2 nm en los vértices, esto permite la entrega del genoma viral a la maquinaria celular para su replicación. Sin embargo, cuando la fuerza iónica es muy alta, 1 M, la cápside se desensambla y podemos separar las proteínas de la cápside del genoma viral, de tal manera que la proteína de la cápside la podemos utilizar para encapsidar especies funcionales, como genes, medicamentos, etc. Dado que la superficie interna tiene una alta densidad de carga positiva debido a la presencia de residuos de arginina y lisina al extremo amino terminal de cada una de las unidades monoméricas de las proteínas, la cápside proteica del CCMV es especialmente útil para la encapsulación de especies cargadas negativamente [87].

Se ha demostrado ampliamente que los cambios en la temperatura, la fuerza iónica y el pH tienden a alterar la morfología y estabilidad de la proteína del CCMV. Resulta importante conocer estos factores, puesto que cualquiera de ellos que modifique la interacción de la proteína con su entorno puede disminuir su estabilidad y provocar su precipitación. La agregación molecular resulta en un efecto irreversible que ocasiona pérdida de actividad biológica de la proteína y puede ser consecuencia de la neutralización de cargas eléctricas repulsivas, la desaparición total o parcial de los puentes de hidrógeno.

En la Figura 13 se muestran las condiciones ideales para la creación de una cápside proteica sin la presencia del RNA viral, en él también podemos observar cápsides multicapas cercanos al pH 4 y fuerza iónica de 0 - 0.1. En un pH de 5 a 7 y F.I. muy baja hasta aproximadamente 0.01, comienza la aparición de tubos. Es muy importante mencionar que dicho estudio fue realizado con el uso exclusivo de sales monovalentes, siendo el NaCl la sal principalmente utilizada. Es conocido que en un pH menor a 5.0 y una fuerza iónica baja la proteína pasa de un estado estable a un estado aumentado por la expansión radial de la cápside del virión alrededor de los ejes tripolares dando como resultado esferas multicapas, lo que sucede al remover los iones Ca^{2+} , encargados de la unión de la cápside en estos ejes [91].

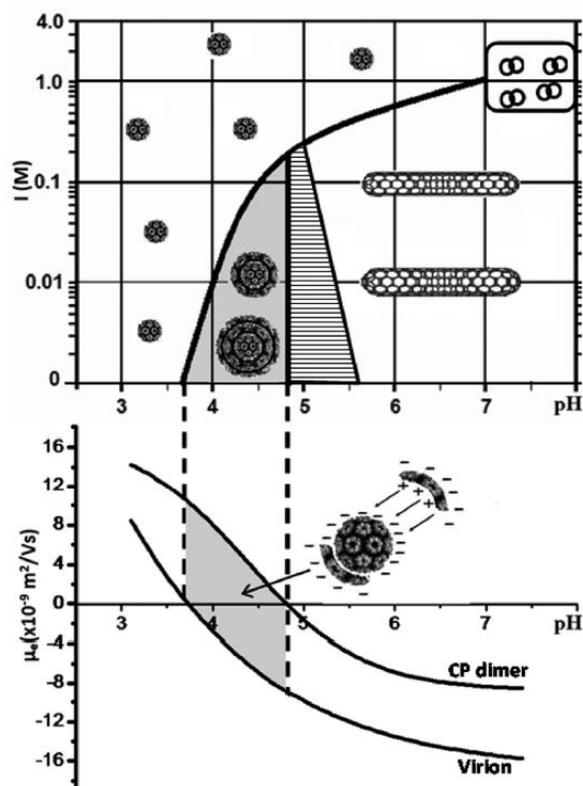


Figura 13. Diagrama de fases del ensamble de proteínas como función del pH y la fuerza iónica [91].

Esta transición puede ser revertida si el pH disminuye a un pH menor a 3.8 o si las concentraciones de Ca^{2+} o sales divalentes como MgCl_2 se aumentan. Estos mecanismos de aumento radial controlados por el pH y la concentración de iones metálicos son considerados como un mecanismo de liberación del ARN durante la infección viral y concierne a muchos otros tipos de virus en plantas [92].

1. JUSTIFICACION

En la actualidad la tasa de mortalidad a causa del cáncer va en aumento debido a los malos hábitos que tiende a tener la sociedad y a que el tratamiento de esta enfermedad es muy tóxico para las personas, ya que los fármacos desarrollados y utilizados no distinguen entre las células sanas y las células cancerosas por lo que atacan a ambas por igual. Debido a esto es necesario desarrollar sistemas a escala nanométrica que sean selectivos en la entrega de los diferentes fármacos utilizados para las terapias.

2. HIPOTESIS

Las cápsides virales del CCMV pueden ser utilizadas como nanovehículos transportadores para la entrega de fármacos anticancerígenos hidrofóbicos.

3. OBJETIVO

4.1 Objetivo general

- Diseñar un nanovehículo de fármacos hidrofóbicos a partir de la cápside viral del CCMV.

4.2 Objetivos específicos

- Purificar y obtener la proteína de la cápside viral del CCMV.
- Desarrollar una metodología para la obtención de una partícula la cual consista en cápside viral CCMV en combinación con el fármaco hidrófobo Camptotecina.
- Desarrollar una metodología para la obtención de una partícula la cual consista en cápside viral CCMV en combinación con el fármaco hidrófobo Paclitaxel.
- Caracterizar las partículas obtenidas mediante DLS, UV-Vis (Nanodrop) y Espectrofluorimetría.

4. Material y métodos

5.1 Producción de CCMV

Para realizar la producción se realizaron una serie de pasos, los cuales iniciaron desde la siembra de la semilla para obtener las plantas en las cuales se replica el virus del CCMV.

5.1.1 Siembra de frijol california black eye no. 5

Se sacó la capa externa de tierra que conservan las macetas donde se realizó un cultivo previo de plantas, fue necesario aflojar toda la tierra de las macetas para que hubiera un mejor crecimiento de las especies ya que de esta forma pueden desarrollar las raíces sin tanta dificultad. Una vez realizado lo anterior se procedió a humedecer muy bien la tierra para posteriormente comenzar a acomodar los frijoles de tal forma que quedara una distribución de 20 por maceta grande y 5 en las macetas más pequeñas, estos se enterraron a aproximadamente 1 cm de profundidad y se tapan con tierra. Ya que estuvieron las macetas con los respectivos frijoles se procedió a acomodarlas en un cuarto de cultivo en donde se encontraban unas lámparas las cuales están programadas a un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad siendo regadas cada tercer día agregando únicamente la cantidad de agua necesaria para humedecer la tierra ya que de esta forma se evitaría que la planta se pudriera por exceso de agua.



Figura 14. Macetas con las semillas del frijol Black Eye distribuidas de forma uniforme.

5.1.2 Inoculación del virus CCMV en plantas de frijol california black eye no.5

Una vez que las plantas crecieron, después de aproximadamente 7 días o cuando tengan 15 cm de alto y antes de que aparezca el segundo brote, se realiza la inoculación con una micropipeta, se colocaron 20 μ l de buffer de inoculación (apéndice I) en aproximadamente 5 gotas repartidas en toda la superficie de la hoja, con un solo dedo se esparce el buffer y se desliza suavemente a lo largo de la hoja. A continuación, las macetas se riegan y se cultivan en el cuarto de cultivo, con una atmosfera de 25° - 30° C y con ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.



Figura 15. Proceso de infección de las hojas de la planta con virus CCMV.

5.1.3 Cosecha de hojas de frijol california black eye no.5 infectadas con virus CCMV

La infección en las hojas se observó después de 3 semanas de la inoculación, caracterizada por el color amarillento o clorosis. Se procedió a la cosecha de las hojas con síntomas de la infección bajo su observación con una lámpara. Aquellas hojas con clorosis fueron cortadas, pesadas y guardadas a -20 °C para su molienda posterior.



Figura 16. A) Síntomas de infección presentes en las hojas de la planta (clorosis), B) hojas de la planta sin infección

5.2 Purificación del virión de CCMV

La metodología de extracción utilizada en este proyecto consiste en una modificación del protocolo desarrollado para la purificación de CCMV [93]. A continuación, se describe el protocolo.

5.2.1 Molienda de las hojas

Después de 24 horas en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, se sacaron las hojas y se dejaron en el refrigerador a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un tiempo aproximado de 30 minutos. Se pesan 300 g de hojas y se molieron en la licuadora en 3 partes (100 g por cada una) con buffer de extracción (apéndice I) el cual se mezcló con mercaptoetanol en proporción de 100:1, se usó de esta solución para moler las hojas en cantidades proporcionales de peso-volumen. En la campana de extracción se molieron con mortero y pistilo agregándole arena de mar hasta que ya no se escuchaba que tronaba la arena. Se hizo una cama de gasas (8 aproximadamente) con las que se filtró la solución recién molida, se agregó

el mismo volumen de cloroformo a la solución recién filtrada y se dejó agitando de 30 a 60 min en una campana de extracción.



Figura 17. Hojas de frijol black eye infectadas con virus CCMV molidas.

5.2.2 Separación de componentes celulares

Una vez que transcurrió el tiempo de agitación la solución se pasó a tubos de teflón con tapa, ya que estos soportan bien el cloroformo y se contrapesaron. Se centrifugaron en la centrifuga de mesa Heraus por 17 minutos a 1200 g y 4 °C; se hicieron las corridas necesarias para centrifugar toda la solución obtenida. Una vez que se sacaron de la centrifuga se distinguían claramente dos fases, el sobrenadante amarillo ocre y el pellet, un líquido color verde oscuro el cual se desechó y se tomó el sobrenadante amarillo ocre con una micropipeta ladeando un poco el tubo y se colocó en un vaso de precipitado, todo el líquido obtenido se dejó en agitación durante 18 h aproximadamente. Ya que transcurrió el tiempo, con este líquido se llenaron tubos de poli halógeno con 23 ml.



Figura 18. Sobrenadante con el residuo que se obtiene después de centrifugar.

5.2.3 Colchón de sacarosa

Con una aguja de caballo sin punta se colocó un colchón de sacarosa, 5 ml de sacarosa al 10% en el fondo del tubo lentamente, ya que debían de quedar bien diferenciadas ambas soluciones (2 cm aproximadamente). Se contrapesaron agregando más sobrenadante, en caso de que hiciera falta, y se colocaron en las camisas del rotor SW-32 Ti, asegurando que quedaran bien tapados, y se centrifugaron a 280000 rpm a 4 °C durante 138 min en la ultracentrífuga Beckman. Una vez transcurrido el tiempo de la ultracentrífuga se sacaron rápidamente los tubos de las camisas y se desechó el sobrenadante ya que se resuspendía fácilmente. Se agregó un poco de buffer de suspensión para que fuese más fácil su extracción de los tubos; el virus está en el pellet por lo que se sacó todo el pellet sin diluirlo mucho.



Figura 19. Colchón de sacarosa con el sobrenadante antes de la centrifugación (se tiene que ver una mezcla heterogénea).

5.2.4 Obtención de partículas virales del CCMV.

En tubos ultra claros, para centrifugar, se agregaron 30 ml de gradiente de sacarosa, se contrapesaron, se taparon con Parafilm y se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por una hora, una vez transcurrido este tiempo, se dejaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ cuidando de no moverlos para no perturbar el gradiente por 8 horas. Se sacaron los tubos con el gradiente, con mucho cuidado se agregó un máximo de 1 ml de buffer de suspensión a cada uno por la orilla del tubo sin tocar el gradiente, se contrapesaron y se metieron al rotor SW-32 Ti para centrifugarlos por 78 min a 28000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la ultracentrífuga Beckman. Una vez que se termina de centrifugar se tomaron los tubos y en un cuarto oscuro se colocaron uno por uno en un soporte universal con una lámpara de luz blanca apuntando hacia el tubo. Se debía observar una franja azul como a $\frac{3}{4}$ de altura del tubo que corresponde al CCMV, la cual se tomó con mucho cuidado con una pipeta Pasteur o con una micropipeta, se juntaron todas las soluciones azules en un tubo.

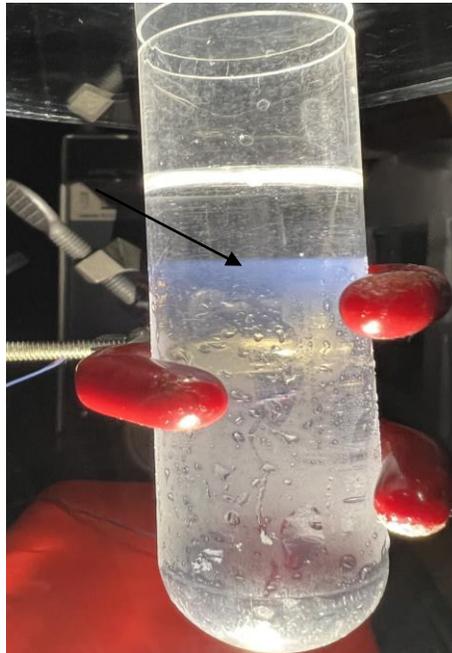


Figura 20. Gradiente de sacarosa al 25% con virus el cual se encuentra en la franja azul vista desde la parte inferior con luz blanca

5.2.5 Precipitación de partículas virales del CCMV

Esta solución se colocó en tubos para el rotor TLA-110Ti con un máximo de 3 ml y se contrapesaron, se centrifugaron a 60000 rpm por 100 min a 4 °C en la centrifuga de mesa Heraeus. Cuando se sacaron de la centrifuga se desechó el sobrenadante, donde inmediatamente quedo una mancha café en el fondo del tubo, y se agregaron 100 µl de buffer de suspensión a cada uno y se agitaron manualmente hasta que se disolvió. Se juntaron todos los pellets disueltos y se agregó un volumen igual al que teníamos de buffer de suspensión para diluirlo. Se midió la concentración en el Nanodrop; en el programa de proteína asegurándose que la solución este perfectamente homogeneizada, y se usó como blanco el buffer de suspensión. Se obtuvo la curva del virión en el Nanodrop, se calculó la pureza por medio de la relación de los valores a las longitudes de onda: A_{260}/A_{280} . Se calculó la concentración del virión = $A_{260}/5.8 = \text{mg}/\mu\text{l}$, se hicieron las alícuotas de 1 mg/µl usando la ecuación

$$V1 = (V2 C2) / C1$$

Donde:

- V1 es el volumen que se debe agregar por vial para obtener la concentración deseada.
- C1 es la concentración obtenida mediante el espectro UV.
- V2 es el volumen al que se debe llevar la solución.
- C2 es la concentración final que debe tener la solución.

en viales de 1 ml. Se guardaron los viales a -80 °C en el ultracongelador.



Figura 21. Pellet que se obtiene en el que se encuentra el virus ya purificado.

5.2.6 Purificación de la proteína.

Para la obtención de la proteína se necesita desensamblar el virión, y así lograr la liberación del RNA para su posterior separación, por lo cual se realizó una diálisis con una membrana con un tamaño de poro que oscila entre 8000 a 12000 Da ya que la proteína tiene un peso molecular de 19500 Da. Este proceso se realizó en buffer de desensamble (apéndice I) con un pH igual a 7.5 por 24 horas a 4 °C, el buffer hace que los viriones se hinchen hasta el desensamble provocando la liberación del RNA, este se precipitará debido a los iones de calcio. En seguida se retiró la proteína de la membrana de diálisis y se colocaron en tubos ultra claros para ser centrifugados en un rotor de ángulo fijo (TLA-110Ti) previamente enfriado (es muy importante siempre enfriar el rotor con 2 horas de anticipación a su uso). Se usó la ultracentrífuga de mesa (Beckman Coulter Optima MAX-XP) a 100,000 rpm por 126 minutos. Al finalizar la centrifugación, la proteína se retiró rápidamente y se separó en fracciones de 200 µl en diferentes tubos. Se midió la concentración y pureza de cada una de las fracciones mediante un espectrofotómetro, solo se conservaron las que contaban con una pureza mínima de 99.5 % de proteína sobre ácido nucleico.

Para obtener la concentración de proteína obtenida se usa la siguiente ecuación:

$$C = (1197.7 \times A_{280}) - 24.032$$

La proteína seleccionada se colocó en diálisis en 1 L de buffer de proteína (apéndice I) con una membrana de 1200 Da por 12 horas a 4 °C, este buffer sirve para darle estabilidad a los dímeros formados por la proteína. Cuando se finaliza el tiempo se retiró la diálisis, se midió la concentración y pureza de la proteína, y se almacenó a 4 °C.

5.3 Encapsidación de fármacos.

Los fármacos fueron disueltos en un agente lipofílico, 5 mg de cada fármaco se disolvieron en 1 ml de dimetilsulfóxido quedando una concentración de 14.35 mM y 5.85 mM, Camptotecina y Paclitaxel, respectivamente; a partir de estas concentraciones iniciales se realizaron dos diluciones en ambos fármacos, la primera 1:1000 que consistió en tomar 1 ml del fármaco y se agregó 999 μ l de buffer de ensamble para obtener una solución 14.35 μ M, posteriormente la solución anterior se volvió a diluir 1:1000 para obtener una concentración final de 14.35 nM para la Camptotecina. En el caso del Paclitaxel se realizó lo mismo quedando la primera dilución a una concentración de 5.85 μ M y la segunda de 5.85 nM.

Tabla 3. Condiciones de ensambles Camptotecina-proteína.

Ensamble VLP-Fármaco	[Proteína:Fármaco] (μ g)(μ g)	Fármaco			Proteína				
		Stock mM	Vol. Agregado (μ l)	Conc. Final (μ g)	Concentracion (μ g/ μ l)	Stock (μ g/ μ l)	Conc. Final (μ g)	Vol. Agregado (μ l)	Vol. Final (μ l)
1	4.0:1.0	8.6	50	1.72	529.8	0.66225	423.84	200	250
2	2.0:1.0	8.6	100	2.80	529.8	0.66225	353.20	200	300
3	1.3:1.0	8.6	150	3.68	529.8	0.66225	302.74	200	350
4	1.0:1.0	8.6	200	4.30	529.8	0.66225	264.90	200	400

El primer ensayo consistió en una modificación de la concentración del fármaco manteniendo la concentración de la proteína constante, a una temperatura de 4 °C para evitar su desnaturalización y con un tiempo de agitación constante (500 rpm, 120 min).

Durante la segunda prueba, fue analizada una curva de concentraciones del fármaco, manteniendo constante la concentración de la proteína en un volumen de 1 ml con la finalidad de al mismo tiempo determinar cuáles serían los límites en los cuales el fármaco causa muerte celular.

Posteriormente se cambiaron las condiciones de los ensambles para la curva de Camptotecina encapsidada como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de ensamble 2 Camptotecina-proteína.

Ensamble VLP-Fármaco	Fármaco			Proteína			Vol. Final (µl)
	Concentración nM	Stock	Vol. Agregado (µl)	Concentración (µg/µl)	Stock (µg/µl)	Vol. Agregado (µl)	
1	0.5	14.35 nM	34.8	9.6	0.0418	200	1000
2	1	14.35 nM	69.7	33	0.166	200	1000
3	5	14.35 nM	348	33	0.166	200	1000
4	10	14.35 nM	696.8	33	0.166	200	1000
5	20	14.35 µM	1.39	33	0.166	200	1000

Finalmente, se trabajó en la modificación de las relaciones 6:1 proteína:fármaco, como las mostradas en la Tabla 5. Los ensambles fueron llevados a cabo mediante el método de microdiálisis en 50 µl como volumen final.

Tabla 5. Condiciones de ensamble 3 Camptotecina-proteína.

Ensamble VLP-Fármaco	Relacion Proteína:Fármaco (µg)	Fármaco 14.35 (µg/µl)	Proteína 1.77 (µg/µl)	Buffer de Ensamble	Volumen final (µl)
		Volumen (µl)	Volumen (µl)	Volumen (µl)	
1	06:01	0.4	3.3	46.3	50
2	09:01	0.4	5	44.6	50
3	18:01	0.4	10	39.6	50

Las condiciones de ensamble fueron, durante 12 horas en un buffer de ensamble pH = 7.2, una vez pasadas las 12 horas los ensambles se metieron en un buffer de suspensión a pH = 4.5 durante otras 12 horas y finalmente después de ese tiempo, se regresaron al buffer de ensamble para dejar los ensambles por 4 horas más.

En el caso del fármaco Paclitaxel, los ensambles se realizaron utilizando las mismas relaciones mostradas en la Tabla 5. Llevando a un volumen final de 50 μl con buffer de ensamble.

Tabla 6. Volumen de fármaco-proteína agregado por ensamble para el fármaco Paclitaxel.

		Fármaco 5.85 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Proteína 1.77 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Buffer de Ensamble	
Ensamble VLP- Fármaco	Relacion Proteína:Fármaco (μg)	Volumen (μl)	Volumen (μl)	Volumen (μl)	Volumen final (μl)
1	06:01	0.4	3.3	46.3	50
2	09:01	0.4	5	44.6	50
3	18:01	0.4	10	39.6	50

5.10 Ultravioleta (UV-VIS, NANODROP)

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar el pico máximo de absorbancia y con este la concentración de un compuesto en solución. Las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal con la concentración. La medición se lleva a cabo mediante un espectrofotómetro UV-Vis, donde se selecciona la longitud de onda de la luz que pasa por la solución y mide la cantidad de luz absorbida por la misma.

Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que la técnica es usada para la determinación y caracterización de biomoléculas. Cada biomolécula tiene un espectro de absorción característico a una determinada longitud de onda.

En espectroscopia el termino luz no solo se aplica a la forma visible de radiación electromagnética, sino también a las formas UV e IR (infrarrojo), que no son visibles al ojo humano. En espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta (UV de 195-400 nm), el visible (400-780 nm) y el IR (780-1200 nm) [96].

La transmitancia (T) se define como el cociente entre la cantidad de la luz que emerge de una celda transparente que contiene una solución absorbente y la intensidad de la luz que incide sobre la misma. Una porción de la luz que incide sobre la celda será absorbida y otra porción es transmitida.

Para la realización de estas mediciones se tomó una alícuota de 2 μ l para determinar la concentración del virión en solución. El equipo arroja la concentración y la relación de pureza automáticamente y se ajusta a una final de 1 mg/ml.

5.11 Dispersión de luz dinámica.

La dispersión de luz dinámica (DLS), conocida también como espectroscopia de la correlación de fotones o dispersión de luz cuasi-elastica, es una técnica en la física que puede ser usada para determinar el perfil de distribución del tamaño de pequeñas partículas en suspensión o de macromoléculas en solución tales como, micro- y nanopartículas, proteínas o polímeros [97].

La técnica consiste en una fuente de luz láser monocromática que incide sobre numerosas partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas direcciones posibles (dispersión de Rayleigh), siempre y cuando las partículas sean pequeñas en el orden de tamaños de 10 μ m a 1 nm. Al momento de separarse a una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada. Como consecuencia del movimiento browniano, las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, cosa que

también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. Si las partículas se mueven rápidamente (partículas de diámetro pequeño), también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas lentas (partículas de diámetro grande) llevan a variaciones más lentas. Por regla general, en la dispersión de luz dinámica la suspensión de la muestra permanece en reposo. El término “dinámica” no se refiere al término de la muestra como un conjunto, sino a la “vibración” de las partículas que la componen [98].

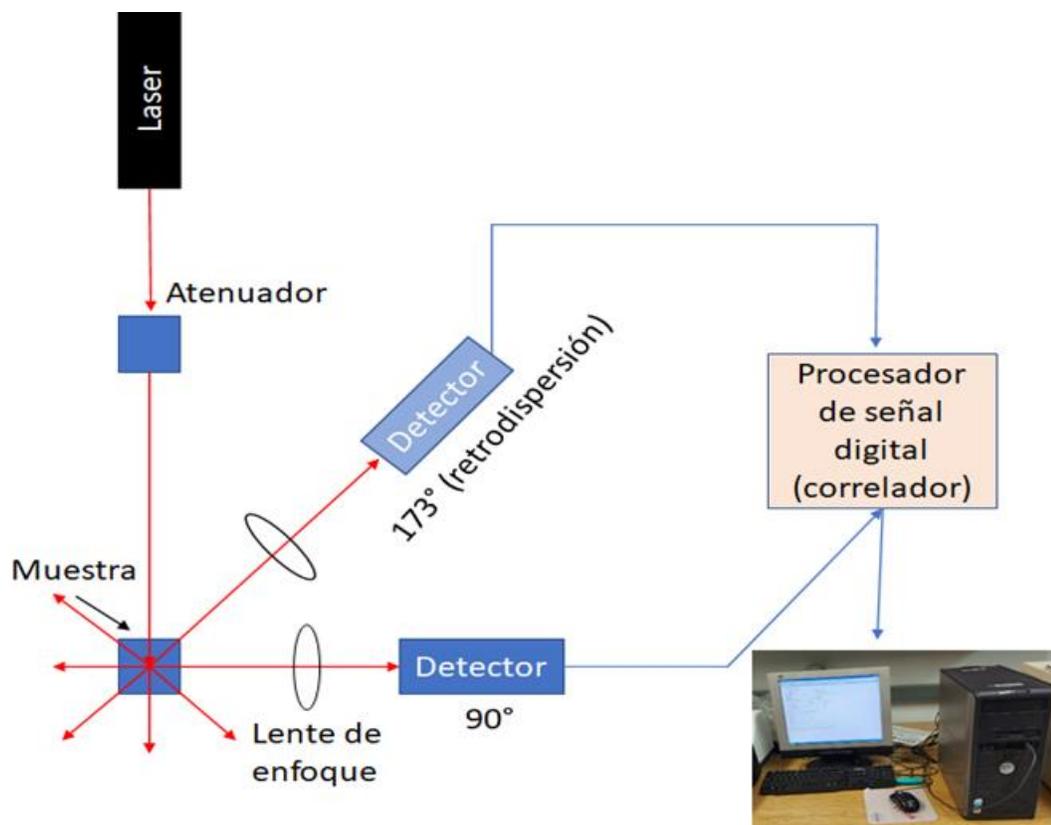


Figura 22. Esquema de las partes que incluye el DLS [97].

Actualmente, el método más rápido y popular para determinar el tamaño de partícula es la espectroscopía de correlación de fotones (PCS) o la dispersión de luz dinámica (DLS). DLS es ampliamente utilizada para determinar el tamaño de las

nanopartículas brownianas en suspensiones coloidales en los rangos nano y micrométricos. La luz monocromática brillante (láser) sobre una solución de partículas en el movimiento browniano provoca un desplazamiento Doppler cuando la luz incide en la partícula en movimiento, cambiando la longitud de onda de la luz entrante. Este cambio está relacionado con el tamaño de la partícula. Es posible extraer la distribución de tamaños y dar una descripción del movimiento de la partícula en el medio, midiendo el coeficiente de difusión de la partícula y usando la función de autocorrelación. La espectroscopia de correlación de fotones (PCS, por sus siglas en inglés) representa la técnica más utilizada para estimar con precisión el tamaño promedio de las partículas y la distribución de tamaños basados en DLS [99].

El tamaño del virus y la cápside de la proteína viral se midieron utilizando un equipo de dispersión de luz dinámica (Zetasizer NanoZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). Lo anterior se llevó a cabo con 3 mediciones para cada muestra a 4 °C para no desnaturalizar la proteína del virus. El protocolo de las mediciones fue el siguiente: se diluyeron 50 µl de la muestra (virus) en agua ultrapura para llevar a un volumen final de 200 µl en una celda desechable (Fisherbrand semimicro de poliestireno).

La carga de los fármacos utilizados se determinó mediante potencial Z utilizando las celdas capilares plegadas DTS1070 con capacidad de 1 ml. En estas celdas se depositó 1 ml de los fármacos Camptotecina y Paclitaxel los cuales fueron diluidos en buffer de ensamble para evitar que el dimetilsulfóxido dañara la celda.

El tamaño de las cápsides virales que fueron funcionalizadas con Camptotecina y Paclitaxel se determinó por dispersión de luz dinámica, para realizar esta medición se pusieron 50 µl de la solución (proteína) y 150 µl de agua ultrapura.

5.13 Movilidad electroforética.

La movilidad electroforética se define como la velocidad de desplazamiento por unidad de campo eléctrico. La electroforesis es una metodología ampliamente estudiada y utilizada en los laboratorios de investigación ya que es utilizada para la detección de ácidos nucleicos. Estos últimos se pueden detectar tanto en geles de agarosa como de poliacrilamida. La técnica consiste en la separación de los fragmentos de DNA y RNA al estar sujetos a un campo eléctrico y que gracias a su carga pueden separarse en cualquiera de los geles antes descritos. La detección de estos se hace al incorporar un colorante a un gel de agarosa, y este se intercala entre las bases del ácido nucleico, lo cual, al exponerse a la luz UV a una cierta longitud de onda, se excitan las moléculas, y emiten fluorescencia en otra longitud de onda, pudiéndolas observar en un transluminador. Al mismo tiempo, se pueden extraer de forma selectiva los fragmentos de ADN o ARN de interés para posteriormente darles una aplicación [100].

En este trabajo, se utiliza esta metodología para comprobar la presencia de las partículas virales o partículas con el fármaco, comparadas con el virión nativo. La presencia del virus se corrobora al realizar un gel de retardación o gel de agarosa al 1 % y aplicar un voltaje de 50 V por un tiempo de 150 min en un buffer de retardación (apéndice I). Se cargan 10 μ l de la muestra en los pozos del gel y 4 μ l de glicerol para aumentar la densidad de la muestra hacia el fondo del pozo. Se logra un desplazamiento de los ácidos nucleicos gracias a su carga negativa, lo cual hace que se muevan la muestras hacia el polo positivo.

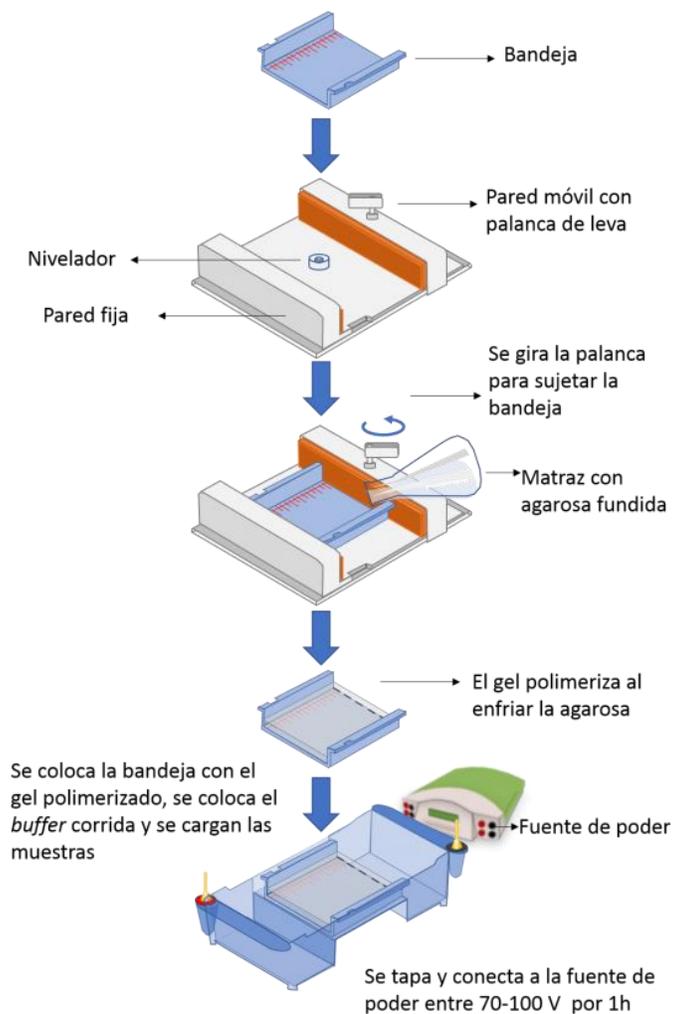


Figura 23. Componentes del equipo para realizar electroforesis de geles de agarosa [101].

Los geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) consisten en un estado estacionario, lo que significa que la fuerza impulsora (fuerza de campo eléctrico) se equilibra con la resistencia al avance (fuerza de fricción hidrodinámica) en el medio en el que se desplaza. Los geles de poliacrilamida verticales con SDS consisten en una matriz polimérica en la que el tamaño del poro depende de la concentración de la acrilamida y del grado de entrecruzamiento, así modificando la concentración de acrilamida y bisacrilamida en la preparación del gel se consiguen distintos grados de porosidad y por tanto distintos intervalos de separación de

proteínas. Estos geles se preparan en un buffer que contiene Tris-HCl, a su vez contienen persulfato amónico (APS por sus siglas en ingles) el cual acelera la solidificación del gel y contienen como catalizador TEMED (tetrametiletilendiamina) que, al igual que el APS, acelera la solidificación del gel. Los geles constan de dos tipos de geles: uno de apilamiento y uno de corrimiento, en el primero las proteínas se concentran y en el segundo se separan de acuerdo con su masa molecular, dada en kilo daltons. El SDS se utiliza para cargar negativamente las proteínas y de esta forma al aplicarles la corriente estas se desplacen al polo positivo del sistema. Las unidades de una proteína, cuatrimérica, trimérica se rompen en estructuras monoméricas, produciendo el desplazamiento hacia el lado positivo de las estructuras monoméricas de acuerdo con su tamaño y masa, generando bandas de acuerdo con el peso molecular de la proteína. En nuestro trabajo los geles fueron usados para corroborar la presencia de la proteína o de las encapsidaciones o VLP-fármaco.

El gel se sumerge en una cámara llena de buffer de corrida de proteínas y primero se le aplica una corriente de 50 V durante 10 min, una vez transcurrido este tiempo, se procede a aplicar una corriente de 250 V durante 100 min.

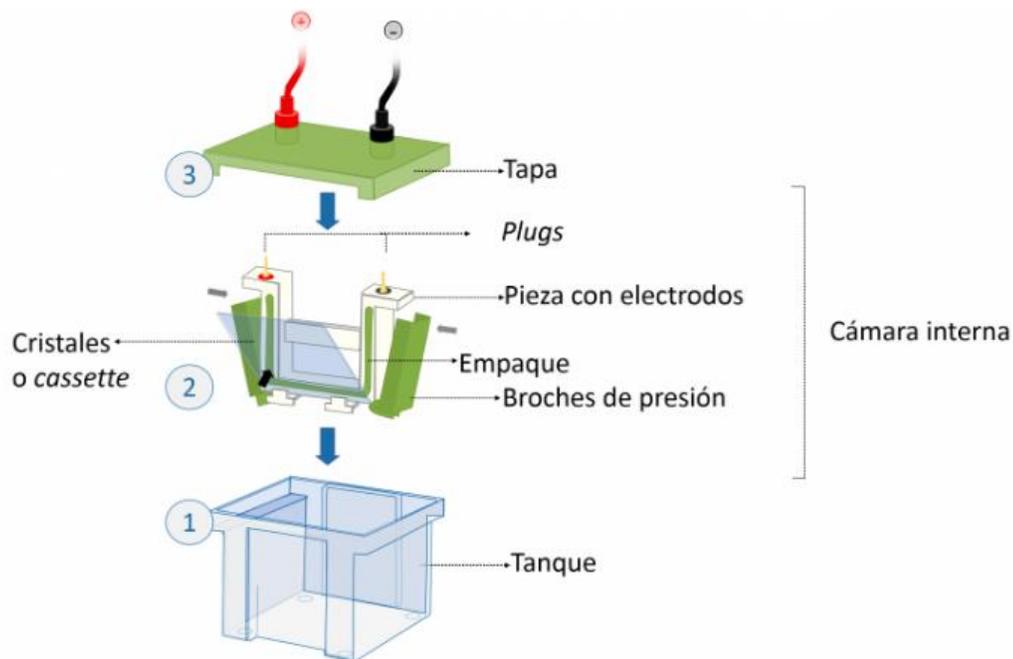


Figura 24. Cámara de electroforesis con sus partes principales [101].

5.14 Viabilidad celular

Las pruebas de viabilidad celular se realizaron en la línea celular Hep2 para determinar la toxicidad de los fármacos Camptotecina y Paclitaxel disueltos en DMSO y de la proteína viral del CCMV.

El ensayo del MTS es un ensayo colorimétrico para medir la viabilidad de células con proliferación. El método se basa en uso de una sal de tetrazolium(3-(4,5-domethiltiazol-2-yl)-5-(3-carboxymetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium y un agente reductor PMS metosulfato de penazina. El MTS es bio-reducido por las células vivas en cultivo a 490 nm en placas de 96 pozos. La transformación del MTS es llevada a cabo por enzimas deshidrogenasas presentes en la actividad metabólica de las células. La cantidad del producto de formazán medida a esa longitud de onda es directamente proporcional al número de células en cultivo.

5000 células de la línea celular Hep2 por pozo fueron expuestas con los diferentes fármacos y/o ensambles de forma individual durante 24-48 horas. Las concentraciones para analizar son mostradas en las siguientes Tablas 7 y 8. El vehículo es la solución en la cual va diluido el fármaco. Las células fueron expuestas a 50 µl de las condiciones mostradas en la Tablas.

Tabla 7. Volumen de fármaco y medio de cultivo agregado por pozo para determinar toxicidad de Camptotecina a diferentes concentraciones.

Concentración Camptotecina	Medio cultivo	Camptotecina (CPT)	Conc. Stock (CPT)	Medio cultivo	Camptotecina (CPT)
Control	50 µl/pozo	--	--	50 µl/pozo	--
Vehículo	292 µl	8 µl	Vehículo	337 µl	13 µl
1 nM	292 µl	8 µl	50 nM	337 µl	13 µl
10 nM	298.2 µl	0.8 µl	2.5 µM	349 µl	1.3 µl
50 nM	292 µl	8 µl	2.5 µM	337 µl	13 µl
100 nM	298.2 µl	0.8 µl	25 µM	349 µl	1.3 µl
500 nM	292 µl	8 µl	25 µM	337 µl	13 µl

Tabla 8. Volumen agregado de fármaco y medio de cultivo para realizar las pruebas de viabilidad celular a diferentes concentraciones.

Concentracion Paclitaxel	Medio de cultivo	Paclitaxel (PCTX)	Conc. Stock (PCTX)	Medio de cultivo	Paclitaxel (PCTX)
Control	50 µl/pozo	--	--	--	--
Vehículo	160 µl	40 µl	Vehículo	285 µl	65 µl
0.5 nM	180 µl	20 µl	10 nM	317.5 µl	32.5 µl
1 nM	160 µl	40 µl	10 nM	285 µl	65 µl
5 nM	190 µl	10 µl	200 nM	333.5 µl	16.5 µl
10 nM	180 µl	20 µl	200 nM	317.5 µl	32.5 µl
20 nM	160 µl	40 µl	200 nM	285 µl	65 µl

En pozos adicionales se agregaron volúmenes para obtener la toxicidad de la proteína del CCMV en las células, las cantidades se especifican en la Tabla 9.

Tabla 9. Volumen de proteína y medio de cultivo agregado por pozo para determinar su toxicidad.

Proteína cápside	Medio de cultivo	Proteína	Stock	Medio cultivo	Proteína
Vehículo	260 µl	40 µl	Buffer-Proteína	285 µl	65 µl
Proteína 10 µl/pozo	260 µl	40 µl	Proteína 46.63 µg/ml	285 µl	65 µl

6 Resultados

6.1 Obtención y caracterización del CCMV

Se tomó un vial de virus CCMV (concentración de 1 mg/ml) del ultracongelador para realizar la infección de las plantas de frijol black eye, una vez que se realizó la cosecha de hojas y la purificación del virus, se obtuvo un total de 8 viales con una concentración de 1 mg/ml.

6.2 Caracterización del virus mediante geles de retardación.

Una vez que se obtuvo la línea azul en el gradiente de sacarosa (25 %), se pudo determinar que se había obtenido virus de la purificación. Los geles de retardación basados en agarosa, es una metodología aplicada para comprobar la existencia del virus después de la purificación mediante un gel en agarosa al 1 % con colorante GelRed como agente intercalador para teñir los ácidos nucleicos del genoma del virus.

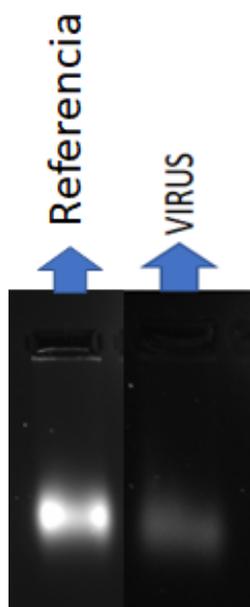


Figura 25. Gel de retardación del virus CCMV en gel de agarosa al 1% después de someterlo a una corriente de 50 V durante 150 min.

En la Figura 25 se observa el desplazamiento del virus obtenido en un gel de retardación, al comparar el desplazamiento del virus purificado (carril 2) contra el virus silvestre de referencia (carril 1) indica que el material purificado obtenido es el virus, por lo que se procede a realizar las siguientes caracterizaciones, para comprobar que lo que se ha obtenido es el virus y proceder a su desensamble.

6.2.1 Caracterización del virus CCMV por DLS

Después de realizar la caracterización de las partículas por el gel de agarosa se procedió a realizar la medición del tamaño de las partículas obtenidas mediante la técnica de Dispersión de Luz Dinámica.

Tabla 10. Porcentaje de la muestra del virus CCMV que tiene el tamaño de 28.74 nm.

Tamaño (nm)	% Volumen	Desv. Est. (d.nm)
28.74	100	6.653

En la Tabla 10 se observan los resultados obtenidos del equipo en el que podemos interpretar que el 100% en volumen de las partículas en suspensión tienen un tamaño promedio de 28.74 nm, lo cual nos indica que el virus purificado tiene este tamaño el cual coincide con la bibliografía reportada [88], en esta se reporta que regularmente el virus tiene un tamaño promedio de 26-28 nm.

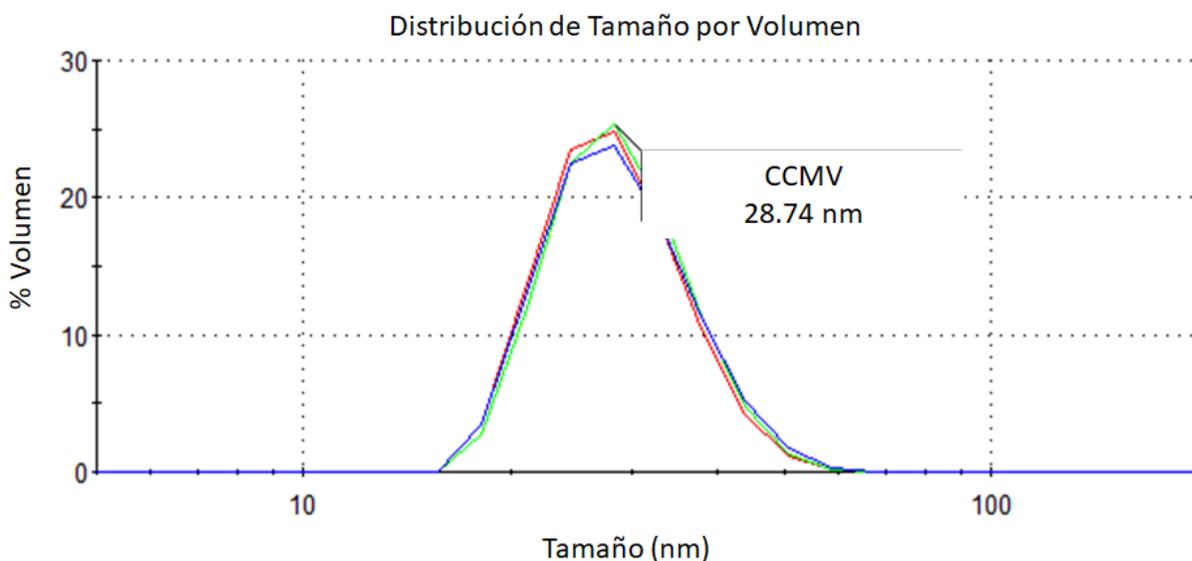


Figura 26. Diagrama de distribución del tamaño de partícula del virus CCMV obtenido por dispersión de luz dinámica, graficando el porcentaje del volumen vs el tamaño en nm.

En la Figura 26 se muestra la distribución del tamaño, existe una sola área bajo la curva lo que denota monodispersidad de las partículas virales, en una sola población.

6.2.2 Caracterización del virus CCMV por UV-Vis con adaptador NANODROP.

A continuación, se muestran los valores de la absorbancia y el espectro de emisión del virus a una absorbancia de 280 nm.

Tabla 11. Valores de la absorbancia en A280 obtenidos del virus del CCMV.

Muestra	A280	Conc. Proteína (µg/ml)	260/280
CCMV - 1	8.263	8263	1.58
CCMV - 2	6.123	6123	1.64

Después de realizar la medición en el equipo, este se utiliza para obtener la concentración de las partículas en suspensión, se multiplica el valor de A280 por el volumen final obtenido. Esto con la finalidad de ajustar la concentración para que obtener la concentración final de 1 mg/ml.

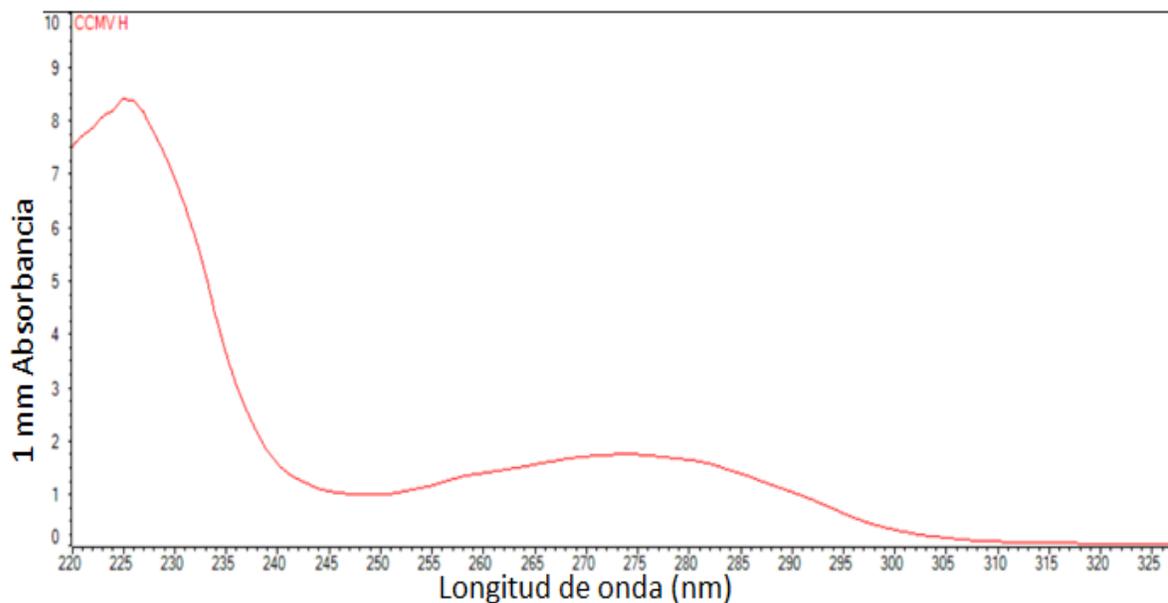


Figura 27. Espectro de absorción del virus CCMV, 1mm Absorbancia vs Longitud de onda (nm).

En la Figura 27 se observa el espectro UV-Vis del virus CCMV en el que se puede observar el pico donde absorben los ácidos nucleicos lo que nos indica que las

partículas en suspensión contienen un genoma y esto nos lleva a concluir que lo obtenido efectivamente era virus.

6.3 Caracterización de la proteína por UV-Vis.

Después de realizar el desensamble del virus, separación de proteína y genoma nativo, se continuó con la medición del espectro UV-Vis de la proteína para determinar la concentración de esta. El equipo nos da valores como los mostrados en la Tabla 12, que permitirán calcular la pureza y concentración de la proteína.

Tabla 12. Valores obtenidos del A280 y 260/280 de la proteína purificada.

Muestra	A280	Conc. Proteína (µg/ml)	260/280	Pureza
1	0.092	92	0.70	1.428
2	0.045	45	1.07	0.934
3	0.173	173	0.65	1.538
4	0.164	164	0.71	1.408
5	0.391	391	0.69	1.449
6	0.573	573	0.55	1.818
7	0.550	550	0.63	1.587

La proporción A260/A280 con un valor igual o mayor a 1.5 se consideran con una pureza adecuada de la proteína [102], por lo que estos fueron utilizados en los siguientes experimentos.

Para obtener la concentración de la proteína se aplica la siguiente formula [96]:

$$C = (1197.7 \times A280) - 24.032$$

Tabla 13. Valores obtenidos de A280 para determinar la concentración de cada fracción de la proteína.

Muestra	A280	Concentración (mg/ml)
1	0.092	86.156
2	0.045	29.865
3	0.173	183.170
4	0.164	172.391
5	0.391	444.269
6	0.573	662.250
7	0.550	634.703

El valor obtenido al aplicar esta fórmula nos indicó la concentración que se obtuvo de cada fracción para así separar y juntar las que tienen una concentración similar.

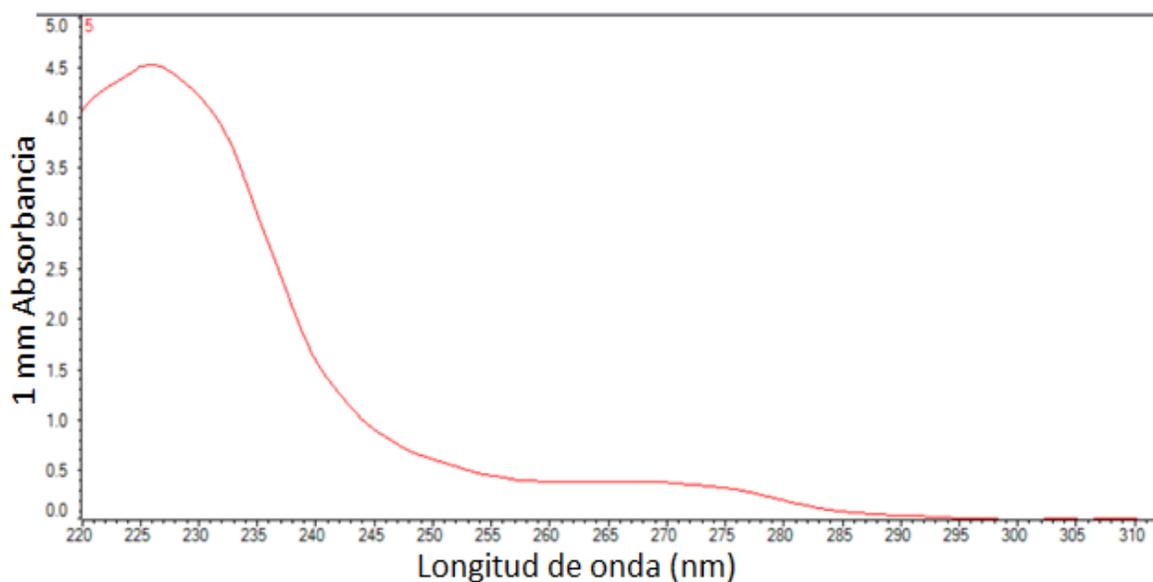


Figura 28. Espectro de absorción de la proteína del CCMV, 1 mm Absorbancia vs longitud de onda (nm).

El espectro que se muestra en la Figura 28 corresponde al espectro de absorción de la proteína, cuando se realiza el desensamble del virus con el buffer

de calcio, permite la separación del ácido nucleico y la proteína, esto debido a que la cápside se hincha y el ácido nucleico se libera, y después se precipita por medio de ultra centrifugación, al tener un peso molecular mucho mayor que la proteína, por lo que se mide en el espectro es la cantidad de proteína resultante, ya que el ácido nucleico absorbe 260 nm, y este valor es prácticamente nulo.

6.4 Caracterización por potencial Z de los fármacos Camptotecina y Paclitaxel.

Se determinó la carga que tenían ambos fármacos en diferentes condiciones de pH y en diferentes buffers. Los resultados se reportan en la Tabla 14.

Tabla 14. Carga de los fármacos determinada mediante potencial Z.

Muestra	pH	mV
BS-CPT	4.5	-40.5
BS-PTX	4.5	-19.8
BE-CPT	7.2	*
BE-PTX	7.2	*
BP-CPT	7.2	*
BP-PTX	7.2	*

Donde:

- BS-CPT = buffer de suspensión – Camptotecina
- BS-PTX = buffer de suspensión – Paclitaxel
- BE-CPT = buffer de ensamble – Camptotecina
- BE-PTC = buffer de ensamble – Paclitaxel
- BP-CPT = buffer de proteína – Camptotecina
- BP-PTX = buffer de proteína – Paclitaxel

La carga de la Camptotecina se debe a que en medios ácidos tiene un comportamiento distinto a cuando se encuentra en medios neutros o básicos. El fármaco al encontrarse en medios ácidos se abre uno de sus anillos para dar la

estructura en forma de lactona, mientras que en medios neutros el fármaco se encuentra en estabilidad, lo que nos indica que su estructura se mantiene sin modificaciones, mientras que cuando está en medio básico el anillo se abre para dar origen a la forma carboxilato.

6.5 Caracterización por UV-Vis de los fármacos Camptotecina y Paclitaxel

El efecto del pH en la solución de los fármacos es el que se observa a continuación en la Figura 29, donde los fármacos fueron expuestos a buffer de suspensión con pH = 4.5 y buffer de ensamble con pH = 7.2.

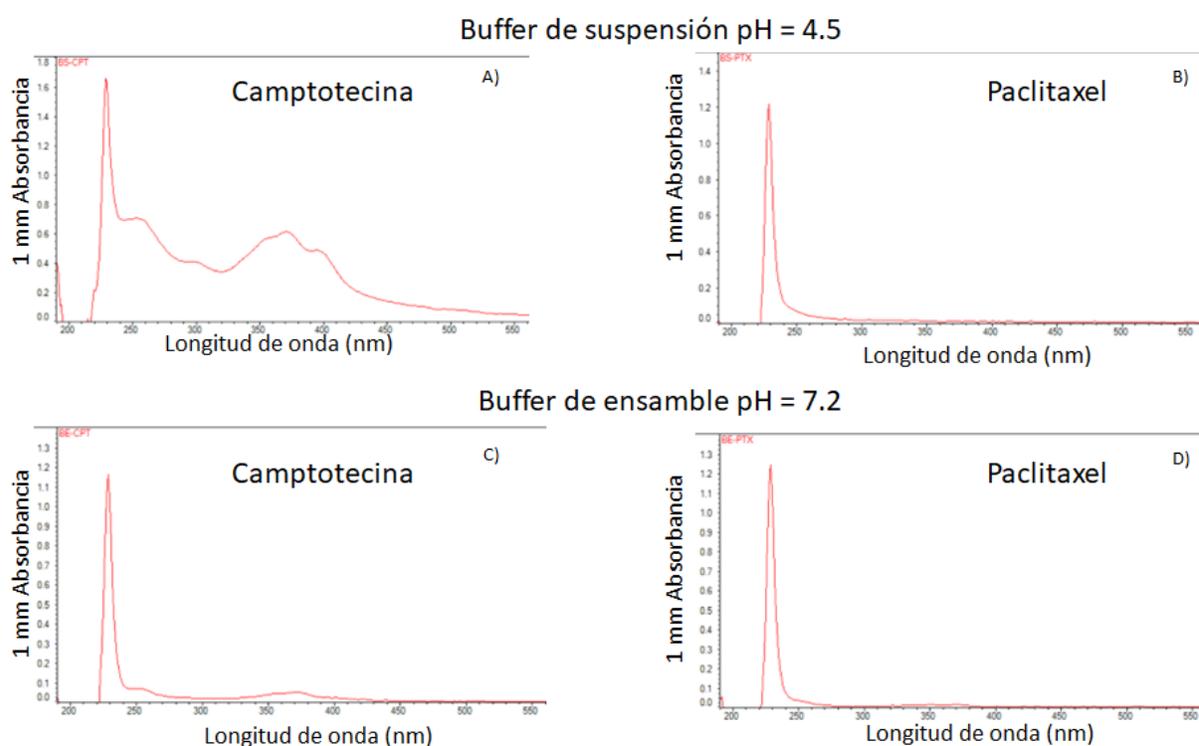


Figura 29. A) Espectro de absorción de la Camptotecina en medio ácido, B) espectro de absorción del Paclitaxel en medio ácido, C) espectro de absorción de la Camptotecina en medio neutro e D) espectro de absorción del Paclitaxel en medio neutro.

Como se observa en la Figura 29 A), esta corresponde a la Camptotecina en buffer de suspensión a pH = 4.5 y mientras que la Figura 29 C) corresponde a la

Camptotecina en buffer de ensamble a pH = 7.2. Se observa un comportamiento distinto del fármaco en medios ácidos comparándolo con un medio neutro ya que en medio neutro la Camptotecina está en su estructura estable y cuando se encuentra interactuando en un medio ácido esta adquiere su forma de lactona lo que provoca el espectro de absorción nos arroje picos diferentes en el rango de 200 a 500 nm.

Los espectros correspondientes a los incisos B) y D) representan el espectro de absorción del Paclitaxel en pH = 4.5 y 7.2 respectivamente, lo que podemos distinguir es que el fármaco no adquiere ninguna modificación en su estructura sin importar la variación en el pH, podemos argumentar esto debido a que no se observa una diferencia en el espectro de absorción de este fármaco.

6.6 Caracterización por UV-Vis de los sistemas fármaco-proteína

Una vez que pasaron los tiempos en los diferentes buffers que se metieron los sistemas se procedió a realizar la caracterización de estos mediante UV-Vis para determinar si efectivamente el fármaco se encapsidaba con la proteína del CCMV.

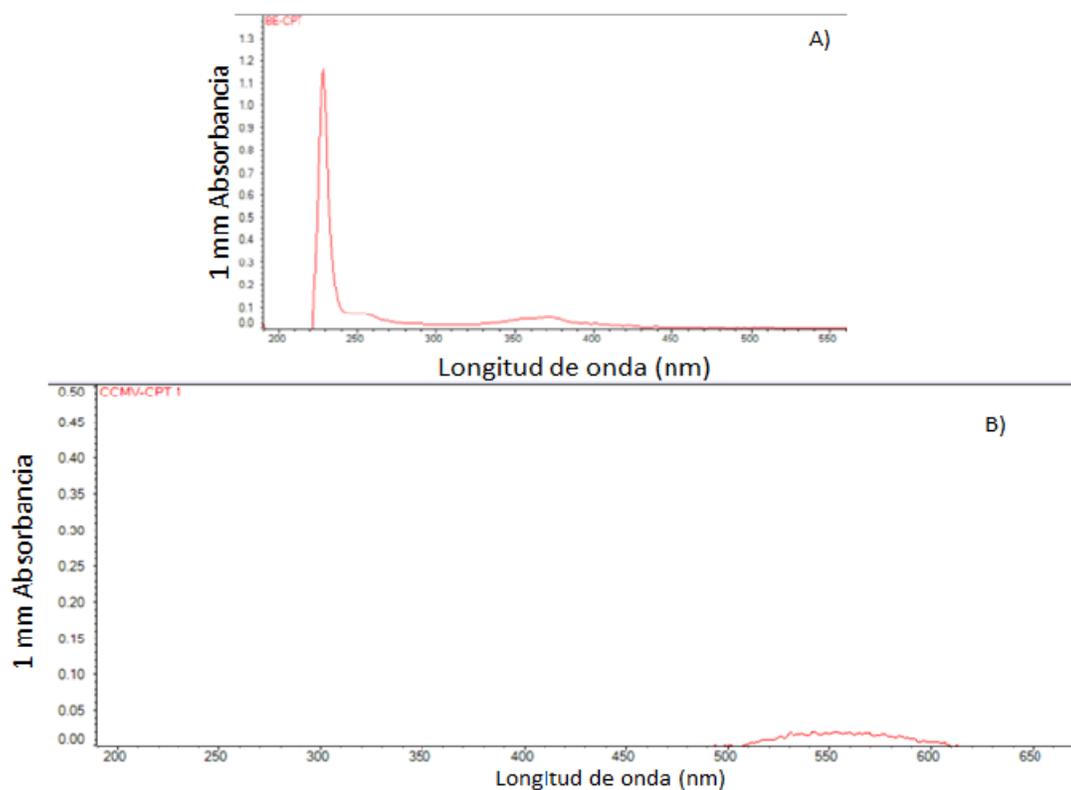


Figura 30. A) Espectro de absorbancia de la Camptotecina e B) espectro de absorbancia del sistema fármaco-proteína de la Camptotecina-CCMV.

En la Figura 30 A) tenemos el espectro de absorbancia representativo de la Camptotecina y en la Figura 30 B) tenemos el espectro obtenido del sistema Camptotecina encapsidada. Al analizar los resultados se observa que el pico de absorbancia de la Camptotecina desaparece, lo que nos lleva a pensar que efectivamente el fármaco este encapsidado. En el sistema no aparece el pico de absorbancia característico de la proteína, que es 280 nm, lo que lleva a pensar que la proteína está degradada, pero adherida al fármaco para evitar que se observe el pico de este en el espectro, o bajo estas condiciones no hay ensamble.

6.7 Caracterización por electroforesis de los sistemas fármaco-proteína

El gel de retardación en este caso, al 1 % y de poliacrilamida al 2 %, es un parámetro que permite corroborar o no, la presencia de los ensambles y de la proteína

(respectivamente). Primero se tomaron las muestras obtenidas de los ensambles trabajados con Camptotecina y la proteína del virus CCMV. Para poder determinar si los sistemas estaban encapsidados, al ser la Camptotecina y el Paclitaxel fármacos que al exponerse con el indicador Gel Red adquieren fluorescencia, se esperaba observar un desplazamiento en los pozos en los que se depositaron estos sistemas.

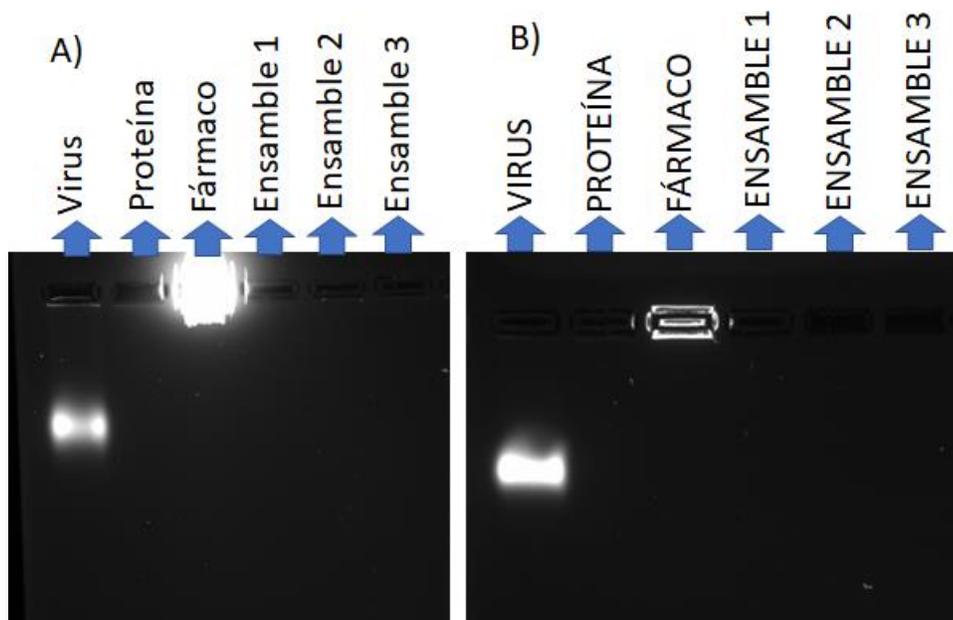


Figura 31. Gel de agarosa al 1% para la determinación de sistemas con material genético, A) Camptotecina y B) Paclitaxel.

En la Figura 31, se observa una comparación de los ensambles contra el control cargado en el carril 1, donde se encuentra el virus tipo salvaje, el cual si se observa debido a que en su interior se encuentra el material genético donde se intercala el colorante Gel Red, por lo que se puede ver en el gel. En el carril 2 (proteína), se cargó una alícuota de la proteína después de haber realizado la separación de su material genético, ya que esta nos servirá para ensamblar el fármaco. La proteína o cápside, no se puede apreciar debido a que no contiene material genético después del desensamble, ya que es el ácido nucleico que permite su visualización con el colorante en este tipo de gels. En el carril 3 se encuentra el fármaco Camptotecina y Paclitaxel

(31 A y 31B, respectivamente) los cuales, si se distinguen debido a la fluorescencia que presentan, estos no han migrado a lo largo del gel. No se observa encapsidación de los ensambles con las condiciones aquí mostradas (condiciones de la Tabla 3), ya que el fármaco si estuviera encapsidado permitiría observarse, aun si se hubiera cargado más ensamble, se desplazaría hacia abajo del gel ya que la proteína cargada negativamente se desplazaría, el tamaño de poro del gel permitiría el desplazamiento de estos sistemas por la carga de la proteína porque esta es parcialmente negativa y migraría al lado positivo del gel, pero no fue así. La composición de los ensambles fue variando de acuerdo con las Tabla 5 y Tabla 6.

Para comprobar la formación de los ensambles y la presencia de la proteína, se procedió a preparar un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12 %, el cual se detalla más abajo (Figura 32 A y 32 B). Se ha realizado un gel de poliacrilamida sin agente reductor, que separa las subunidades de proteínas, con el objeto de ver el ensamble completo, sin embargo, no se observaron los ensambles. Lo que nos indica explorar otras técnicas de geles nativos para poder ver el fármaco mediante esta metodología.

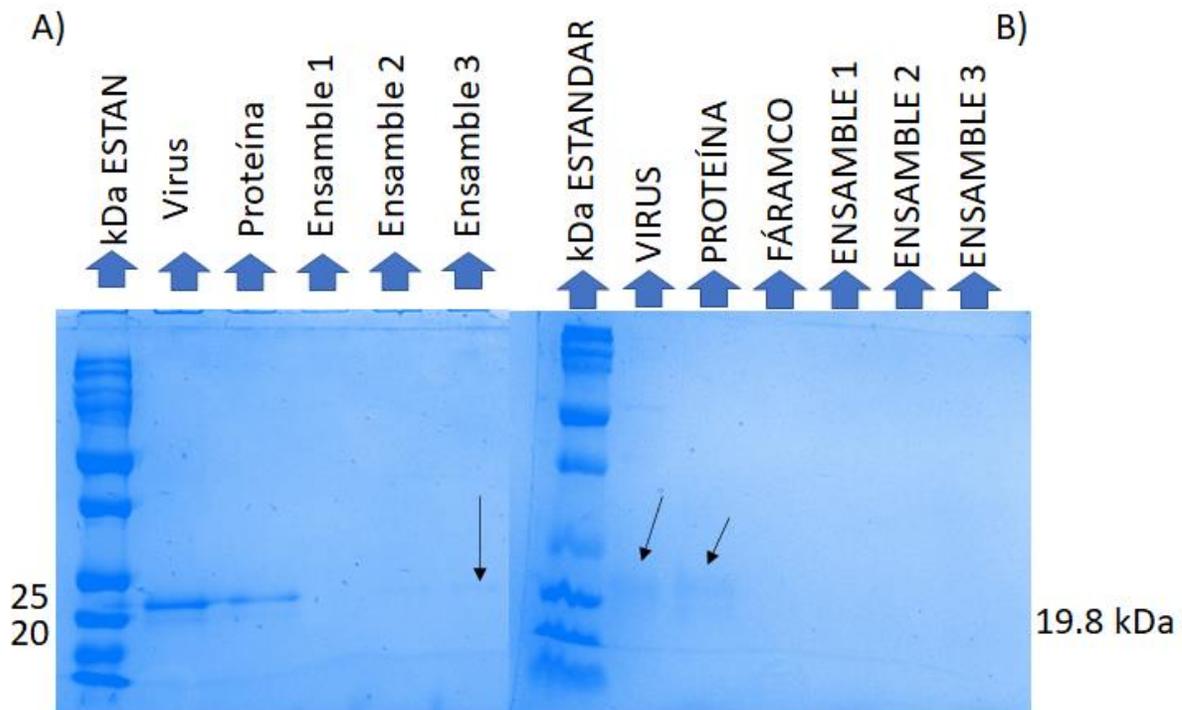


Figura 32. Gel de poliacrilamida al 12% para determinar el desplazamiento de proteínas, A) Camptotecina y B) Paclitaxel.

En la Figura 32, se comparan los resultados obtenidos en geles desnaturalizantes de acrilamida al 12% con ensambles con fármacos Camptotecina y Paclitaxel A) y B), respectivamente. En el primer carril se encuentra el control estándar de peso molecular de proteínas, 1 kDa, que se usan como referencia; en el carril 2, el virus tipo silvestre, control de la existencia de la proteína; en el carril 3, la proteína purificada del CCMV; el carril 4, corresponde a los fármacos; en carriles 5, 6 y 7, ensamble 1, ensamble 2 y ensamble 3, respectivamente, obtenidos de las condiciones mostradas en la Tabla 5.

Se realizó el análisis de los ensambles con este gel para observar si había proteína en los ensambles, el gel A), se aprecia una banda muy tenue en los carriles 5 y 6, lo que demuestra que, si hay ensambles, sin embargo, habría que concentrarlos para continuar con los experimentos de análisis en células. Adicionalmente, podemos

comprobar mediante este gel que, si había proteína en los ensambles, carril 3. El desplazamiento se observó en el rango de 20 y 25 kDa que era lo que se esperaba ya que el peso de la proteína del virus del CCMV es de 19.8 kDa, al menos en estas condiciones parece haber ensambles debido a la presencia de la proteína en dos condiciones antes mencionadas, ensamble 2 y 3.

De los resultados de los ensambles con Paclitaxel (Figura 37 B), no se observa presencia de proteína en los carriles respectivos, por lo que sería importante monitorear otras condiciones de ensamble, ya que no hay bandas de proteínas en los carriles correspondientes a estos.

6.8 Pruebas de viabilidad celular

El objetivo de estos ensayos fueron primero determinar la dosis letal del fármaco al cual esta causa muerte en las células, y una vez determinada la concentración mínima de muerte celular, entonces realizar los ensambles a esa concentración.

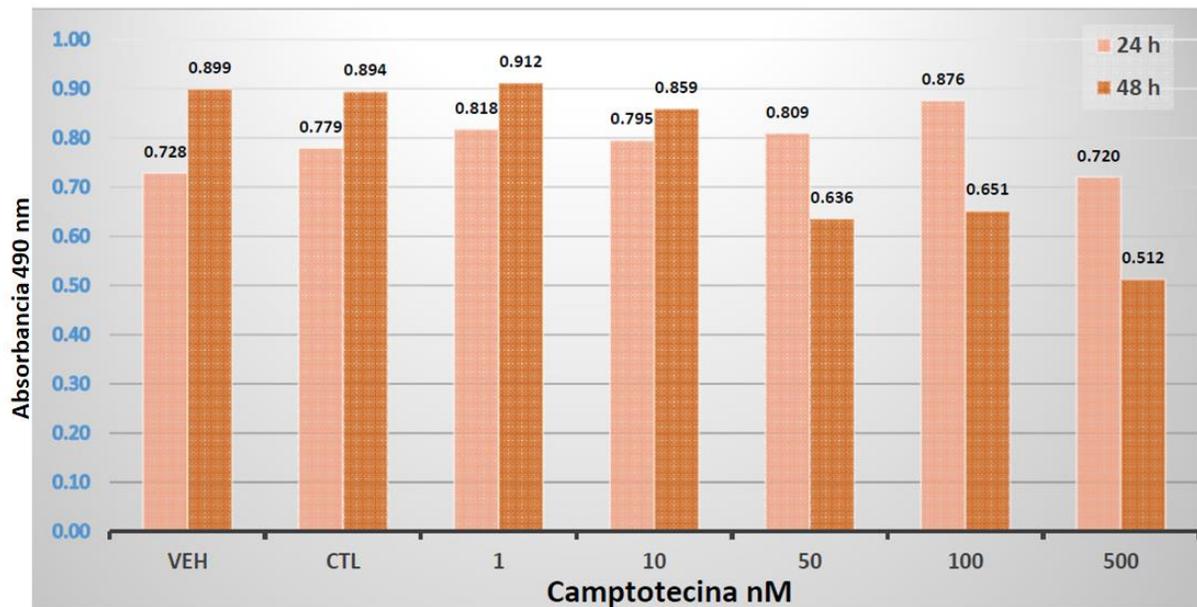


Figura 33. Estadística de la representación de la muerte celular registrada en el lapso de 24-48 horas por el fármaco Camptotecina.

En la Figura 33 se muestra que el vehículo (VEH) genera aproximadamente el 25 % de muerte celular en la curva de células tratadas con Camptotecina, sin embargo, las células se recuperan y tratan de eliminar eso extraño y a las 48 horas se observa ligeramente aumento en la viabilidad.

A partir de 50 nM de Camptotecina, las células ya no pueden activar los mecanismos de recuperación por lo que vemos que a las 48 horas ya hay menos del 35 % de las células y con un aumento hasta el 50 % a una dosis de 500 nM. El control utilizado es el fármaco cisplatino, un anticancerígeno.

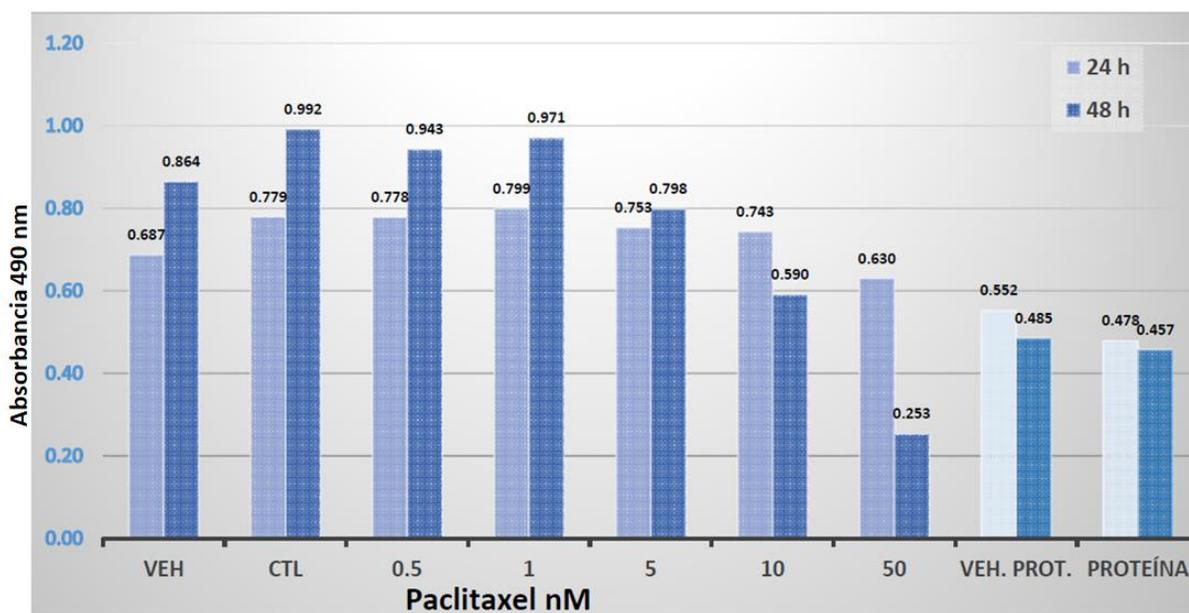


Figura 34. Estadístico con la representación de la muerte celular registrada en el lapso de 24-48 horas por el fármaco Paclitaxel y la proteína del CCMV.

En el caso del Paclitaxel, el comportamiento fue similar, las células se recuperan con bajas concentraciones, solo que la dosis a la cual hay mayor muerte celular con Paclitaxel fue a partir de 10 nM, concentración mucho menor a la Camptotecina.

Adicionalmente se muestra en la figura que el vehículo de la proteína causa muerte celular y también la proteína, más del 50 %, no parece haber recuperación celular al menos con la cantidad de vehículo y proteína que se agregaron en este cultivo celular.

7 Discusión

Durante este trabajo, los primeros ensayos de ensamble del fármaco con la proteína de la cápside del CCMV fueron basadas principalmente en la metodología realizada por el alumno Rodríguez-Tejeda [94], donde mediante agitación de los componentes interaccionan ambos fármaco:proteína, los ensayos demostraron no encapsidarse bajo estas condiciones. Así mismo, las pruebas finales fueron basados en la relación 6:1 previamente descrita por Villagrana-Escareño y col. [95] . El protocolo fue modificado colocando fármaco en lugar de material genético, no cumpliendo con esta relación 6:1, lo anterior puede deberse al tamaño del fármaco ya que si la cumple la característica de carga negativa para ser encapsidado por el CCMV.

El trabajo realizado demuestra que dependiendo de la utilidad de estos fármacos pueden usarse concentraciones mínimas como las mencionadas arriba de Paclitaxel para lograr muerte celular o máximas en el caso de la Camptotecina, sobre todo si lo que se quiere lograr es una encapsidación, valorar cuál de ellos se puede encapsidar y las dosis a utilizar para lograr el efecto antitumoral.

8 Conclusiones

Los experimentos realizados apoyaron a la obtención del virus CCMV, mediante la propagación en las plantas, las cuales, previo a la infección fueron cuidadas 6 meses para su crecimiento. Derivado de ello se pudo realizar la purificación del virus mediante gradientes de centrifugación de sacarosa. El desensamble del virus, mediante la separación de la cápside y su material genético, para posteriormente utilizar la proteína para realizar pruebas de encapsidación del fármaco. Se pudieron caracterizar tanto el virus como la proteína mediante dispersión de luz dinámica (DLS), para determinar el tamaño del virus o de la proteína obtenidos. La observación de los picos de absorción mediante espectroscopia UV-Vis. Se trabajo en la estandarización de los sistemas de encapsidación proteína:fármaco. Inconvenientes durante los ensayos fueron al realizar los ensambles, parece ser que hay una degradación de la proteína, esto es lo que arroja la caracterización en los geles de poliacrilamida, lo que no permitió continuar con el análisis por microscopia electrónica de transmisión (TEM) y más estudios en cultivo celular. Se puede considerar que la relación de fármaco proteína reportada por Cadena Nava y col. [94], no es la misma en nuestro sistema, quizá debido al tipo de fármaco. Las pruebas de viabilidad nos permitieron saber la concentración adecuada a la cual la Camptotecina y el Paclitaxel provocan muerte celular, para que en encapsidaciones futuras se puedan incluir estas concentraciones. Al mismo tiempo permitieron redirigir experimentos en relación con la concentración de la proteína que se está utilizando o la que se agregó en el ensayo, que resultó ser tóxica para las células normales Hep2. Finalmente, las relaciones fármaco:proteína usadas en este trabajo no fueron las adecuadas para el objetivo del estudio, pero si nos permitieron entender más el sistema descartando ciertas relaciones fármaco:proteína, por lo que se tendría que continuar con condiciones diferentes a las experimentadas en este estudio para perspectivas futuras.

9 REFERENCIAS

- [1] N. Taniguchi, "On the Basic Concept of Nano-Technology," *Japan Soc. Precis. Eng.*, 1974.
- [2] T. Prasad Yadav, R. Manohar Yadav, and D. Pratap Singh, "Mechanical Milling: a Top Down Approach," *Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 2, no. 3, pp. 22–48, 2012, doi: 10.5923/j.nn.20120203.01.
- [3] C. Pang *et al.*, "Bottom-up fabrication of dna-templated electronic nanomaterials and their characterization," *Nanomaterials*, vol. 11, no. 7, pp. 1–28, 2021, doi: 10.3390/nano11071655.
- [4] L. Ferreira, J. M. Karp, L. Nobre, and R. Langer, "New Opportunities: The Use of Nanotechnologies to Manipulate and Track Stem Cells," *Cell Stem Cell*, vol. 3, no. 2, pp. 136–146, 2008, doi: 10.1016/j.stem.2008.07.020.
- [5] W. Wang, D. S. Arias, M. Deserno, X. Ren, and R. E. Taylor, "Emerging applications at the interface of DNA nanotechnology and cellular membranes: Perspectives from biology, engineering, and physics," *APL Bioeng.*, vol. 4, no. 4, 2020, doi: 10.1063/5.0027022.
- [6] W. Zhao *et al.*, "Nanoscale manipulation of membrane curvature for probing endocytosis in live cells," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 12, no. 8, pp. 750–756, 2017, doi: 10.1038/nnano.2017.98.
- [7] S. Keller and A. Marx, "The use of enzymes for construction of DNA-based objects and assemblies," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 12, pp. 5690–5697, 2011, doi: 10.1039/c1cs15040e.
- [8] A. Irzhak *et al.*, "Development of laminated nanocomposites on the bases of magnetic and non-magnetic shape memory alloys: Towards new tools for nanotechnology," *J. Alloys Compd.*, vol. 586, no. SUPPL. 1, pp. S464–S468,

2014, doi: 10.1016/j.jallcom.2012.10.119.

- [9] S. Khizroev and D. Litvinov, "Focused-ion-beam-based rapid prototyping of nanoscale magnetic devices," *Nanotechnology*, vol. 15, no. 3, 2004, doi: 10.1088/0957-4484/15/3/R01.
- [10] D. G. Flagello and B. Arnold, "Optical lithography for nanotechnology," no. August 2006, p. 15, 2020, doi: 10.1117/12.683305.
- [11] J. J. Ramsden, "What is Nanotechnology?," *Appl. Nanotechnol.*, no. January, pp. 3–13, 2018, doi: 10.1016/b978-0-12-813343-9.00002-0.
- [12] C. Jianrong, M. Yuqing, H. Nongyue, W. Xiaohua, and L. Sijiao, "Nanotechnology and biosensors," *Biotechnol. Adv.*, vol. 22, no. 7, pp. 505–518, 2004, doi: 10.1016/j.biotechadv.2004.03.004.
- [13] L. Shang, S. Dong, and G. U. Nienhaus, "Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications," *Nano Today*, vol. 6, no. 4, pp. 401–418, 2011, doi: 10.1016/j.nantod.2011.06.004.
- [14] O. C. Farokhzad and R. Langer, "Impact of Nanotechnology on Hair Attributes," *ACS Nano*, vol. 3, no. 1, pp. 1–7, 2009.
- [15] S. E. McNeil, "Nanotechnology for the biologist," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 78, no. 3, pp. 585–594, 2005, doi: 10.1189/jlb.0205074.
- [16] A. Rae, "Real life applications of nanotechnology in electronics," *IPC - Electron. Circuits World Conv. Print. Circuits Expo, Apex, Des. Summit 2005, ECWC 10 Perfect Fit*, vol. 2, pp. 581–586, 2005.
- [17] J. H. Song, Y. Wu, B. Messer, H. Kind, and P. Yang, "Metal nanowire formation using Mo₃Se₃- as reducing and sacrificing templates [6]," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 42, pp. 10397–10398, 2001, doi: 10.1021/ja016818h.
- [18] K. H. Miller and M. M. A. Yajadda, "Electron transport in discontinuous gold films and the effect of Coulomb blockade and percolation," *J. Appl. Phys.*, vol. 111, no. 12, pp. 1–28, 2012, doi: 10.1063/1.4729491.

- [19] R. Kumar, A. K. Sharma, and S. S. Ahluwalia, *Advances in Environmental Biotechnology*. 2017.
- [20] A. K. Hussein, "Applications of nanotechnology in renewable energies - A comprehensive overview and understanding," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 42, pp. 460–476, 2015, doi: 10.1016/j.rser.2014.10.027.
- [21] M. Roselli, A. Finamore, I. Garaguso, M. S. Britti, and E. Mengheri, "Zinc Oxide Protects Cultured Enterocytes from the Damage Induced by Escherichia coli," *J. Nutr.*, vol. 133, no. 12, pp. 4077–4082, 2003, doi: 10.1093/jn/133.12.4077.
- [22] T. Singh, S. Shukla, P. Kumar, V. Wahla, and V. K. Bajpai, "Application of nanotechnology in food science: Perception and overview," *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. AUG, pp. 1–7, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.01501.
- [23] A. Y. Ghidan and T. M. Al Antary, *Applications of Nanotechnology in Agriculture*, no. January. 2020.
- [24] R. H. Lira Saldivar, I. Vera Reyes, and G. De los Santos Villarreal, "Agronanotecnología para sistemas modernos de producción alimentaria." .
- [25] K. PATRA, "Application of nanotechnology in textile engineering: An overview," *J. Eng. Technol. Res.*, vol. 5, no. 5, pp. 104–111, 2013, doi: 10.5897/jetr2013.0309.
- [26] A. Quintana *et al.*, "Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor," *Pharm. Res.*, vol. 19, no. 9, pp. 1310–1316, 2002, doi: 10.1023/A:1020398624602.
- [27] A. M. Morawski *et al.*, "Targeted Nanoparticles for Quantitative Imaging of Sparse Molecular Epitopes with MRI," *Magn. Reson. Med.*, vol. 51, no. 3, pp. 480–486, 2004, doi: 10.1002/mrm.20010.
- [28] B. J. Kirby, A. R. Wheeler, R. N. Zare, J. A. Fruetel, and T. J. Shepodd, "Programmable modification of cell adhesion and zeta potential in silica microchips," *Lab Chip*, vol. 3, no. 1, pp. 5–10, 2003, doi: 10.1039/b210621n.

- [29] E. B. Voura, J. K. Jaiswal, H. Mattoussi, and S. M. Simon, "Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy," *Nat. Med.*, vol. 10, no. 9, pp. 993–998, 2004, doi: 10.1038/nm1096.
- [30] W. Lian *et al.*, "Ultrasensitive detection of biomolecules with fluorescent dye-doped nanoparticles," *Anal. Biochem.*, vol. 334, no. 1, pp. 135–144, 2004, doi: 10.1016/j.ab.2004.08.005.
- [31] C. Agüero *et al.*, "Anafilaxia por medios de contraste con gadolinio," *Arch. Alerg. e Inmunol. Clin.*, vol. 41, no. 1, pp. 24–28, 2010.
- [32] F. Understandings and T. Development, "Weinberg-tumor progression," no. September, 1996, [Online]. Available: [http://www.utdallas.edu/~burr/BIO2311/Weinberg-tumor progression.pdf](http://www.utdallas.edu/~burr/BIO2311/Weinberg-tumor%20progression.pdf).
- [33] N. C. I. (NCI), "What causes genetic changes that cause cancer?," *National Cancer Institute (NCI)*. .
- [34] P. Gariglio, "Oncogenes and tumor suppressor genes," *Mol. Oncol. Princ. Recent Adv.*, pp. 64–82, 2012, doi: 10.2174/978160805016111201010064.
- [35] "CÁNCER," *National Human Genome Research Institute*. .
- [36] D. Loose and C. Van De Wiele, "The immune system and cancer," *Cancer Biother. Radiopharm.*, vol. 24, no. 3, pp. 369–376, 2009, doi: 10.1089/cbr.2008.0593.
- [37] C. de Martel, D. Georges, F. Bray, J. Ferlay, and G. M. Clifford, "Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis," *Lancet Glob. Heal.*, vol. 8, no. 2, pp. e180–e190, 2020, doi: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7.
- [38] GLOBOCAN, "The Global Cancer Observatory - All cancers," *Int. Agency Res. Cancer - WHO*, vol. 419, pp. 199–200, 2020, [Online]. Available: <https://gco.iarc.fr/today/home>.

- [39] INEGI, “Comunicado De Prensa Núm. 105/ Estadísticas a Propósito Del Día Mundial Contra El Cáncer (4 De Febrero),” *Inegi*, no. 2018, pp. 1–11, 2021, [Online]. Available: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf.
- [40] M. T. Jaklitsch, C. M. Mery, and R. A. Audisio, “Reviews The use of surgery to treat lung cancer in elderly patients,” vol. 1, no. 617.
- [41] R. Baskar, K. A. Lee, R. Yeo, and K. W. Yeoh, “Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions,” *Int. J. Med. Sci.*, vol. 9, no. 3, pp. 193–199, 2012, doi: 10.7150/ijms.3635.
- [42] J. H. Muchmore and H. J. Wanebo, “Regional Chemotherapy: Overview,” *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, vol. 17, no. 4, pp. 709–730, 2008, doi: 10.1016/j.soc.2008.04.013.
- [43] H. Borghaei, M. R. Smith, and K. S. Campbell, “Immunotherapy of cancer,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 625, no. 1–3, pp. 41–54, 2009, doi: 10.1016/j.ejphar.2009.09.067.
- [44] Y. T. Lee, Y. J. Tan, and C. E. Oon, “Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 834, pp. 188–196, 2018, doi: 10.1016/j.ejphar.2018.07.034.
- [45] M. Drăgănescu and C. Carmocan, “Review Article,” vol. 112, no. 4, pp. 413–417, 2017.
- [46] H. Therapy, “in Prostatic Cancer *.”
- [47] O. Ovayolu, N. Ovayolu, E. Kaplan, M. Pehlivan, and G. Karadag, “Symptoms and quality of life before and after stem cell transplantation in Cancer,” *Pakistan J. Med. Sci.*, vol. 29, no. 3, 2012, doi: 10.12669/pjms.293.3290.
- [48] D. F. Hayes, “Biomarker validation and testing,” *Mol. Oncol.*, vol. 9, no. 5, pp. 960–966, 2015, doi: 10.1016/j.molonc.2014.10.004.

- [49] E. Martino *et al.*, "The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 27, no. 4, pp. 701–707, 2017, doi: 10.1016/j.bmcl.2016.12.085.
- [50] K. Legarza and L. X. Yang, "New molecular mechanisms of action of camptothecin-type drugs," *Anticancer Res.*, vol. 26, no. 5 A, pp. 3301–3305, 2006.
- [51] A. G. Schultz, "Camptothecin," *Chem. Rev.*, vol. 73, no. 4, pp. 385–405, 1973, doi: 10.1021/cr60284a004.
- [52] O. Nativ *et al.*, "Anti-neoplastic activity of paclitaxel on experimental superficial bladder cancer: In vivo and in vitro studies," *Int. J. Cancer*, vol. 70, no. 3, pp. 297–301, 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19970127)70:3<297::AID-IJC9>3.0.CO;2-S.
- [53] R. D. Baird, D. S. P. Tan, and S. B. Kaye, "Weekly paclitaxel in the treatment of recurrent ovarian cancer," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 7, no. 10, pp. 575–582, 2010, doi: 10.1038/nrclinonc.2010.120.
- [54] E. A. Perez, "Paclitaxel in Breast Cancer," *Oncologist*, vol. 3, no. 6, pp. 373–389, 1998, doi: 10.1634/theoncologist.3-6-373.
- [55] K. H. Lee, E. K. Yim, C. J. Kim, S. E. Namkoong, S. J. Um, and J. S. Park, "Proteomic analysis of anti-cancer effects by paclitaxel treatment in cervical cancer cells," *Gynecol. Oncol.*, vol. 98, no. 1, pp. 45–53, 2005, doi: 10.1016/j.ygyno.2005.04.010.
- [56] W. W. Ma and M. Hidalgo, "The winning formulation: The development of paclitaxel in pancreatic cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 19, no. 20, pp. 5572–5579, 2013, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1356.
- [57] M. Aghajani *et al.*, "CD133 suppression increases the sensitivity of prostate cancer cells to paclitaxel," *Mol. Biol. Rep.*, vol. 47, no. 5, pp. 3691–3703, 2020, doi: 10.1007/s11033-020-05411-9.

- [58] D. T. Pham, N. Saelim, and W. Tiyaboonchai, "Paclitaxel loaded EDC-crosslinked fibroin nanoparticles: a potential approach for colon cancer treatment," *Drug Deliv. Transl. Res.*, vol. 10, no. 2, pp. 413–424, 2020, doi: 10.1007/s13346-019-00682-7.
- [59] K. Yamaguchi *et al.*, "Phase II study of paclitaxel with 3-h infusion in patients with advanced gastric cancer," *Gastric Cancer*, vol. 5, no. 2, pp. 90–95, 2002, doi: 10.1007/s101200200015.
- [60] M. A. Socinski, "Single-Agent Paclitaxel in the Treatment of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer," *Oncologist*, vol. 4, no. 5, pp. 408–416, 1999, doi: 10.1634/theoncologist.4-5-408.
- [61] S. Horwitz, "Taxol (paclitaxel): mechanism of action.," *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 5, no. Sppl 6:S, pp. 3–6, 1994, [Online]. Available: pmid: 7865431.
- [62] J. Szebeni, F. M. Muggia, and C. R. Alving, "Complement activation by Cremophor EL as a possible contributor to hypersensitivity to paclitaxel: An in vitro study," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 90, no. 4, pp. 300–306, 1998, doi: 10.1093/jnci/90.4.300.
- [63] W. Fan, "Possible mechanisms of paclitaxel-induced apoptosis," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 57, no. 11, pp. 1215–1221, 1999, doi: 10.1016/S0006-2952(99)00006-4.
- [64] L. Wang and G. H. Du, "Paclitaxel," *Nat. Small Mol. Drugs from Plants*, vol. 48, no. 5, pp. 537–544, 2018, doi: 10.1007/978-981-10-8022-7_89.
- [65] K. Shah, S. Gupta, J. Ghosh, J. Bajpai, and A. Maheshwari, "Acute non-ST elevation myocardial infarction following paclitaxel administration for ovarian carcinoma: A case report and review of literature," *J. Cancer Res. Ther.*, vol. 8, no. 3, pp. 442–444, 2012, doi: 10.4103/0973-1482.103530.
- [66] R. S. Finley and E. K. Rowinsky, "Patient care issues: The management of paclitaxel-related toxicities," *Ann. Pharmacother.*, vol. 28, no. 5 SUPPL., pp.

27–30, 1994, doi: 10.1177/10600280940280s507.

- [67] S. Teri, *Virus, estudio molecular con orientación clínica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2009. .
- [68] B. Curtis and S. Massirini, *Curtis Biología, Séptima ed*. Editorial Panamericana, 2009. .
- [69] “Virus,” *National Human Genome Research Institute*. .
- [70] “Survey of the Literature Pertaining,” 1963.
- [71] J. Sun *et al.*, “Core-controlled polymorphism in virus-like particles,” 2007.
- [72] L. S. López-Ibarra, “Estudio de la participación del sistema Ubiquitina-proteasoma durante del ciclo replicativo del virus Chikungunya,” Universidad El Bosque, 2021.
- [73] D. M. Lockney *et al.*, “The red clover necrotic mosaic virus capsid as a multifunctional cell targeting plant viral nanoparticle,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 22, no. 1, pp. 67–73, 2011, doi: 10.1021/bc100361z.
- [74] J. K. Pokorski and N. F. Steinmetz, “The art of engineering viral nanoparticles,” *Mol. Pharm.*, vol. 8, no. 1, pp. 29–43, 2011, doi: 10.1021/mp100225y.
- [75] A. Zeltins, “Construction and characterization of virus-like particles: A review,” *Mol. Biotechnol.*, vol. 53, no. 1, pp. 92–107, 2013, doi: 10.1007/s12033-012-9598-4.
- [76] X. Cai *et al.*, “A virus-like particle of the hepatitis B virus preS antigen elicits robust neutralizing antibodies and T cell responses in mice,” *Antiviral Res.*, vol. 149, pp. 48–57, 2018, doi: 10.1016/j.antiviral.2017.11.007.
- [77] K. Lothert *et al.*, “Development of a downstream process for the production of an inactivated whole hepatitis C virus vaccine,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–13, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-72328-5.
- [78] X. S. Chen, R. L. Garcea, I. Goldberg, G. Casini, and S. C. Harrison, “Structure

of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16,” *Mol. Cell*, vol. 5, no. 3, pp. 557–567, 2000, doi: 10.1016/S1097-2765(00)80449-9.

- [79] C. López-Macías *et al.*, “Safety and immunogenicity of a virus-like particle pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine in a blinded, randomized, placebo-controlled trial of adults in Mexico,” *Vaccine*, vol. 29, no. 44, pp. 7826–7834, 2011, doi: 10.1016/j.vaccine.2011.07.099.
- [80] A. Poddar *et al.*, “Virus-like particles derived from *Pichia pastoris*-expressed dengue virus type 1 glycoprotein elicit homotypic virus-neutralizing envelope domain III-directed antibodies,” *BMC Biotechnol.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–11, 2016, doi: 10.1186/s12896-016-0280-y.
- [81] K. L. Warfield and M. J. Aman, “Advances in virus-like particle vaccines for filoviruses,” *J. Infect. Dis.*, vol. 204, no. SUPPL. 3, pp. 1053–1059, 2011, doi: 10.1093/infdis/jir346.
- [82] B. P. Orner, “Protein Cages: Methods and Protocols,” *Protein Cages Methods Protoc.*, vol. 1252, pp. 1–188, 2014, doi: 10.1007/978-1-4939-2131-7.
- [83] L. N. Loo, R. H. Guenther, V. R. Basnayake, S. A. Lommel, and S. Franzen, “Controlled encapsidation of gold nanoparticles by a viral protein shell,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 14, pp. 4502–4503, 2006, doi: 10.1021/ja057332u.
- [84] I. Kalnciema, D. Skrastina, V. Ose, P. Pumpens, and A. Zeltins, “Potato virus y-like particles as a new carrier for the presentation of foreign protein stretches,” *Mol. Biotechnol.*, vol. 52, no. 2, pp. 129–139, 2012, doi: 10.1007/s12033-011-9480-9.
- [85] Q. Chen and H. Lai, “Plant-derived virus-like particles as vaccines,” *Hum. Vaccines Immunother.*, vol. 9, no. 1, pp. 26–49, 2013, doi: 10.4161/hv.22218.
- [86] K. B. Sutradhar and M. L. Amin, “Nanotechnology in Cancer Drug Delivery and Selective Targeting,” *ISRN Nanotechnol.*, vol. 2014, pp. 1–12, 2014, doi: 10.1155/2014/939378.

- [87] Y. Ma, R. J. M. Nolte, and J. J. L. M. Cornelissen, "Virus-based nanocarriers for drug delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 9, pp. 811–825, 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.01.005.
- [88] A. L. Durán-Meza, M. I. Escamilla-Ruiz, X. F. Segovia-González, M. V. Villagrana-Escareño, J. R. Vega-Acosta, and J. Ruiz-Garcia, "Encapsulation of different plasmonic gold nanoparticles by the CCMV CP," *Molecules*, vol. 25, no. 11, 2020, doi: 10.3390/molecules25112628.
- [89] M. Loredó-Tovias *et al.*, "Encapsidated ultrasmall nanolipospheres as novel nanocarriers for highly hydrophobic anticancer drugs," *Nanoscale*, vol. 9, no. 32, pp. 11625–11631, 2017, doi: 10.1039/c7nr02118f.
- [90] A. Liu, M. Verwegen, M. V. De Ruyter, S. J. Maassen, C. H. H. Traulsen, and J. J. L. M. Cornelissen, "Protein Cages as Containers for Gold Nanoparticles," *J. Phys. Chem. B*, vol. 120, no. 26, pp. 6352–6357, 2016, doi: 10.1021/acs.jpcc.6b03066.
- [91] A.-J. Madera-Bañuelos, "Formación de estructuras polimórficas de la proteína de cápside de Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV) con sales monovalentes y divalentes.," Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 2020.
- [92] F. Tama and C. L. Brooks, "The mechanism and pathway of pH induced swelling in cowpea chlorotic mottle virus," *J. Mol. Biol.*, vol. 318, no. 3, pp. 733–747, 2002, doi: 10.1016/S0022-2836(02)00135-3.
- [93] R. D. Cadena-Nava, M. Comas-Garcia, R. F. Garmann, A. L. N. Rao, C. M. Knobler, and W. M. Gelbart, "Self-Assembly of Viral Capsid Protein and RNA Molecules of Different Sizes: Requirement for a Specific High Protein/RNA Mass Ratio," *J. Virol.*, vol. 86, no. 6, pp. 3318–3326, 2012, doi: 10.1128/jvi.06566-11.
- [94] J.-A. Rodríguez-Tejeda, "Fabricación de un bio-nanomotor para el transporte de fármacos," Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 2018.

- [95] M. V. Villagrana-Escareño *et al.*, “VLPs Derived from the CCMV Plant Virus Can Directly Transfect and Deliver Heterologous Genes for Translation into Mammalian Cells,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/4630891.
- [96] X. F. Segovia-Gonzalez, “Preparación de partículas tipo virus (VLPs) que contienen nanoshells de oro (AuNSs),” Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 2017.
- [97] B.-J. Berne and R. Pecora, “Dynamic Light Scattering, with Applications to Chemistry, Biology, and Physics,” *Journal of Chemical Education*, Baton Rouge, Louisiana, p. 1, 1976.
- [98] A. Cuadros-Moreno, R. Casañas Pimentel, E. San Martín Martínez, and J. Yañes Fernandez, “Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas,” *Latin-American J. Phys. Educ.*, vol. 8, no. 4, p. 14, 2014.
- [99] D. N. de Assis, V. C. F. Mosqueira, J. M. C. Vilela, M. S. Andrade, and V. N. Cardoso, “Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of ^{99m}Techetium-fluconazole nanocapsules,” *Int. J. Pharm.*, vol. 349, no. 1–2, pp. 152–160, 2008, doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.08.002.
- [100] H. C. Van der Mei and H. J. Busscher, “Electrophoretic mobility distributions of single-strain microbial populations,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 2, pp. 491–494, 2001, doi: 10.1128/AEM.67.2.491-494.2001.
- [101] A. Checa Rojas, “Método: Gel electroforesis Agarosa.” <https://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-electroforesis-agarosa/>. Conogasi, Conocimiento para la vida.
- [102] L. Lavelle, J. P. Michel, and M. Gingery, “The disassembly, reassembly and stability of CCMV protein capsids,” *J. Virol. Methods*, vol. 146, no. 1–2, pp. 311–316, 2007, doi: 10.1016/j.jviromet.2007.07.020.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APS	Persulfato amónico
ARN	Ácido ribonucleico
AuNP	Nanopartículas de oro
CCMV	Virus del moteado clorótico del frijol
CP	Cápside
CPT	Camptotecina
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMSO	Dimetilsulfóxido
GP	Glicoproteína
HBC	Virus de hepatitis C
HBV	Virus de hepatitis B
HPV	Virus de papiloma humano
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
mg	Miligramos
ml	Mililitros
μM	Micro molar
nm	Nanómetros
nM	Nano molar
RCMMV	Virus necrótico del trébol rojo
RM	Resonancia Magnética
SDS	Dodecilsulfato sódico

TEMED	Tetrametiletilendiamina
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
TiO ₂	Dióxido de titanio
VLP	Partículas tipo virus
VPN	Nanopartículas virales
ZnO	Oxido de zinc

Lista de figuras

Figura 1..... Alcance de la nanotecnología representado con diferentes estructuras en las que se especifica su tamaño

Figura 2..... Vista esquemática de los enfoques de nanotecnología descendente y ascendente

Figura 3..... Aplicaciones más importantes de la nanotecnología en el área de agricultura

Figura 4..... Factores que influyen en el desarrollo de cáncer

Figura 5..... Origen y crecimiento de células cancerosas

Figura 6..... Tasa de defunción de tumores malignos por grupo decenal de edad y sexo 2019. Defunciones por cada 100 mil habitantes por cada grupo de edad y sexo.

Figura 7..... Tasas de defunciones por tumores malignos por cada 10 000 habitantes Enero-Agosto (2011-2020) y cierre de año (2011-2019)

Figura 8..... Estructura química del fármaco hidrófobo Camptotecina.

Figura 9..... Estructura química del fármaco Paclitaxel

Figura 10..... Tipos de virus

Figura 11..... Diagrama del ciclo de replicación de virus

Figura 12..... Estructura del virus Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV)

Figura 13..... Diagrama de fases del ensamble de proteínas como función del pH y la fuerza iónica

Figura 14..... Macetas con las semillas del frijol Black Eye distribuidas de forma uniforme

Figura 15..... Proceso de infección de las hojas de la planta con virus CCMV

- Figura 16..... A) Síntomas de infección presentes en las hojas de la planta (clorosis), B) hojas de la planta sin infección
- Figura 17..... Hojas del frijol black eye infectadas con virus CCMV molidas
- Figura 18..... Sobrenadante con el residuo que se obtiene después de centrifugar
- Figura 19..... Colchón de sacarosa con el sobrenadante antes de la centrifugación
- Figura 20..... Gradiente de sacarosa al 25% con virus el cual se encuentra en la franja azul vista desde la parte inferior con luz blanca
- Figura 21..... Pellet que se obtiene en el que se encuentra el virus purificado
- Figura 22..... Esquema de las partes que incluye el DLS
- Figura 23..... Componentes del equipo para realizar electroforesis en geles de agarosa
- Figura 24..... Cámara de electroforesis con sus partes principales
- Figura 25..... Gel de retardación del virus CCMV en gel de agarosa al 1%
- Figura 26..... Diagrama de distribución del tamaño de partícula del virus CCMV obtenido por dispersión de luz dinámica, graficando porcentaje del volumen vs el tamaño en nm.
- Figura 27..... Espectro de absorbancia del virus CCMV, 1 mm Absorbancia vs Longitud de onda (nm)
- Figura 28..... Espectro de absorbancia de la proteína del CCMV, 1 mm Absorbancia vs Longitud de onda (nm)
- Figura 29..... A) Espectro de absorción de la Camptotecina en medio ácido, B) espectro de absorción del Paclitaxel en medio ácido, C) espectro de

absorción de la Camptotecina en medio neutro e D) espectro de absorción del Paclitaxel en medio neutro

Figura 30..... A) Espectro de absorbancia de la Camptotecina e B) espectro de absorbancia del sistema fármaco-proteína

Figura 31..... Gel de retardación en agarosa al 1% para la determinación de sistemas con material genético, A) Camptotecina y B) Paclitaxel

Figura 32..... Gel de poliacrilamida al 12% para determinar el desplazamiento de proteínas, A) Camptotecina y B) Paclitaxel

Figura 33..... Estadístico con la representación de la muerte celular registrada en el lapso de 24-48 horas por el fármaco Camptotecina

Figura 34..... Estadístico con la representación de la muerte celular registrada en el lapso de 24-48 horas por el fármaco Paclitaxel y la proteína del CCMV

Lista de tablas

Tabla 1..... Distribución porcentual de defunciones de los principales tumores malignos por grupos de edad (0 a 14 años y 15 a 29 años) y sexo 2019.

Tabla 2..... Distribución porcentual de defunciones de los principales tumores malignos por grupos de edad (30 a 59 años y 60 años y más) y sexo 2019.

Tabla 3..... Condiciones de ensamble Camptotecina-proteína.

Tabla 4..... Condiciones de ensamble 2 Camptotecina-proteína.

Tabla 5..... Condiciones de ensamble 3 Camptotecina-proteína.

Tabla 6..... Volumen de fármaco-proteína agregado por ensamble para el fármaco Paclitaxel.

Tabla 7..... Volumen de fármaco y medio de cultivo agregado por pozo para determinar toxicidad de Camptotecina a diferentes concentraciones.

Tabla 8..... Volumen agregado de fármaco y medio de cultivo para realizar las pruebas de viabilidad celular a diferentes concentraciones.

Tabla 9..... Volumen de proteína y medio de cultivo agregado por pozo para determinar su toxicidad.

Tabla 10..... Porcentaje de la muestra del virus CCMV que tiene el tamaño de 28.74 nm.

Tabla 11..... Valores de la absorbancia en A280 obtenidos del virus del CCMV.

Tabla 12..... Valores obtenidos del A280 y 260/280 de la proteína purificada.

Tabla 13..... Valores obtenidos de A280 para determinar la concentración de cada fracción de la proteína.

Tabla 14..... Carga de los fármacos determinada mediante Potencial Z.

Apéndice I

PREPARACIÓN DE BUFFERS

NOTA. Todos los buffers que se preparen se deben de filtrar con papel filtro de 0.45 μm , autoclavear y conservar en el refrigerador a 4 °C hasta su uso.

BUFFER DE INOCULACIÓN

REACTIVOS	STOCKS (M)	MOLARIDAD	ml/STOCK
FOSFATO DE SODIO MONOBASICO	2	0.1	4.385
FOSFATO DE SODIO DIBASICO	2	0.1	5.615
CLORURO DE MAGNESIO (MgCl ₂)	1	0.1	20.33 (mg)

BUFFER DE EXTRACCIÓN

REACTIVO	PESO MOLECULAR (PM)	CANTIDAD (g)
ACETATO DE SODIO	82.03	41.015
ACETATO DE MAGNESIO	214.45	17.160

- Agregar el acetato de sodio y el acetato de magnesio en 600 ml de agua desionizada en un vaso de precipitado, se agrega ácido acético para llevarlo a pH 4.5 y se afora a 1 L con agua desionizada.

BUFFER DE SUSPENSIÓN

Este buffer se prepara con el buffer de extracción, pero diluido 10 veces por lo que se toman 100 ml del buffer de extracción y se afora a 1 L con agua desionizada y autoclaveada. Se ajusta a pH 4.5.

BUFFER DE DESENSAMBLE pH 7.5

# de viales	REACTIVOS	STOCKS (mM)	MOLARIDAD	ml/STOCK
	Cloruro de calcio (CaCl ₂)	500	2.5	200
	Tris-HCl pH 7.5	50	1	50
	EDTA pH 8	1	0.45	2.22
1	DTT	1	0.67	1.49
2	PMSF	0.5	0.19	2.63

BUFFER DE PROTEÍNA pH 7.2

# de viales	REACTIVOS	STOCKS (mM)	MOLARIDAD	ml/STOCK
	Cloruro de sodio (NaCl)	1 M	2.5	400
	Tris-HCl pH 7.5	50 M	1	20
	EDTA pH 8	1	0.45	2.22
1	DTT	1	0.67	1.49
2	PMSF	1	0.19	5.26

BUFFER DE ACETATOS (BUFFER DE RETARDACIÓN)

REACTIVO	STOCKS (mM)	GRAMOS
Acetato de sodio	50	2.0507
Acetato de magnesio	8	0.8578

BUFFER DE ENSAMBLE

REACTIVO	STOCKS (mM)
Cloruro de sodio	50
Tris-HCl	50
Cloruro de magnesio	10
Cloruro de potasio	5
DTT	1
PMSF	0.5

BUFFER DE CAPSIDE VACIA

REACTIVO	MOLARIDAD
Cloruro de sodio	1 M
Acetato de magnesio pH = 4.8	50 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM

BUFFER DE RETARDACIÓN

REACTIVO	MOLARIDAD
ACETATO DE SODIO	50 mM
ACETATO DE MAGNESIO	8 mM