



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**NANOPARTÍCULAS DE ORO ENCAPSIDADAS POR BROMOVIRUS E
HINCHAMIENTO VIRAL COMO MECANISMO PARA LA ENTREGA DE GENES A
LA MAQUINARIA CELULAR**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS QUE
PRESENTA LA ALUMNA:**

SEGOVIA GONZÁLEZ XÓCHITL FABIOLA

DIRECTOR: DR. JAIME RUIZ GARCÍA

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P., NOVIEMBRE 2023



El programa de Doctorado en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) del CONAHCyT, registro 520, en el nivel Consolidado. Número de registro de la beca otorgada por CONAHCyT: 486952, CVU: 626320



Nanopartículas de oro encapsidadas por bromovirus e hinchamiento viral como mecanismo para la entrega de genes a la maquinaria celular © 2023 by Xóchitl Fabiola Segovia González is licensed under [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias Químicas
Programa de Doctorado

Formato D28

Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a 14 de noviembre de 2023

L.B. María Zita Acosta Nava
Biblioteca de Posgrado FCQ

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada Nanopartículas de oro encapsidadas por bromovirus e hinchamiento viral como mecanismo para la entrega de genes a la maquinaria celular presentada por la autora Xóchitl Fabiola Segovia González. La tesis es requisito para obtener el grado de Doctorado en el Posgrado en Ciencias Químicas. El análisis reveló un porcentaje de similitud de 14% excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dra. Denisse Atenea de Loera Carrera
Coordinadora Académica del Posgrado en Ciencias Químicas



**"NANOPARTÍCULAS DE ORO ENCAPSIDADAS POR BROMOVIRUS E
HINCHAMIENTO VIRAL COMO MECANISMO PARA LA ENTREGA DE GENES
A LA MAQUINARIA CELULAR"**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

M.C. XÓCHITL FABIOLA SEGOVIA GONZÁLEZ

Sinodales

Dr. Jaime Ruiz García	_____
Dra. Ruth Elena Soria Guerra	_____
Dr. Ricardo Alberto Guirado López	_____
Dr. Gerardo R. Argüello Astorga	_____
Dra. María Verónica Villagrana Escareño	_____



San Luis Potosí, S.L.P., México, 8/11/2023

Dra. Denisse Atenea de Loera Carrera
Coordinador del Posgrado en Ciencias Químicas
Facultad de Ciencias Químicas, UASLP

De nuestra mayor consideración:

Por medio de la presente, le informamos que estamos de acuerdo con el trabajo de tesis de la estudiante M.C. Xochitl Fabiola Segovia González, cuyo título de Tesis es: Nanopartículas de oro encapsidadas por Bromovirus e Hinchamiento viral como mecanismo para la entrega de genes a la maquinaria celular.

Por lo cual, no tenemos objeción en que se autorice el examen para el día Viernes 17 de Noviembre, del 2023, de preferencia por la mañana, en la Sala de Exámenes Profesionales de la Facultad de Ciencias Químicas.

Sin otro particular, le reiteramos las seguridades de nuestra atenta y distinguida consideración.

Sinceramente el comité tutorial,

Dr. Jaime Ruiz García

Dra. Ruth Elena Soria Guerra

Dr. Ricardo Alberto Guirado López

Dra. María Verónica Villagrana Escareño

Dr. Gerardo R. Argüello Astorga

www.uaslp.mx

Carrilero Obregón 64, Zona Centro
78000 • San Luis Potosí, S.L.P.
tel. (444) 826 2362 al 65
fax. (444) 813 3874
www.fisica.uaslp.mx

Integrantes del Subcomité de Tesis

Dr. Jaime Ruiz García, director de tesis. Adscrito al Posgrado en Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Dra. María Verónica Villagrana Escareño, miembro del comité tutorial extendido. Adscrita al Posgrado en Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Dedicatoria

Quiero agradecer en especial a mi esposo Mario Alberto González, que sin él no estaría hoy aquí culminando esta etapa, gracias por todo el apoyo, motivación y el cariño incondicional, me has enseñado tantas cosas, pero sobre todo a no rendirme. Gracias por tomar mi mano y no soltarla.

A mi pequeña Victoria Valentina, mi hermosa hija que siempre me inspira en ser mejor persona, gracias por ser tan paciente conmigo, por decirme fortaleza en los días grises, cada esfuerzo valdrá la pena más adelante.

A mis padres Raymundo Segovia Castorena y Esthela González Delgado por su amor, motivación, dedicación y su apoyo incondicional para salir adelante.

A mis hermanos: Carlos, Raymundo, Iván y Oswaldo por su constante motivación, enseñanzas

A mi hermana Angélica por ser siempre mi cómplice y por el gran apoyo brindado a lo largo de este proyecto.

A mis compañeros y amigos que siempre estuvieron en todo momento de esta gran experiencia.

Agradecimientos

A la Universidad autónoma de San Luis Potosí excelente casa de estudio, a sus profesores que con paciencia y profesionalismo siempre me brindaron su apoyo en cada etapa de mi formación académica. Y a todo el personal que siempre estuvieron para ayudar, resolvieron cada duda que se me presentaba en el camino.

Mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mi posgrado.

En especial quiero agradecer al Dr. Jaime Ruiz García, por ser mi mentor en mi camino hacia la ciencia, gracias por su apoyo brindado durante este periodo de 9 años trabajando en su laboratorio y en agradezco cada uno de sus consejos.

Gracias a la Dra. María Verónica Villagrana Escareño por la incondicional amistad, por todo su apoyo en cada experimento realizado, pero en especial quiero agradecer por la amistad que siempre me ofreció.

A mis compañeros de laboratorio, que además me brindaron su amistad, siempre haciendo más ameno el transcurso en el laboratorio.

A mis compañeros del posgrado, que me brindaron su apoyo y su amistad.

RESUMEN

El concepto de nanotecnología surgió desde el año 1959, donde el Dr. Richard Feynman habló por primera vez sobre la posibilidad de manipular átomos y moléculas, pero no fue hasta 1970 que el Dr. Norio Taniguchi utilizó el término nanotecnología para describir sus investigaciones, la nanotecnología se puede definir como el estudio y la manipulación de la materia a escala nanométrica (1-100nm). A su vez, la nanomedicina promete innumerables soluciones y avances tecnológicos.

Para un mejor entendimiento de este proyecto fue dividido en cuatro capítulos, el primero de ellos se basó en las síntesis de nanopartículas metálicas, esta área ha tenido un gran énfasis e interés, debido a las propiedades que estas presentan a causa del cambio en sus características en escala nanométrica, en este proyecto se trabajó con tres diferentes nanopartículas de oro (AuNPs), las cuales fueron las nanoesferas de oro (AuNEs), nanopartículas de plata (AgNPs) y nanoshells de oro (AuNSs), logrando la síntesis y caracterización, mediante dispersión de luz dinámica (DLS), Microscopio electrónico de transmisión (MET) y espectrofotometría Uv-vis, también se realizó un estudio de la estabilidad que estas poseen con respecto al tiempo, donde se demostró que las AUNEs muestran una mayor estabilidad con respecto a las AgNPs y AuNSs.

El segundo capítulo del proyecto es un estudio de los mecanismos de entrada de las AuNEs con respecto al tiempo en células HEK-293, ya que un aspecto importante a considerar cuando se trabaja con nanopartículas es la interacción que existe con las células, en específico el conocer el mecanismo de absorción de las nanopartículas. Dos procesos fundamentales a la hora de evaluar si existe efectos citotóxicos celulares causados por las nanopartículas son la endocitosis y exocitosis, se optó por el uso de AuNEs debido a las características que se observaron en el capítulo I.

La tercera etapa del proyecto se basó en la encapsidación de las nanopartículas sintetizadas en el capítulo I con la cápside del virus de planta CCMV, esto con el fin de poder utilizar la cápside viral de los virus como nanocontenedores para las AuNPs dándoles una mayor biocompatibilidad, durabilidad y estabilidad, para que puedan ser utilizadas en terapias biomédicas.

La última etapa del proyecto lleva por nombre estudio del proceso de hinchamiento de los virus Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV) y Brome Mosaic Virus (BMV), en esta etapa del proyecto primeramente se llevó a cabo la amplificación y purificación de los virus CCMV y BMV, posteriormente se realizó la evaluación de los cambios del diámetro de la cápside viral, cuando se expone a diferentes condiciones de pH y fuerza iónica (FI), estos estudios surgieron a partir de la pregunta ¿cómo es que la cápside protege al genoma viral de los cambios de pH y FI que va encontrando en su camino? Es decir, desde que el virus entra al hospedero y llega a la célula hay diferentes condiciones fisicoquímicas de pH y FI, existen antecedentes que han demostrado que los virus sufren una hinchazón, que anteriormente se creía que era de un 10% en la cápside viral, debido a este incremento en el tamaño, surge la hipótesis de que los extremos 5' y 3' del material genético quedan expuestos, esto daría la posibilidad a la maquinaria celular de tomar el RNA y seguir con la replicación. Por eso razón el CCMV y BMV se sometieron a diferentes condiciones de pH y FI, los cuales fueron evaluados por DLS, MET y microscopia de fuerza atómica (AFM), donde se demostró que las cápsides virales tienen un hinchamiento superior al 10% reportado con anterioridad en la literatura.

Palabras clave: nanopartículas, nanoesferas de oro (AuNEs), nanopartículas de plata (AgNPs), nanoshells de oro (AuNSs), CCMV, BMV, hinchamiento.

ABSTRACT

The concept of nanotechnology emerged in 1959, where Dr. Richard Feynman first spoke about the possibility of manipulating atoms and molecules, but it was not until 1970 that Dr. Norio Taniguchi used the term nanotechnology to describe his research, Nanotechnology can be defined as the study and manipulation of matter at the nanometer scale (1-100nm). At the same time, nanomedicine promises countless solutions and technological advances.

For a better understanding of this project, it was divided into four chapters, the first of which was based on the syntheses of metal nanoparticles, this area has had greater emphasis and interest, due to the properties that they present due to the change in their characteristics. On a nanometric scale, in this project we worked with three different gold nanoparticles (AuNPs), which were gold nanospheres (AuNEs), silver nanoparticles (AgNPs) and gold nanoshells (AuNSs), achieving the synthesis and characterization, Using dynamic light scattering (DLS), Transmission Electron Microscope (MET) and UV-vis spectrophotometry, a study of the stability that these possess with respect to time was also carried out, where it was demonstrated that the AUNEs show greater stability with respect to two AgNPs and AuNSs.

The second chapter of the project is a study of the entry mechanisms of AuNEs with respect to time in HEK-293 cells, since an important aspect to consider when working with nanoparticles is the interaction that exists with the cells, specifically the know the absorption mechanism of nanoparticles. Two fundamental processes when evaluating whether there are cellular cytotoxic effects caused by nanoparticles are endocytosis and exocytosis. The use of AuNEs was chosen due to the characteristics observed in chapter I.

The third chapter of the project was based on the encapsidation of the nanoparticles synthesized in chapter I with the capsid of the plant virus CCMV, this to be able to use the viral capsid of the viruses as nanocontainers for the AuNPs, giving them greater

biocompatibility. Durability and stability, so that they can be used in biomedical therapies.

The last stage is called a study of the swelling process of the Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV) and Brome Mosaic Virus (BMV). In this stage of the project, the amplification and purification of the CCMV and BMV viruses were first carried out, subsequently, the evaluation of the changes in the diameter of the viral capsid was carried out, when exposed to different conditions of pH and ionic strength (IF), these studies arose from the question: how does the capsid protect the viral genome from the changes in pH and FI that you encounter on your way? That is to say, since the virus enters the host and reaches the cell there are different physicochemical conditions of pH and the FI, there are antecedents that have shown that viruses suffer swelling, which was previously believed to be 10% in the viral capsid, due to this increase in size, the hypothesis arises that the 5' and 3' ends of the genetic material are exposed, this would give the cellular machinery the possibility of taking the RNA and continuing with the replication. For this reason, CCMV and BMV were subjected to different pH and FI conditions, which were evaluated by DLS, MET and atomic force microscopy (AFM), where it was demonstrated that the viral capsids have a swelling greater than the 10% reported with previously in the literature.

Keywords: nanoparticles, gold nanospheres (AuNEs), silver nanoparticles (AgNPs), gold nanoshells (AuNSs), CCMV, BMV, swelling.

Contenido

CAPÍTULO I “NANOPARTÍCULAS”	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.1. Características generales de las nanopartículas de oro (AuNPs)	2
1.1.2. Aplicaciones de las nanopartículas de oro	3
1.1.3. Nanoesferas de oro (AuNEs).....	4
1.1.4. Nanoshells de oro (AuNSs)	4
1.1.5. Nanoesferas de plata (AgNPs)	5
1.2. OBJETIVOS	6
1.3. HIPÓTESIS	6
1.4. JUSTIFICACIÓN	6
1.5. METODOLOGÍA.....	7
1.5.1. Síntesis de AuNEs.....	7
1.5.2. Síntesis de AgNPs.....	8
1.5.3. Síntesis de AuNSs.....	9
1.5.4. Pruebas de estabilidad de las AuNPs.....	10
1.6. RESULTADOS	11
1.6.1. Síntesis de AuNPs.....	11
1.6.1.1. AuNEs.....	11
1.6.1.2. AuNSs.....	13
1.6.1.3. AgNPs.....	15
1.6.2. Pruebas de estabilidad de las nanopartículas.....	17
• AuNEs (30-60 días)	17
1.6.3. Estabilidad de las AuNEs vs pH	21
1.7. CONCLUSIONES.....	23
CAPÍTULO II “ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ENTRADA DE LAS AuNEs CON RESPECTO AL TIEMPO EN CÉLULAS HEK-293”.....	24
2.1. INTRODUCCIÓN	24
2.1.1. Mecanismos de endocitosis y exocitosis celular.....	25
2.1.2. AuNEs como agentes de contraste.....	27

2.2. OBJETIVO.....	28
2.3. HIPÓTESIS	28
2.4. JUSTIFICACIÓN	28
2.5. METODOLOGÍA.....	29
2.5.1. Cultivo celular	29
2.5.2. Fijación in situ del monocapa celular para muestras en MET	30
2.5.3. Deshidratación.....	32
2.5.4. Inclusión	32
2.5.5. Preparación de cortes para ultramicrotomo	34
2.5.6. Tinción.....	36
2.6. RESULTADOS	37
2.6.1. Control negativo	37
2.6.2. Control positivo.....	38
2.6.3. Evaluación a 24 h	40
2.6.4. Células 48 h	41
2.6.5. Células 72 h	43
2.7. CONCLUSIONES.....	44
CAPÍTULO III “ENCAPSIDACIÓN DE NANOPARTICULAS CON PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE DEL CCMV”	45
3.1. INTRODUCCION	45
3.1.1. Proteína de la cápside del CCMV	45
3.1.2. Partículas tipo virus (VLPs).....	47
3.2. OBJETIVOS	49
3.3. HIPÓTESIS	49
3.4. JUSTIFICACIÓN	49
3.5. METOLOGÍA.....	50
3.5.1. Purificación de proteína del CCMV	50
3.5.2. Encapsidación de nanopartículas en proteína del virus CCMV	51
3.6. RESULTADOS	51
3.6.1. Purificación de proteína	51
3.6.2. Encapsidación de Nanopartículas.....	52
3.7. CONCLUSIONES.....	57

CAPÍTULO IV “ESTUDIO DEL PROCESO DE HINCHAMIENTO DE LOS VIRUS CCMV Y BMV”	58
4.1. INTRODUCCION	58
4.1.1. Virus	58
4.1.2. Características de los virus	59
4.1.3. Generalidades del virus Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV)	60
4.1.4. Generalidades del virus Brome Mosaic Virus (BMV)	62
4.1.5. Hinchamiento del virus.....	63
4.2. OBJETIVOS	67
4.3. HIPÓTESIS	67
4.4. JUSTIFICACIÓN	67
4.5. METODOLOGÍA.....	67
4.5.1. Amplificación de los virus CCMV y BMV	67
4.5.2. Purificación del virus CCMV y BMV	69
4.5.3. Estudio de los cambios en el tamaño de los virus CCMV y BMV	72
4.6. RESULTADOS	74
4.6.1. Amplificación del virión	74
4.6.2. Purificación del virión.....	75
4.6.3. Diagrama de la evaluación del tamaño del CCMV y BMV.....	76
4.7. CONCLUSIONES	88
Bibliografía.....	89

Índice de Figuras

Figura 1 Aplicaciones de las AuNPs, figura tomada de la referencia [5].....	3
Figura 2 Mecanismo de formación de las AuNSs figura tomada de la referencia [22].	5
Figura 3 Color característico posterior a la síntesis de las AuNEs.....	8
Figura 4 Coloración característica de las AgNPs de 18 nm.....	9
Figura 5 Color característico posterior de la síntesis de las AuNSs.	10
Figura 6 a) Imagen representativa de AuNEs en MET, b) Pico clásico de las AuNEs en DLS.	11
Figura 7 Espectro de absorbancia de AUNEs.	12

Figura 8 Imagen característica de MET de A) AgSeeds de 4nm, B)AgNPs de 17 nm, C)D) AuNSs 21 nm.....	14
Figura 9 a) Curva representativa del tamaño de AuNSs utilizando DLS, b) curva representativa UV-vis donde se observa el pico de absorbancia en 680 nm	15
Figura 10 a) Imagen en MET AgNPs b) Gráfica tomada en DLS de AgNPs c) Imagen representativa de AFM que muestra el tamaño de las AGNPs	16
Figura 11 Pico de absorbancia característico de las AgNPS.....	17
Figura 12 Prueba de estabilidad de las AuNEs donde se muestra el espectro de tamaño del día 30 y del día 60.	18
Figura 13 Prueba de estabilidad de AuNSs día 1-20	19
Figura 14 Medición de la estabilidad de las AgNPs mediante DLS 30 días.....	21
Figura 15 Evaluación de la estabilidad del tamaño vs el pH.....	22
Figura 16 Evaluación de la estabilidad del potencial ZETA de las AuNPs y AgNPs en diferentes pH.....	23
Figura 17 Mecanismos de entrada por endocitosis imagen tomada de la referencia [39].....	26
Figura 18 Placa de cultivo celular HEK-293.	30
Figura 19 a)b) Preparacion de la resina,c) Proceso de polimeración de resina en horno.....	33
Figura 20 En esta imagen se puede observar las muestras extraídas de la placa de cultivo posterior a la polimerización.	34
Figura 21 Esquema donde se describe la manera en que se cortan y colocan las muestras en las pirámides formadas por la resina de los tubos de 1.5.....	35
Figura 22 Células vistas en microscopio óptico teñidas con azul de toluidina.	36
Figura 23 Células HEK 293 de MET control negativo	38
Figura 24 Imagen tomada en MET internalización de las AuNEs en células HEK-293, 1 h post fijación. A,B, se puede apreciar las AuNEs en las membranas celulares, C,D, se observan las AuNEs en los endosomas celulares.....	39
Figura 25 Imagen tomada en MET de la internalización de las AuNEs en células HEK-293, 24h antes de la fijación.	40
Figura 26 Imagen tomada en MET internalización de las AuNEs en células HEK-293, 48 h antes de la fijación.	42
Figura 27 Imagen representativa en MET de AuNEs en células HEK 293	43

Figura 28 Diagrama de fases de las proteínas de la cápside del CCMV en diferentes pH y FI (Figura tomada de la referencia [51]).	46
Figura 29 Superficie de un virus que puede ser utilizada como nanocontenedor. El interior por interacciones electrostáticas con amino terminal, la interfaz con partículas pequeñas y el exterior utilizando interacciones con la carboxilo terminal imagen tomada de la referencia [57].	47
Figura 30 Gráfica del espectro de absorción de proteína, después de la purificación del virión, donde el máximo de absorción se observa en 280 nm debido a las proteínas (línea azul) y la absorción en 260 debido al ARN (línea verde).	52
Figura 31 Imágenes tomadas en MET de AuNEs encapsidadas con proteína de la cápside del CCMV.	54
Figura 32 Imagen representativa de MET donde se puede apreciar la encapsidación de dos partículas por la cápside del CCMV formando VLPs.	55
Figura 33 Imágenes tomadas en MET de AuNSs encapsidadas en VLPs	56
Figura 34 Imagen tomada en MET que muestra la proteína de la cápside del CCMV en contacto con las AgNPs.	57
Figura 35 Estructura del virus Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV) figura tomada de la referencia [32].	61
Figura 36 Estructura del Brome Mosaic Virus (BMV) imagen tomada de la referencia [94].	63
Figura 37 Hinchamiento del CCMV imagen tomada de la referencia [102].	65
Figura 38 Representación esquemática de la liberación del genoma de un virus dentro de la célula.	66
Figura 39 Imagen que muestra la siembra de frijol Cowpea California Black Eye No. 5.	68
Figura 40 a) Molienda en mortero de las hojas, b) Muestra con cloroformo para separar los componentes celulares, c)d) observación de las fases el sobrenadante amarillo ocre que contiene el virus.	70
Figura 41 Imagen que muestra el colchón de sacarosa donde se puede apreciar la diferencia de fases.	71
Figura 42 Gradiente de sacarosa al 25% donde se observa la franja azul que contiene el virus a $\frac{3}{4}$ del tubo.	72

Figura 43 a) Imagen que muestra clorosis en hojas de cebada infectadas con BMV, b)c) Clorosis en hojas de frijol infectadas con CCMV.....	75
Figura 44 Gráfica que muestra el espectro de absorción típico del virus CCMV a una concentración de 1 mg/mL. La absorbancia máxima se da en 260 nm donde absorben los ácidos nucleicos (línea azul).....	76
Figura 45 Medición de BMV y CCMV que muestra el cambio de tamaño DLS típico a) CCMV y b) BMV con una FI= 0.1 y con diferentes pH, donde se puede apreciar el cambio en el tamaño de los viriones.....	78
Figura 46 Cambios en el tamaño del diámetro del CCMV determinado por DLS en función del pH y la fuerza iónica (I) a) I=0.1, b) I=0.2, c) I=0.3.	79
Figura 47 Cambios en el diámetro del tamaño del BMV determinado por DLS en función del pH y fuerza iónica, a) I=0.1, b) I=0.2, c) I=0.3.	81
Figura 48 Imagen representativa de MET a) CCMV, b) Distribución de tamaño de BMV a diferentes condiciones de pH y FI, c) CCMV FI 0.1 y pH 4.5, d) CCMV FI 0.1 y pH de 7.4, e) CCMV FI 0.3 y pH 6.4, f) BMV FI 0.1 y pH 4.5, g) BMV FI 0.1 pH y pH 7.4, h) BMV FI 0.3 y pH 7.4.	83
Figura 49 medición del virus CCMV realizado por AFM en celda líquida a pH 7.4 y FI 0.1. a) y b) AFM imágenes de los virus CCMV, c) perfiles de altura de las partículas del virus CCMV que se muestran en las figuras a) y b), d). Comparación del tamaño promedio del diámetro del virus observado por AFM y DLS en las mismas condiciones.	85
Figura 50 Estudio de Microscopía de Fuerza Atómica del BMV. a) y b) Imágenes AFM de los virus BMV en una celda líquida a pH 7 y I 0.1 en modo ScanAsyst. c) Perfiles de altura de las partículas del virus BMV mostrados en las Figs. a) y b) con las líneas sobre ello d) comparación de los resultados de AFM y DLS.....	86
Figura 51 Imagen comparativa entre los resultados de Wilts realizados por AFM y los resultados obtenidos con las mismas condiciones en DLS para CCMV y BMV.	87

Índice de tablas

Tabla 1 Fijación del cultivo celular	30
Tabla 2 Deshidratación a base de alcohol etílico	32

CAPÍTULO I “NANOPARTÍCULAS”

1.1. INTRODUCCIÓN

Con el paso del tiempo se ha incrementado el uso de los materiales en escala nanométrica (1 a 100 nm), estos ofrecen innumerables posibilidades en el desarrollo de nuevas tecnologías y se pueden utilizar en el diagnóstico y terapia de enfermedades, teniendo terapias más eficaces anticancerígenas y con efectos menos adversos [1][2][3][4]. Dentro de los nanomateriales se encuentran las nanopartículas de oro (AuNPs) y las nanopartículas de plata (AgNPs) que han sido objeto de gran interés debido a sus propiedades únicas, ya que pueden absorber luz y transformarla en calor [5][6], además han sido ampliamente estudiadas por su aplicación en diversas áreas como lo son catálisis, electrónica y bionanotecnología [7]. Pueden ser producidas con distintos tamaños y formas, ser funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, fármacos, material genético, etc.)[8]. La absorbancia de las AuNPs puede cambiar desde la región del visible hasta el infrarrojo cercano dependiendo de la morfología[1], sin embargo, para terapia fototérmica se busca que las AuNPs tengan su curva de absorbancia en la región del infrarrojo cercano, debido a que los tejidos se vuelven parcialmente transparentes en esta región y no son dañados [9][10]. Para que una nanopartícula pueda ser utilizadas en el sector biomédico deben presentar diferentes características como biocompatibilidad, ser inertes con los tejidos, ser no inmunogénicas, y poseer baja toxicidad en bajas concentraciones[11]. A medida que aumenta el interés sobre el uso de nanomateriales en aplicaciones biomédicas, es importante comprender la interacción que existe entre estos y las células para así poder evaluar su toxicidad, por esta razón la primera etapa de este proyecto consistió en la síntesis y caracterización de tres diferentes nanopartículas con las características adecuadas para ser utilizada en aplicaciones biomédicas, la primera de éstas fueron las nanoesferas de oro (AuNEs) las cuales serán utilizadas para imagenología médica, ya que gracias a su buena estabilidad son

adecuadas para la internalización, las segundas nanopartículas son las nanoshells de oro (AuNSs) las cuales se pueden utilizar para la terapia fototérmica y las terceras de ellas fueron las nanopartículas de plata (AgNPs) las cuales presentan actividad antimicrobiana, también se realizó la evaluación de la estabilidad con respecto al tiempo mediante dispersión de luz dinámica (DLS).

1.1.1. Características generales de las nanopartículas de oro (AuNPs)

Las AuNPs son importantes en el campo biomédico y nanotecnológico gracias a su conductividad electrónica y su área superficial, se pueden utilizar en terapia de radiación, como biomarcadores de detección biomolecular de proteínas, biosensores, actividad antimicrobiana y actividad anticancerígena[12]

Las AuNPs son nanomateriales de tamaño menor a 100 nm, estas pueden presentar distintas morfologías las cuales les confieren propiedades específicas, son empleadas en una gran variedad de áreas como lo son catálisis, electrónica y nanobiotecnología [7]. Tienen propiedades ópticas y fototérmicas debido a la resonante de sus electrones libres en presencia de luz, esta característica hace que las nanopartículas pueden irradiar (Esparcimiento de Mie Mie scattering) o absorber luz que se transforma rápidamente en calor (figura 1) [13] [5]. Además de que las AuNPs al estar funcionalizadas podrán unirse específicamente a ciertas células, calentando un tejido específico con el fin de destruir solo las células malignas [14].

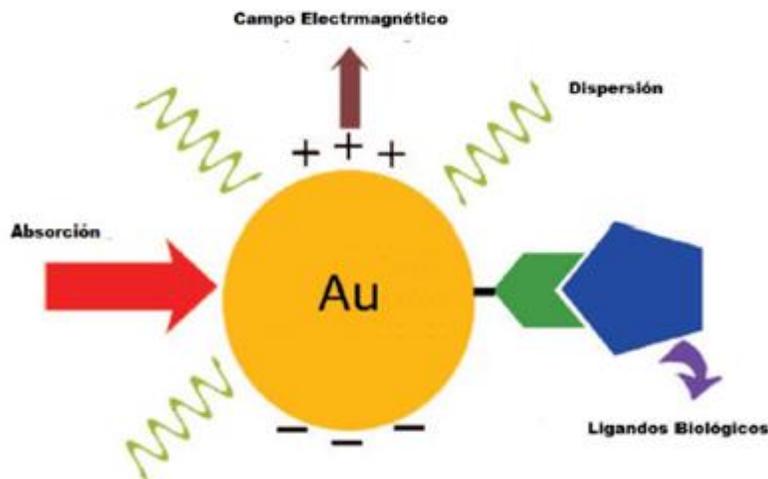


Figura 1 Aplicaciones de las AuNPs, figura tomada de la referencia [5].

1.1.2. Aplicaciones de las nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro tienen diversas aplicaciones, algunas de las principales son imagenología, entrega de fármacos o genes y terapias térmicas [15].

- Imagenología: gracias a las características de las AuNPs estas pueden ser utilizadas en esta área ya que presentan una fuerte absorción electrónica adecuada para el contraste de una muestra [6][16]. Las AuNPs pueden funcionalizarse con anticuerpos [17], además estas pueden ser marcadas radioactivamente.
- Entrega de fármacos o genes: las AuNPs pueden servir como vehículos para la entrega de fármacos, esto puede ser en su interior o en sus paredes [18].
- Terapias térmicas: las AuNPs tienen la propiedad de absorber luz, que las hace adecuadas como mediadoras de calor, la energía de la luz se disipa lo cual genera una temperatura elevada en sus proximidades [6].

1.1.3. Nanoesferas de oro (AuNEs)

Las AuNEs es uno de los nanomateriales más conocidos y estudiados, ya que su descubrimiento se remonta a 1857, cuando Faraday preparó oro coloidal por reducción del cloruro de oro con fósforo, el tamaño puede variar de entre 2 a 100 nm y su pico de absorción de las nanoesferas varía de entre 510 a 550 nm [9], pueden ser usadas en distintas aplicaciones, las más importantes son: imagenología, ya que presentan una fuerte absorción electrónica adecuada para el contraste de la muestras y estas pueden funcionalizarse con anticuerpos[19].

1.1.4. Nanoshells de oro (AuNSs)

Las AuNSs son nanoestructuras esféricas huecas, en las que el grosor de su capa de oro es el factor que determina las propiedades ópticas. Las AuNSs presentan una banda máxima de absorción que puede situarse por encima de 600 nm hacia el infrarrojo cercano (NIR) [20], lo cual las hace indicadas para ser utilizadas en terapia fototérmica.

La síntesis de las AuNSs se puede llevar a cabo mediante el sacrificio de un precursor, el cual generalmente es un núcleo que en este caso será una nanopartícula de plata (AgNPs), la cual en presencia de una solución de HauCl_4 da lugar a la formación de las AuNSs, en la superficie de la AgNP se va agregando la solución de HauCl_4 al mismo tiempo que la plata se oxida, y reacciona con los iones Cl^- , formando AgCl , el cual es característico al formarse un precipitado negro (figura 2.) [21].

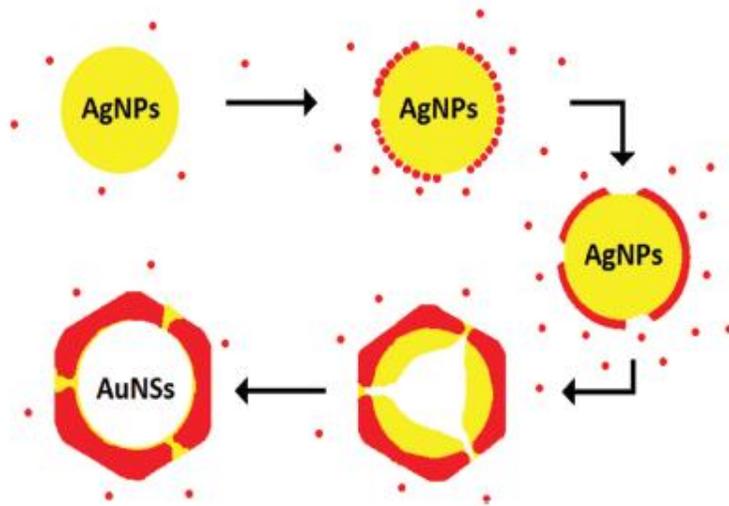


Figura 2 Mecanismo de formación de las AuNSs figura tomada de la referencia [22].

1.1.5. Nanoesferas de plata (AgNPs)

Los nanomateriales de plata han tomado una gran fuerza en los últimos años y ha aumentado el interés, esto se debe a sus propiedades antibacterianas [22][23]. Han sido ampliamente explotados en la industria biomédica para el desarrollo de nuevos productos resistentes a bacterias como catéteres, recubrimientos quirúrgicos, implantes médicos, materiales dentales y se usan actualmente para controlar crecimiento bacteriano [24][25]. Además de que se conoce que los iones de plata y compuestos basados en la misma son tóxicos para los microorganismos [26].

Los nanomateriales que contienen plata a menudo se ven obstaculizados por la facilidad de oxidación o foto reducción bajo condiciones ambientales, lo que conduce a la agregación y significativa reducción en su actividad antimicrobiana [23][27]. Como solución para este problema se ha propuesto estabilizar las AgNPs, encapsulándolas con diferentes polímeros [28][29], aunque tales polímeros pueden mejorar eficazmente la estabilidad y el rendimiento antibacteriano de los AgNP, a menudo requieren rutas sintéticas complejas y tediosas con alto costo, por lo cual en este proyecto se propone

encapsidar las AgNPs con cápside del virus CCMV formando AgNPs-VLPs evitando problemas de agregación y dando una mayor biocompatibilidad.

1.2. OBJETIVOS

- Síntesis y caracterización de AuNEs, AgNPs y AuNSs por dispersión de luz dinámica (DLS), microscopía electrónica de transmisión (MET) y UV-Vis.
- Evaluación de la estabilidad de las AuNEs, AgNPs y AuNSs con respecto al tiempo.

1.3. HIPÓTESIS

- Las nanopartículas tendrán las propiedades adecuadas para ser utilizadas en nanomedicina, para su utilización en imagenología médica y terapia fototérmica capaz de generar un daño celular en células cancerígenas.

1.4. JUSTIFICACIÓN

La nanotecnología ha avanzado mucho en los últimos años esto debido a que ofrece una alternativa en la detección y tratamiento del cáncer. Siendo esta enfermedad la segunda causa de muerte a nivel mundial [30], por lo cual es necesario el desarrollo de nuevos tratamientos más efectivos.

En los últimos años los estudios con nanopartículas en el sector biomédico han aumentado debido a algunas de sus características, como por ejemplo sus propiedades fototérmicas, ya que destruyen las células cancerosas por hipertermia, además transportar fármacos directamente al tumor maligno para destruirlo, sin dañar las células sanas.

La primera etapa de este proyecto fue la caracterización y síntesis de una nanopartícula con las propiedades aptas para ser utilizadas en bionanomedicina,

además de poseer una estabilidad adecuada y ser biocompatible para utilizarse en células cancerosas.

1.5. METODOLOGÍA

1.5.1. Síntesis de AuNEs

Para la síntesis de AuNEs negativas de 18 nm se utilizó el método de Turkevich invertido [31], este método utiliza CitNa como agente reductor en presencia de ácido cloroáurico (HAuCl_4).

Con el fin de obtener las AuNEs con características optimas se utilizó una relación molar (MR) de 3.4 NaCit/ HAuCl_4 , por lo cual en un matraz balón de 25mL se colocó una concentración de NaCit de 3.4 mM, el cual se colocó en una placa calentamiento y agitación a una temperatura de $100^\circ\text{C} \pm 5$, cuando la muestra tomó esta temperatura se añadirá una solución de HAuCl_4 a 1 mM hasta que la muestra tome una coloración rojo rubí como se observa en la figura 3.



Figura 3 Color característico posterior a la síntesis de las AuNEs.

1.5.2. Síntesis de AgNPs

La formación de las AgNPs se llevó a cabo siguiendo el método de Lee-Meisel [32], este consiste en el crecimiento de una partícula de plata de 4nm la cual figurará como semilla (Ag-Seed), las Ag-Seeds se obtienen a partir de una reacción de 6.8 mM CitNa como agente estabilizante, 1 mM AgNO_3 y 5.29 mM NaBH_4 como agente reductor en agitación vigorosa a una temperatura de 70°C.

Se continua con el crecimiento de Ag-Seeds, en un matraz de fondo plano se agregan 18 mL de 0.7mM de CitNa como agente reductor y estabilizante a una temperatura de 100°C, posteriormente se agregan 2mL de Ag-Seeds y 1mM de AgNO_3 , siempre conservando la temperatura para obtener las AgNPs de 18nm cargadas negativamente (Figura 4). Las partículas son analizadas por DLS, UV/vis y MET.



Figura 4 Coloración característica de las AgNPs de 18 nm.

1.5.3. Síntesis de AuNSs

El procedimiento para la formación de las AuNSs es un método relativamente nuevo, para la síntesis fue necesario una partícula de plata la cual sufre oxidación, se utilizó una relación volumen/volumen 1:1 de solución de AgNPs las cuales fueron realizadas anteriormente con una solución de 1.8 mM K_2CO_3 y 0.5 mM $HauCl_4$ en agitación vigorosa a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó un lavado y concentrado de las AuNSs por centrifugación en una centrifuga de mesa (Heraeus Biofuge Stratus) a 12000 g por 10 minutos, finalizando se recupera el pellet y fue resuspendido en agua doblemente desionizada observando un color azul como se muestra en la figura 5 y fueron analizadas las partículas por DLS, Zetámetro, UV/Vis y MET[33].



Figura 5 Color característico posterior de la síntesis de las AuNSs.

1.5.4. Pruebas de estabilidad de las AuNPs

Una característica que se busca en las nanopartículas es la estabilidad, por lo cual es importante conocer las variaciones que estas puedan presentar con el tiempo y a diferentes condiciones, para este proyecto el primer factor a medir fue el tiempo, para esto se tomaron alícuotas de AuNEs, AgNPs y AuNSs y se midieron por DLS el día 1 y a través de los días para observar si existían cambios considerables, otro factor importante a estudiar fue el cambio del tamaño y del potencial Z en una escala de pH de (3-7.4), se utilizó buffer de citratos para los pH bajos y buffer de fosfatos para los pH arriba de 6, en base a la siguiente bibliografía [34], las mediciones fueron realizadas en DLS.

1.6. RESULTADOS

1.6.1. Síntesis de AuNPs

En el transcurso del proyecto se realizó la síntesis de 3 tipos diferentes de nanopartículas, las cuales se detallarán a continuación:

1.6.1.1. AuNEs

Las AuNEs fueron creadas mediante el método de Turkevich utilizando una relación molar (MR) de 3.4, estas se caracterizaron mediante DLS, MET y espectroscopía UV-Vis. En la figura 6 a) se puede observar una imagen típica de microscopía electrónica de transmisión de las AuNEs sintetizadas, en la cual se muestran AuNEs con un tamaño promedio de 12 ± 0.9147853 nm, medidas con el programa imageJ de formato libre, en la figura 6 b) se puede observar el tamaño obtenido en DLS de 12.1 ± 1.2 con un índice de polidispersidad (PDI) de 0.21 comprobando el tamaño obtenido en MET.

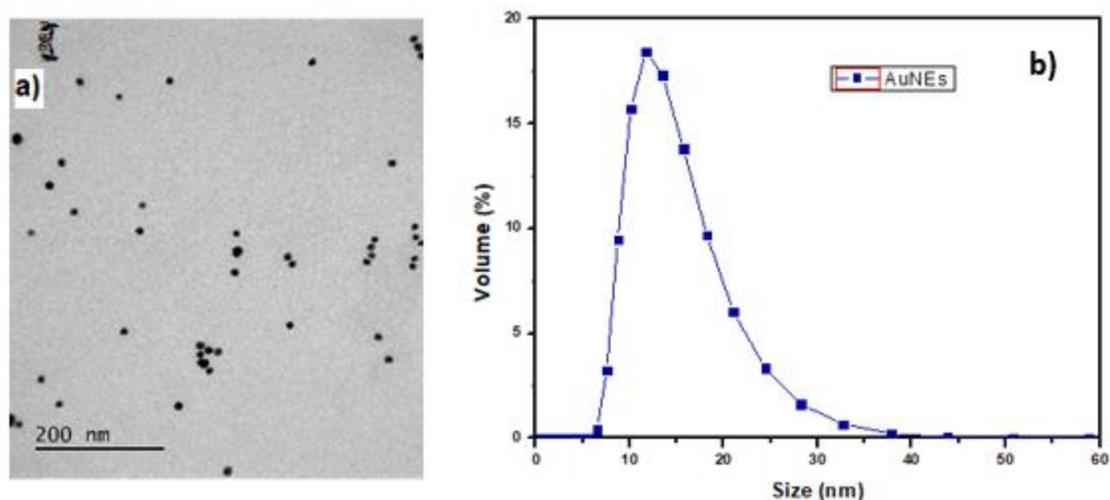


Figura 6 a) Imagen representativa de AuNEs en MET, b) Pico clásico de las AuNEs en DLS.

Con estos resultados se puede apreciar una buena monodispersidad, al poseer esta característica nos afirma que no se encuentran agregadas, además en la figura 7 se podemos observar el espectro de absorbancia donde el pico máximo característico se encuentra a una longitud de onda de 530 nm como resultado de la morfología.

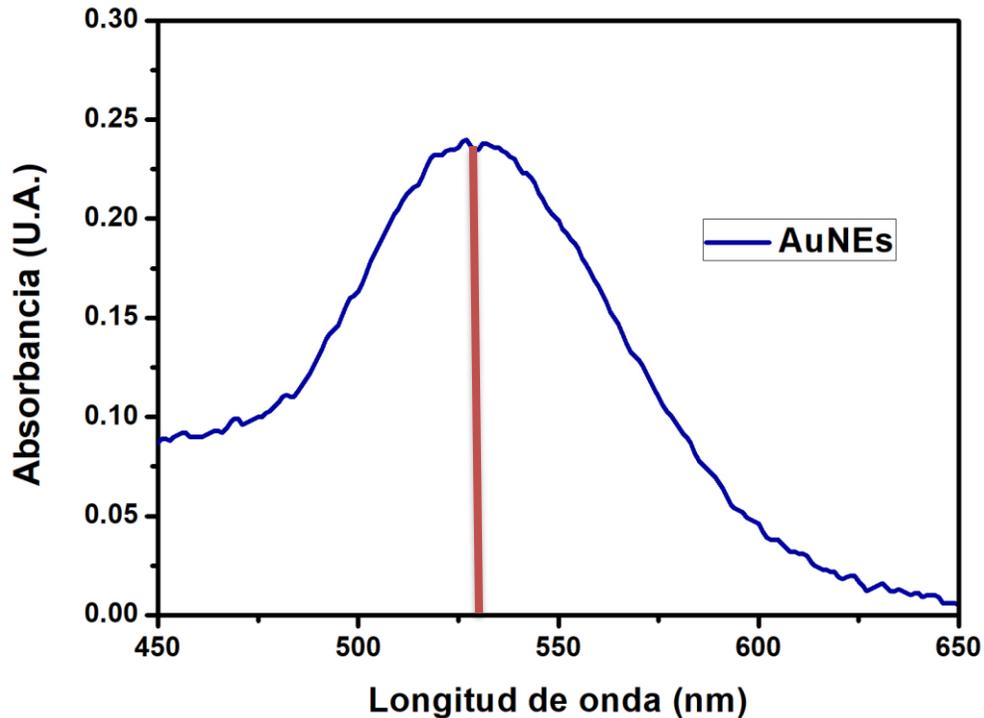


Figura 7 Espectro de absorbancia de AUNEs.

Debido al pico de absorción en un rango de 530 nm las AuNEs no son óptimas para utilizarse en terapia fototérmica, ya que para esta terapia se busca que el pico de absorción se encuentre arriba de los 600 nm, pero gracias a la buena monodispersidad y al contraste que estas presentan, las hace ideales para poder ser funcionalizadas, utilizándose en técnicas de imagenología médica, como lo son las terapias de

inmunotinción donde se utiliza una AuNEs conjugada con anticuerpos que se unen a antígenos, proporcionando una visualización por contraste utilizando MET[35].

1.6.1.2. AuNSs

La síntesis de las AuNSs se llevó a cabo en una relación 1:1 volumen/volumen de AgNPs y una solución de 1.8 mM de K_2CO_3 y 0.5 mM de $HAuCl_4$ [33].

Como se mencionó en la metodología, para la síntesis de las AuNSs primero es necesario la creación de una semilla de plata de 4 nm, las cuales se muestran en la figura 8 A), en la figura 8 B) se muestra el resultado del crecimiento de la nanopartícula de plata, podemos apreciar un tamaño de 17 nm de diámetro, por último en la figura 8 C) y D) se observan las AuNSs con un diámetro de 20.45 ± 4.4 nm y un espesor de 5.12 ± 1.12 nm donde el tamaño fue determinado con el programa imageJ, este valor es importante ya que entre más delgada sea la capa de oro tiene una longitud de onda cercana al infrarrojo y el espesor depende del porcentaje de solución de 1.8 mM K_2CO_3 y 0.5 mM $HAuCl_4$. También se puede observar que el tamaño del grosor en la partícula no es un tamaño uniforme, si no que tiene unos espacios donde el grosor disminuye, esta característica nos podría indicar que el tiempo de vida de la partícula puede disminuir ya que podría comenzar un fenómeno conocido como maduración de Ostwald, lo que haría que la partícula colapsara.

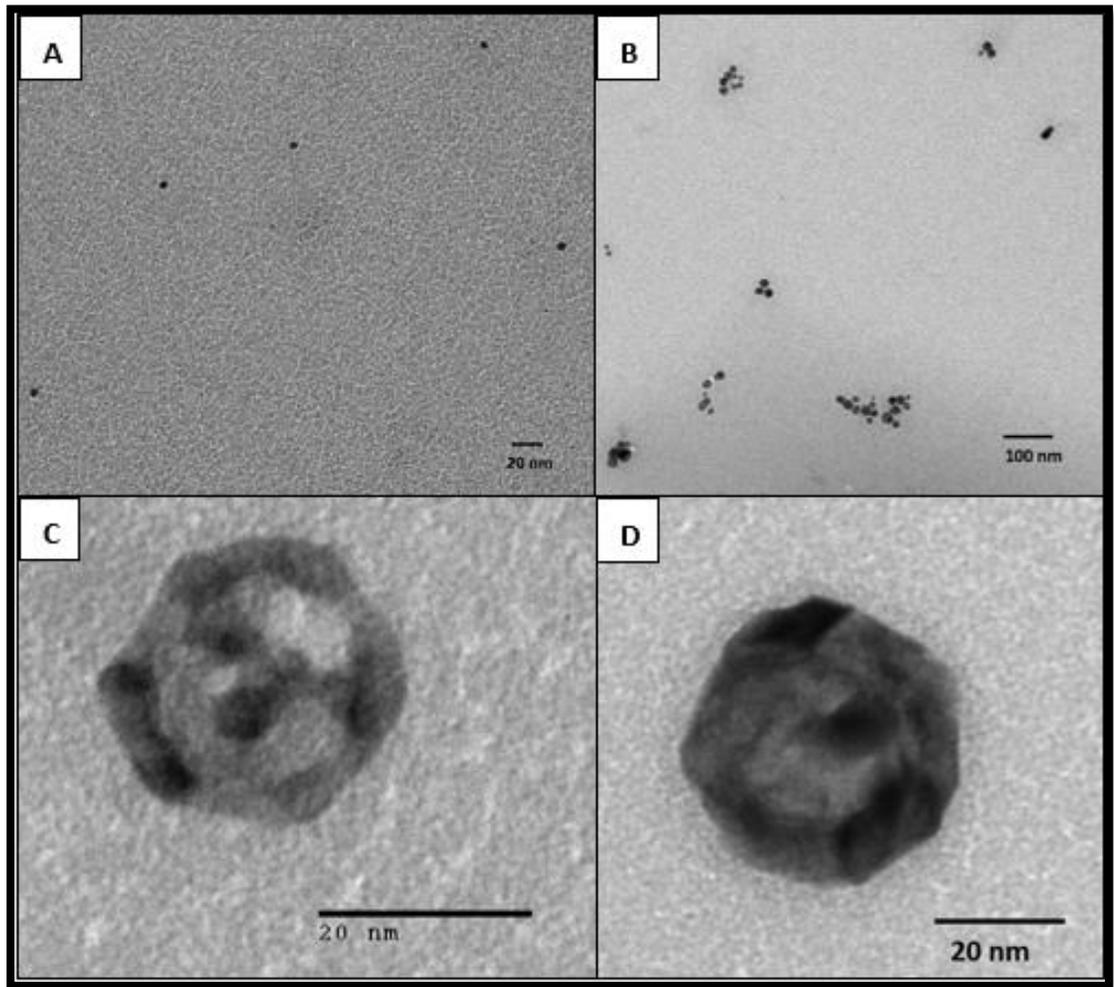


Figura 8 Imagen característica de MET de A) AgSeeds de 4nm, B)AgNPs de 17 nm, C)D) AuNSs 21 nm.

En la figura 9 a) se observa un diagrama de distribución de tamaño en donde se puede apreciar un pico máximo en 16 nm, al mostrar este pico máximo se podría pensar que no todas las partículas de plata se oxidan convirtiéndose en AuNSs, pero mediante los estudios de MET no se aprecia una cantidad de AgNPs, además en la figura 9 b) se muestra una curva de absorbancia característica de las AuNSs donde el pico de absorbancia está en 690 nm, esto nos ayudaría a confirmar que se realizó con éxito la síntesis de las AuNSs ya que el pico característico de las AgNPs de 17 nm se

encuentra en 400 nm, al obtener la absorbancia en este valor hace adecuada estas nanopartículas para su uso en terapia fototérmica, ya que su absorbancia se encuentra donde no absorben los tejidos celulares, por esta razón al ser irradiadas solo se afectaría el área deseada.

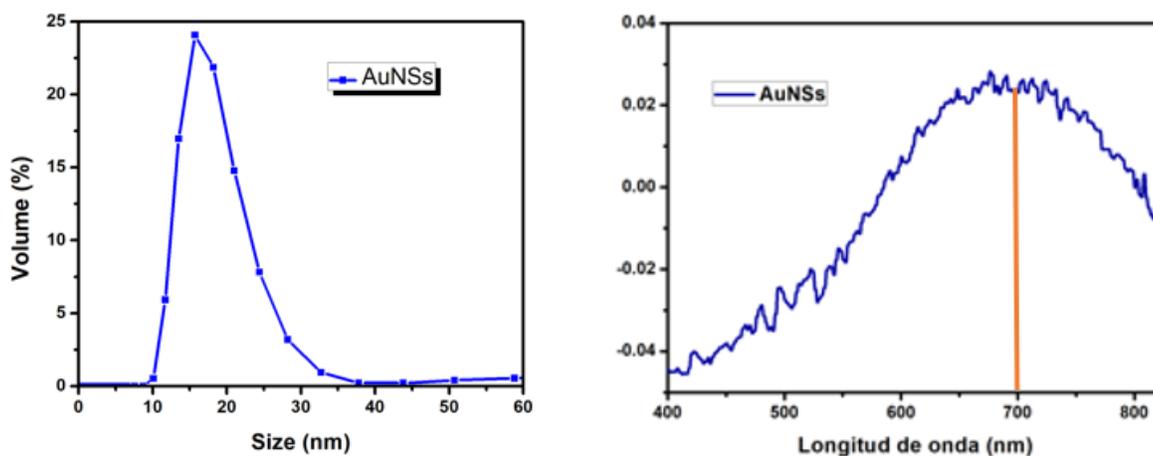


Figura 9 a) Curva representativa del tamaño de AuNSs utilizando DLS, b) curva representativa UV-vis donde se observa el pico de absorbancia en 680 nm

1.6.1.3. AgNPs

Las AgNPs son una de las nanopartículas metálicas con mucha popularidad, esto debido a sus propiedades antimicrobianas, en la actualidad ya se están utilizando en diferentes áreas de la ciencia, la síntesis se puede llevar a cabo con diferentes metodologías y precursores, para este proyecto la síntesis de las AgNPs se llevó a cabo mediante el crecimiento de semilla, en la figura 10 a) se observa una imagen obtenida en MET donde se observan AgNPs de 17.3 nm \pm 3.62 nm con un PDI de

0.225 donde el tamaño fue determinado usando el programa ImagenJ, estos tamaños fueron corroborados por DLS (figura 10b)) y AFM (figura 10 c)).

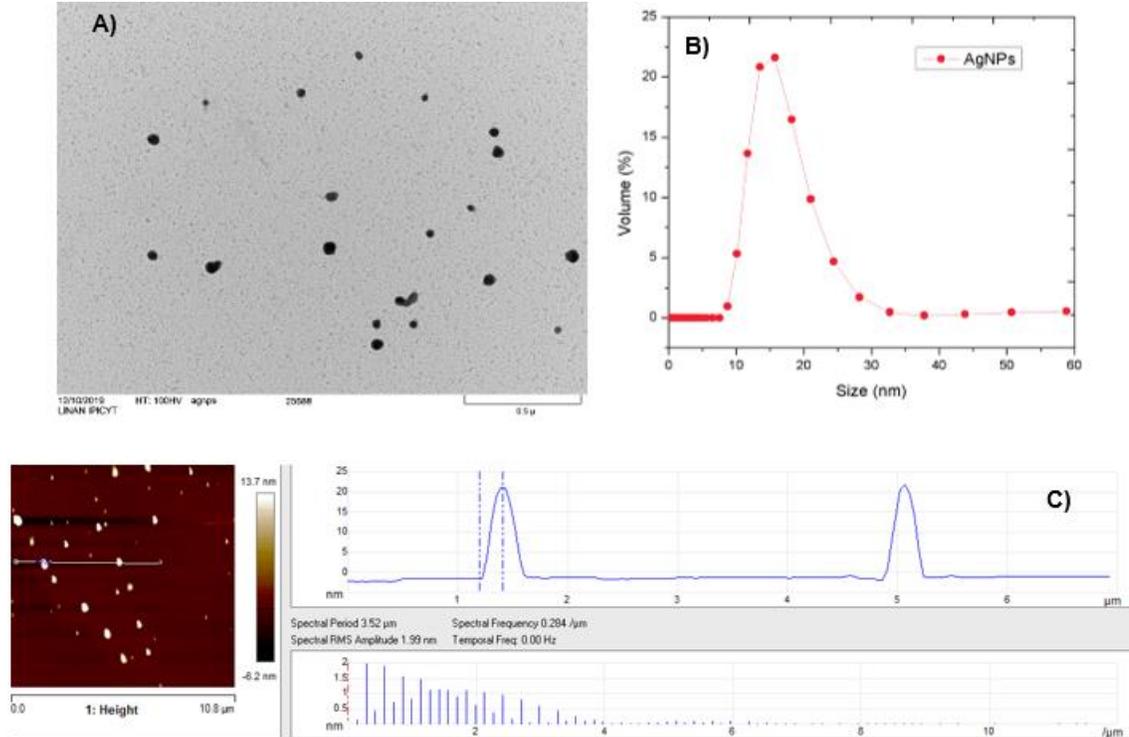


Figura 10 a) Imagen en MET AgNPs b) Gráfica tomada en DLS de AgNPs c) Imagen representativa de AFM que muestra el tamaño de las AGNPs

En la figura 11 se aprecia el pico de absorbancia medido en UV-vis en 400 nm, lo cual es característico para las nanopartículas de plata. Cabe recalcar que estudios anteriores muestran que las AgNPs tienden a oxidarse al estar en contacto con el medio ambiente[36], lo que reducirá su tiempo de vida, por lo cual una alternativa es encapsular estas partículas para aumentar el tiempo de vida.

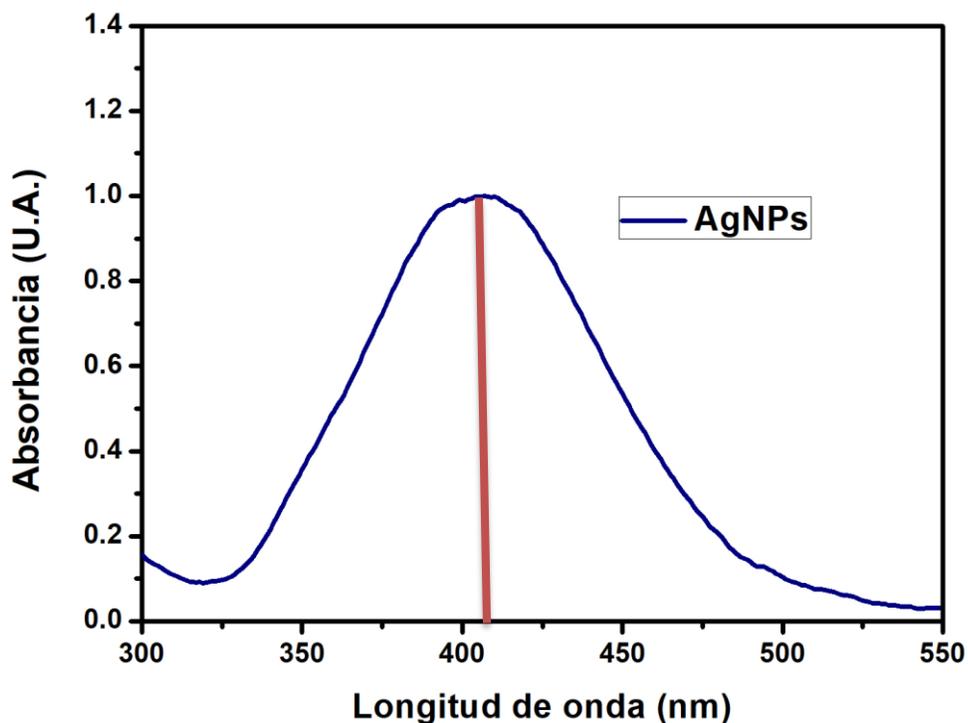


Figura 11 Pico de absorbancia característico de las AgNPS.

1.6.2. Pruebas de estabilidad de las nanopartículas

Medir la estabilidad de las nanopartículas es necesario en la biomedicina, ya que esta es una característica muy importante cuando serán utilizadas en el futuro en cuerpos biológicos, por este motivo en este proyecto se midió el cambio del tamaño en un periodo de tiempo determinado para cada nano partícula evaluado mediante DLS.

- **AuNEs (30-60 días)**

La estabilidad de las AuNEs se midió en DLS por un tiempo de 60 días en donde estas se almacenaron a temperatura ambiente. La figura 12 nos muestra dos curvas, la primera de ellas se observa en azul y corresponde a un tiempo de 30 días posterior

a la síntesis de las AuNEs, la segunda de ellas se muestra en color rojo correspondiente a un tiempo de 60 días, en esta comparación se observa que en los 30 días la curva se recorrió levemente hacia la izquierda lo cual nos indicaría una disminución en el tamaño, aunque esta no es significativa. La estabilidad que estas muestran con respecto al tiempo las hace aptas para poder ser utilizadas en aplicaciones biomédicas.

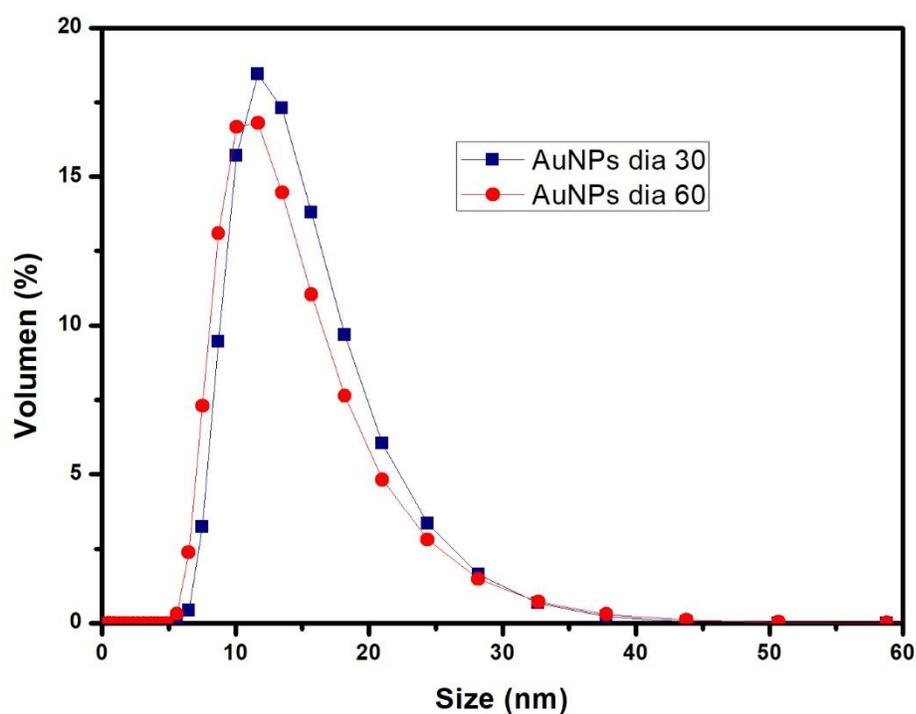


Figura 12 Prueba de estabilidad de las AuNEs donde se muestra el espectro de tamaño del día 30 y del día 60.

- AuNSs (1-20 días)

La estabilidad de las AuNSs se evaluó durante un período de 20 días, este fenómeno se muestra en la figura 13, en donde se observan dos curvas, la primera en color rojo que muestra el tamaño el día de síntesis y la otra en color azul donde se observa como el tamaño se desplaza hacia lado izquierdo, el tamaño disminuyó considerablemente ya que se observa una disminución del 40%, este fenómeno se debe a que la presión de las nanopartículas es muy alta y hace que colapsen fragmentándose, cuando se habla de la utilización de una nanopartícula en el área biomédica se necesita que presenten estabilidad, al no poseer esta característica una opción viable para es la encapsulación de las AuNSs.

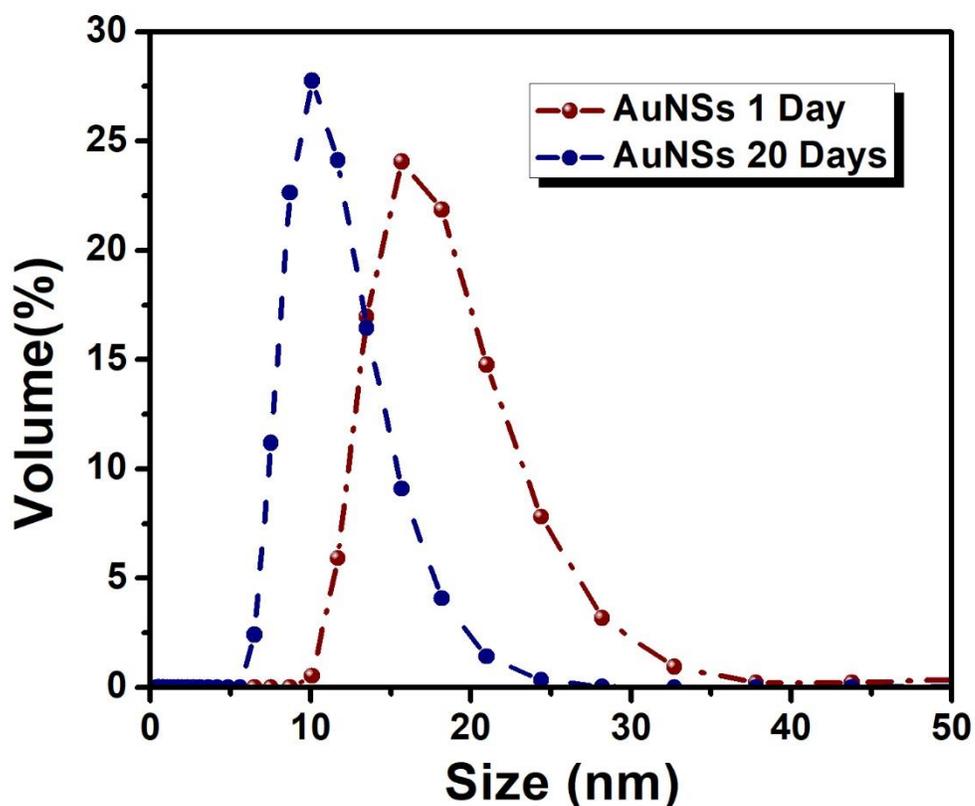


Figura 13 Prueba de estabilidad de AuNSs día 1-20

- **AgNPs (1-30 días)**

El estudio de la evaluación de las AgNPs se llevó a cabo por 30 días, en la figura 14 podemos observar la gráfica obtenida por DLS, donde en color verde se muestra la curva el día de síntesis obteniendo un pico máximo que correspondería a un tamaño de 12 nm y otra curva muy poco notable de 40 a 60 nm, cuando se realizó la medición al día 30 que se observa en color morado se logra observar un cambio significativo en el tamaño, ya que el pico máximo se desplazó hacia la derecha, formando partículas más grandes, lo que sugiere que estas partículas se están agregando, por lo que su tiempo de vida sería muy corto y esto sería un impedimento al momento de querer ser utilizadas en áreas biomédicas.

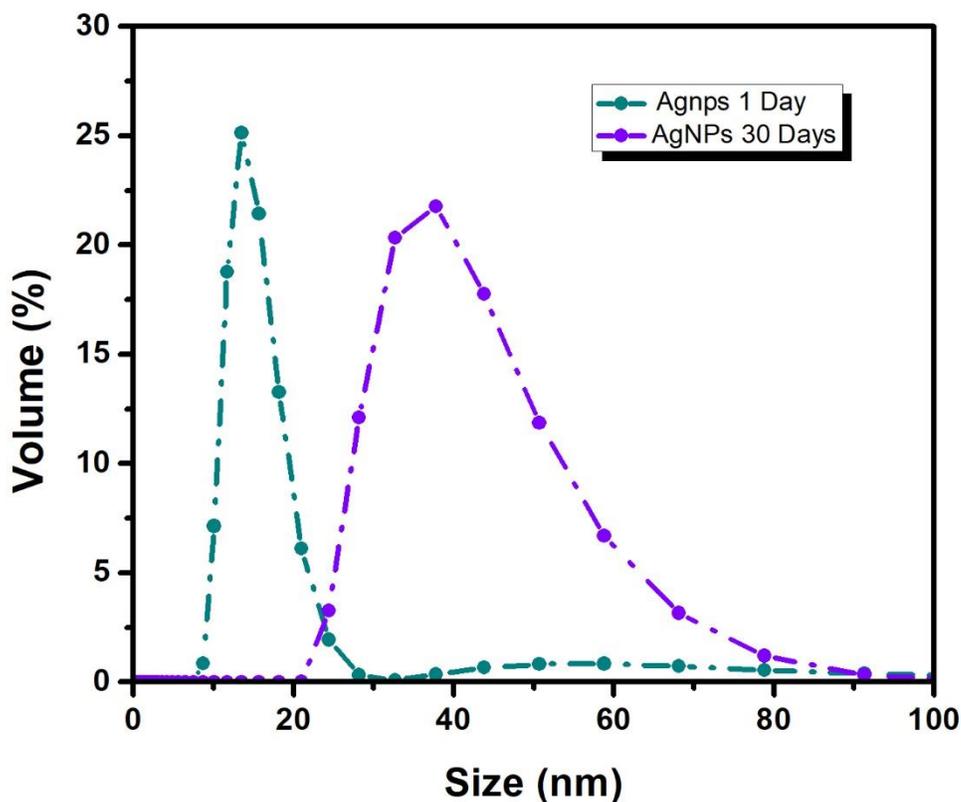


Figura 14 Medición de la estabilidad de las AgNPs mediante DLS 30 días.

1.6.3. Estabilidad de las AuNEs vs pH

Las AuNEs fueron las nanopartículas que mostraron una mejor estabilidad con respecto al tiempo, por lo que para ser incorporadas en células un estudio importante es la evaluación del cambio, ya que en el cuerpo humano el pH no es constante, para este experimento se llevó a cabo una serie de diálisis con distintos pH por un periodo de 24 h (figura 15). Cabe recalcar que el pH que estas presentan posterior a la síntesis es de 7.3, con lo que el cambio más significativo se muestra en un pH 4, donde el tamaño de partícula cambia de 17.5 a 19.5 nm.

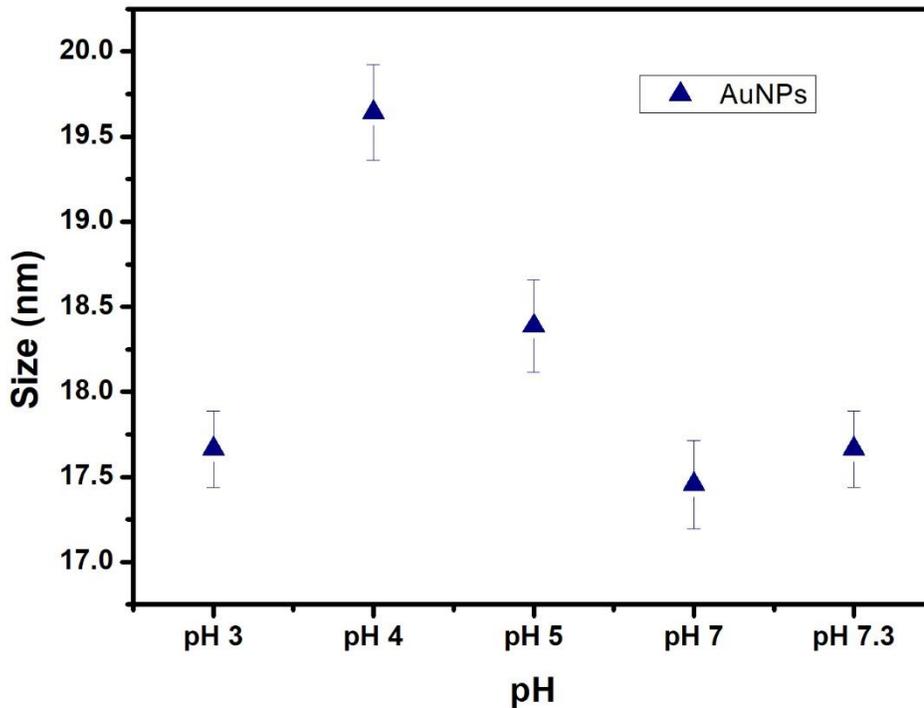


Figura 15 Evaluación de la estabilidad del tamaño vs el pH

Otro estudio que se llevó a cabo fue la evaluación del potencial Zeta de las AuNEs y las AgNPs en pH de 3 a 7, al medir la carga de las partículas nos ayuda a corroborar si al momento de encapsular con algún polímero o cápside existirá atracción o repulsión, en la figura 16 podemos observar que los puntos máximos se encuentran 7.3 para las AuNEs y 5.4 para las AgNPs, estos puntos son los encontrados el día de la síntesis de las partículas, al ser sometidos a un cambio de pH de observa una disminución en el potencial de un 40% aproximadamente, lo cual es un punto a considerar para los experimentos posteriores de encapsidación.

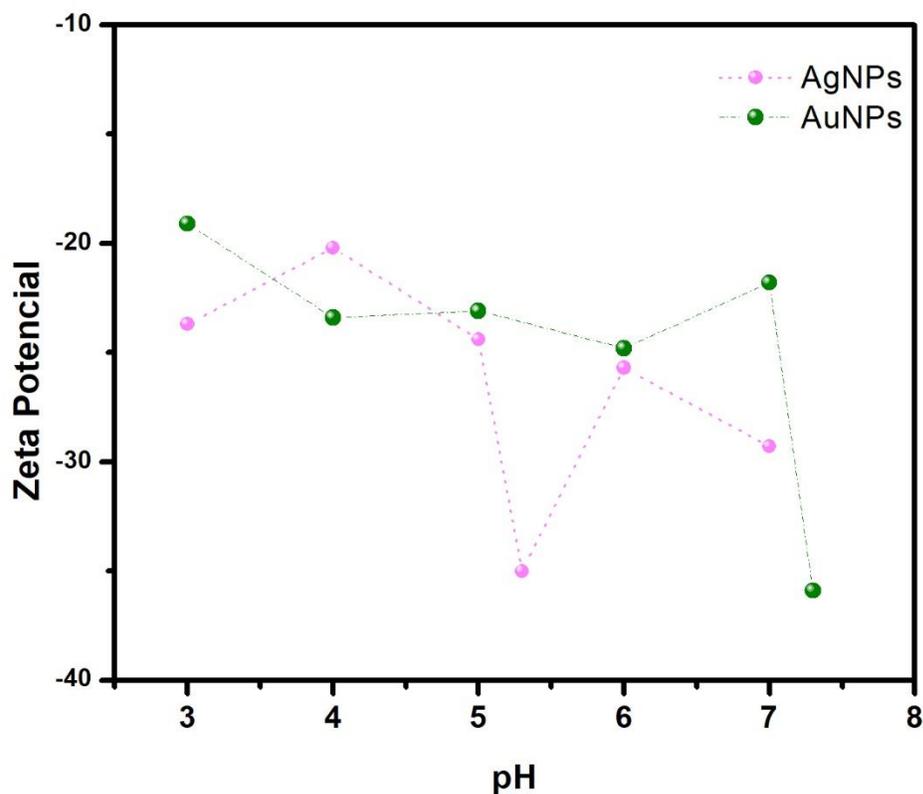


Figura 16 Evaluación de la estabilidad del potencial ZETA de las AuNPs y AgNPs en diferentes pH.

1.7. CONCLUSIONES

Se logró cumplir el objetivo para la primera fase de este proyecto que consistió en la caracterización y síntesis de tres tipos de nanopartículas, las primera de ellas fueron las AuNEs las cuales se lograron sintetizar por el método de Turkevich invertido con un tamaño de 12 ± 0.9147853 nm corroborando este tamaño mediante DLS y MET, además se evaluó la estabilidad del tamaño con respecto al tiempo en un rango

de 60 días obteniendo una disminución en el tamaño la cual no muestra un cambio significativo, siendo adecuadas para ser internalizadas en células HEK-293.

Las segundas nanopartículas que se lograron sintetizar fueron las AuNSs, las cuales presentaban un tamaño de 20.45 ± 4.4 nm y un espesor de 5.12 ± 1.12 nm y una curva de absorbancia arriba de 600 nm haciéndolas adecuadas para terapia fototérmica, una desventaja que presentaron estas nanopartículas fue al momento de la evaluación del tamaño ya a los 20 días posterior a la síntesis ya presenta una reducción significativa en el tamaño, por lo tanto para futuros experimentos y aumentar la estabilidad se sugiere ser encapsuladas.

Las terceras nanopartículas que se realizaron fueron las AgNPs, estas se utilizaron como precursor para las AuNSs, cabe destacar que la principal característica de estas nanopartículas es su actividad antimicrobiana pero como se observó en los resultados tienden a aglomerarse formando partículas más grandes, reduciendo el tiempo que estas pueden estar expuestas.

CAPÍTULO II “ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE ENTRADA DE LAS AuNEs CON RESPECTO AL TIEMPO EN CÉLULAS HEK-293”

2.1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, según la OMS es la principal causa de muerte en el mundo: en 2020 se atribuyeron a esta enfermedad casi 10 millones de defunciones, es decir, casi una de cada seis de las que se registran. Muchos casos se pueden curar si se detectan a tiempo y se tratan

eficazmente, por lo tanto, es necesaria la búsqueda de nuevas terapias o tratamientos, que permitan una mejor respuesta a los medicamentos y con menos efectos adversos.

Ante la necesidad de nuevas terapias más eficientes en el área de la nanomedicina surgen las nanopartículas, las cuales; podrían ayudar en el reconocimiento de los sitios de enfermedad, permitir su visualización en aplicaciones como imagenología médica y administración de compuestos terapéuticos de manera segura [37]. Un aspecto que considerar es la interacción que existe de estos con las células, en específico el conocer el mecanismo de absorción de las nanopartículas. Dos procesos fundamentales a la hora de evaluar si existe efectos citotóxicos celulares causados por las nanopartículas son la endocitosis y exocitosis, la endocitosis nos definirá el mecanismo de entrada de las nanopartículas y la exocitosis el mecanismo de eliminación de estas de las células. Por esta razón la segunda fase de este proyecto se centró en la evaluación de los mecanismos de endocitosis y exocitosis de AuNEs en células HEK-293.

Se optó por el uso de AuNEs, debido a las características que se observaron en el capítulo anterior. El estudio de los mecanismos de exocitosis y endocitosis se llevó a cabo con la preparación de muestras de células en cultivo interactuando con AuNEs a los tiempos 24,48 y 72 horas. La visualización de los tejidos celulares se realizó utilizando la técnica de MET. La evaluación de los efectos de la toxicidad que ocasionaron las AuNEs en las células se centró en el análisis de los efectos morfológicos y alteraciones que se pudieran observar, como cambios morfológicos mitocondriales, afectación en núcleo, etc.

2.1.1. Mecanismos de endocitosis y exocitosis celular

Para mantener el equilibrio celular es necesario tener interacción con el medio que la rodea, agregando nuevos nutrientes y desechando lo que ya no necesita, esto es

realizado mediante endocitosis y exocitosis [38]. La endocitosis es un mecanismo de control de la composición de la membrana plasmática, que ayuda a las células a interactuar con su ambiente. Existen varias formas de endocitosis en las que una molécula puede entrar a una célula, esto va a depender del tipo de molécula que se internaliza y el componente que cubre la vesícula (clatrina, caveolina, flotilina, etc), la participación de GTPasas en el proceso, el mecanismo de escisión de la vesícula de la membrana y la participación del citoesqueleto de actina, entre otros, como se puede observar en la figura 17.

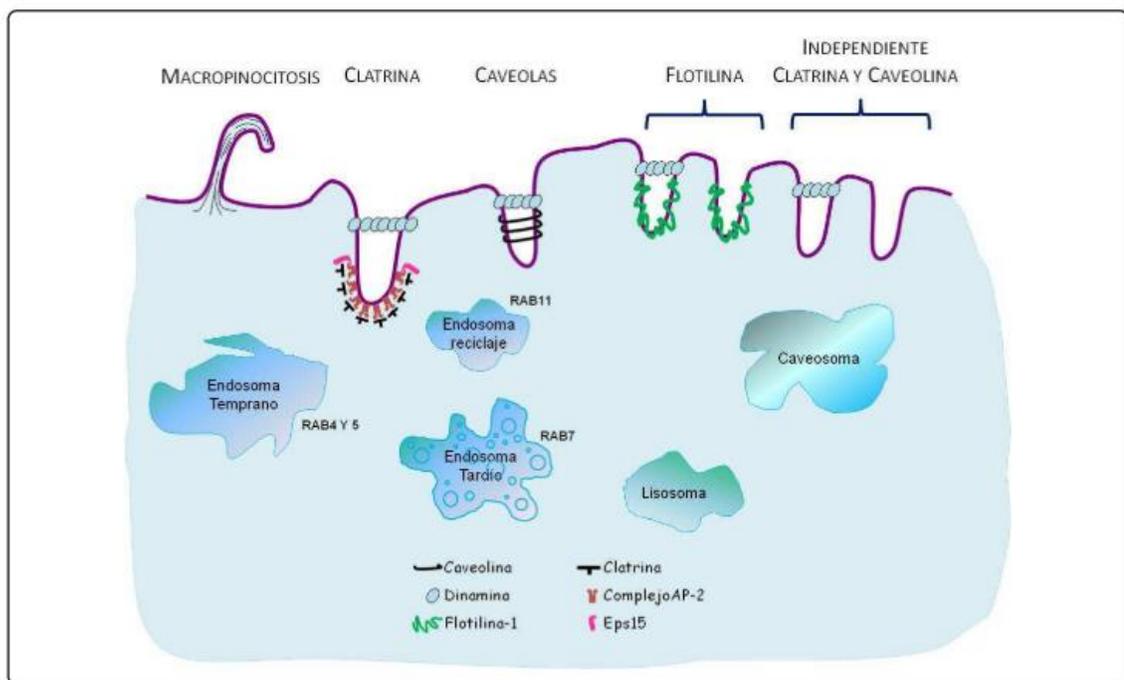


Figura 17 Mecanismos de entrada por endocitosis imagen tomada de la referencia [39].

Por otra parte la exocitosis es la excreción de materiales celulares a través de la liberación de vesículas unidas a la membrana. Este es un proceso biológico celular fundamental, y es crucial en la comunicación celular.

2.1.2. AuNEs como agentes de contraste

En la actualidad existen modalidades de imagen en las que ya se utilizan AuNEs, las cuales son técnicas importantes para la detección de cáncer humano, como lo son:

- Imagen de resonancia magnética (MRI): La resonancia magnética es una modalidad de imagen no invasiva que se utiliza con frecuencia en la medicina para el diagnóstico de enfermedades, la obtención de imágenes moleculares y el seguimiento celular, debido a su alta resolución y excelente contraste de tejidos blandos[40].
- Tomografía computarizada (TC) e imágenes nucleares: la tomografía computarizada (TC) es una modalidad de imagen ampliamente utilizada, utiliza rayos X y detectores para crear imágenes transversales del cuerpo con alta resolución. En comparación con los agentes de contraste de yodo (que tienen un efecto renal alto), las AuNEs tienen un contraste dos veces mayor que el yodo, por lo que resultan atractivos para mejorar las imágenes por TC[41].
- Imágenes fotoacústicas (PAI): es una modalidad de imagen no invasiva que puede monitorear en tiempo real las señales anatómicas, funcionales y moleculares de los tejidos enfermos con una alta resolución. La frecuencia de resonancia puede cambiar, dependiendo del tamaño y forma de las AuNP.
- Imágenes de fluorescencia de rayos X: se refiere a los fotones que son excitados por una fuente de rayos X, esta tecnología nos proporciona evidencia directa de las AuNP y muestra un gran potencial para obtener imágenes in vivo.

Las propiedades de las AuNP han permitido sus aplicaciones como agentes de contraste en imágenes de resonancia magnética, TC e imágenes nucleares, imágenes de fluorescencia, imágenes fotoacústicas, e imágenes de fluorescencia de rayos X.

2.2. OBJETIVO

Evaluación de los daños morfológicos generados por las AuNEs en células HEK-293, con el fin de ayudar en la búsqueda de terapias más efectivas.

2.3. HIPÓTESIS

Las AuNEs son capaces de introducirse a la célula, para servir como contraste en imagenología médica, mostrando nulo efecto citotóxico.

2.4. JUSTIFICACIÓN

Se estima que para el 2040 los casos de cáncer se incrementarán en un 65%, por esta razón es necesario el desarrollo de nuevas terapias, que tengan menos efectos adversos que las terapias actuales: quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia. Ante esta necesidad el uso de la nanomedicina, en particular de las nanopartículas, podrían permitir el reconocimiento de los sitios de enfermedad, la visualización en aplicaciones como imagenología médica y permitir la administración de compuestos terapéuticos de manera segura.

En consecuencia, la segunda etapa de este proyecto se basó en la evaluación de los daños que puedan presentar las células HEK-293 den presencia de las AuNEs, además de los métodos de entrada a la célula, para determinar los efectos secundarios que pudieran tener, con el fin de ayudar en la búsqueda de terapias más efectivas.

2.5. METODOLOGÍA

2.5.1. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular HEK-293 estas células son provenientes de células de riñón de embrión humano y es una de las líneas celulares más utilizadas debido a su facilidad de crecimiento y mantenimiento, con una alta tasa de reproductividad. En una placa de 24 pozos se sembraron 2×10^4 células/ 100 μL por pozo (0.32 cm^2) y se incubaron toda la noche a 37°C , 5% de CO_2 y 95% de humedad.

Las nanopartículas fueron depositadas en una relación 100:1 (AuNEs: célula), se añadieron en el cultivo celular con los siguientes tiempos; 72, 48 y 24 horas, además se realizó un control positivo (las AuNEs fueron depositadas una hora post-fijación) y un control negativo (libre de AuNEs) como se muestra en la figura 18.

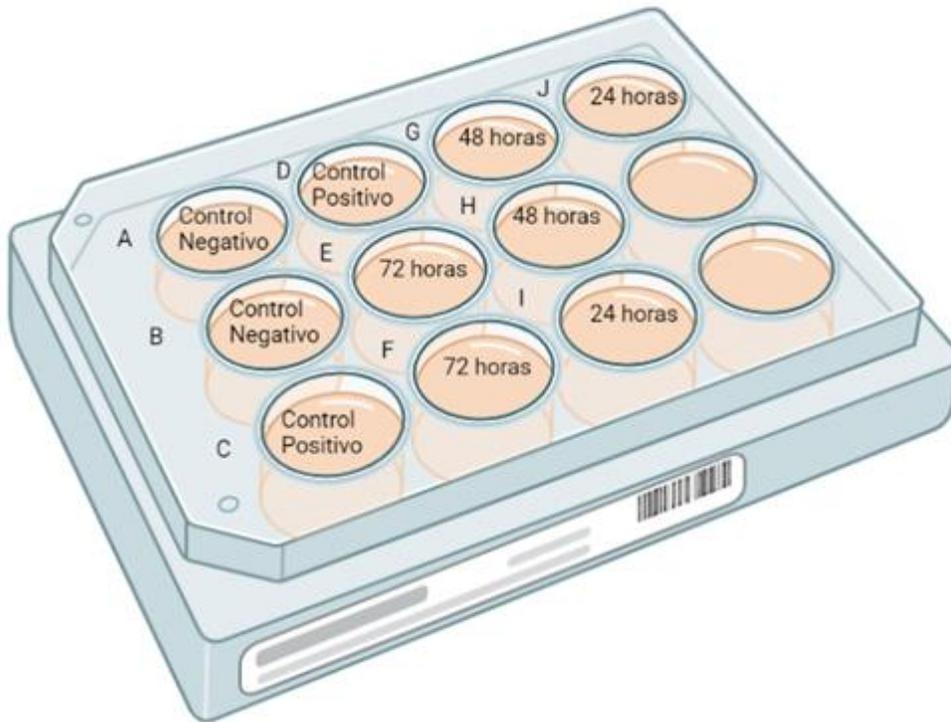


Figura 18 Placa de cultivo celular HEK-293.

2.5.2. Fijación in situ del monocapa celular para muestras en MET

Para poder observar un material biológico en el MET, es necesario utilizar fijadores para estabilizar la estructura de las células en la transición del proceso dinámico a estático[42].

Pasado el tiempo de cultivo se retiró el medio y se agregó el primer fijador que consistía en 2% de glutaraldehído y 0.1 M buffer cacodilato previamente calentado, se dejó por una hora a temperatura ambiente y se llevó a almacenamiento a 4°C.

El siguiente paso fue una serie de lavados con buffer de cacodilato de sodio al 0.1 M, posteriormente se realizó una segunda fijación con tetra óxido de osmio y un lavado más con acetato de uranilo y sodio como se describe en la tabla 1.

Tabla 1 Fijacion del cultivo celular

REACTIVO			TIEMPO (MIN)	MESA	CAMPANA	No. De repeticiones
Buffer	0.1	M	10	X		3
cacodilato		de				
sodio						
1% Tetraóxido	de		60		X	1
Osmio		en				
Cacodilato		de				
sodio						
Buffer	0.1	M	10		X	2
Cacodilato		de				
Sodio						
Buffer	0.1	M	10	X		1
Acetato de Sodio						
0.5% Acetato	de		60		X	1
Uranilo en Acetato						
de Sodio						
Buffer	0.1	M	10		X	3
Acetato de Sodio						

El último paso consistió en 3 lavados de 10 min c/u con agua doblemente desionizada, dejando la muestra durante 24 horas con el agua del último lavado. Todos los pasos se llevaron a cabo en placa de agitación para garantizar una penetración y un equilibrio completo en las células.

2.5.3. Deshidratación

El proceso deshidratación consiste en el remplazo de la cantidad de solución acuosa celular por etanol lo cual nos ayudará a que la resina penetre eficientemente en la célula. Esta se realiza a través de una serie graduada de concentraciones de etanol como se describe en la tabla 2.

Tabla 2 Deshidratación a base de alcohol etílico

ETOH	TIEMPO	NO. DE LAVADOS
35%	10 min	2
50%	10 min	2
70%	10 min	2
95%	10 min	2
100%	10 min	3

2.5.4. Inclusión

En este proyecto se utilizó resina epoxi, ya que esta cuenta con varios beneficios comparada con la parafina, por ejemplo, una extracción mínima de componentes celulares, buena infiltración de la muestra, polimerización uniforme,

características de tinción favorables y secciones estables que soporten el calor intenso y el vacío del MET[43].

El primer paso fue la preparación de la resina por lo cual fue necesario colocar Poly/Bed 812 (21.4g), DDSA (Dodecenylsuccinic Acid) (8.2g), NMA (Nadic Methyl Anhydride) (10.4g) y DMP (2,4,6-TriDimethylaminoethylphenol)(0.56g) en agitación durante 30 min cuidando que no polimerice, posteriormente se colocó en un desecador por 30 min con el objetivo de quitar las burbujas de aire que se pudieran formar, en seguida la muestra se llevó a un desecador en vacío por 30 min.

El siguiente paso consistió en realizar 3 lavados con la resina, siempre cuidando de no generar burbujas. Cada lavado de resina se colocó durante 10 min, posterior se realizó un lavado el cual se dejó durante 24 h, a su vez que la resina se va retirando de la placa de cultivo celular se va colocando en eppendorf de 1.5 ml que nos ayudaran en el futuro como soporte para realizar cortes en ultramicrotomo, por último se realizaron dos lavados, el primero durante 10 min y el siguiente por 48 h en horno a 55 °C para que la resina pueda polimerizar como se muestra en la figura 19.

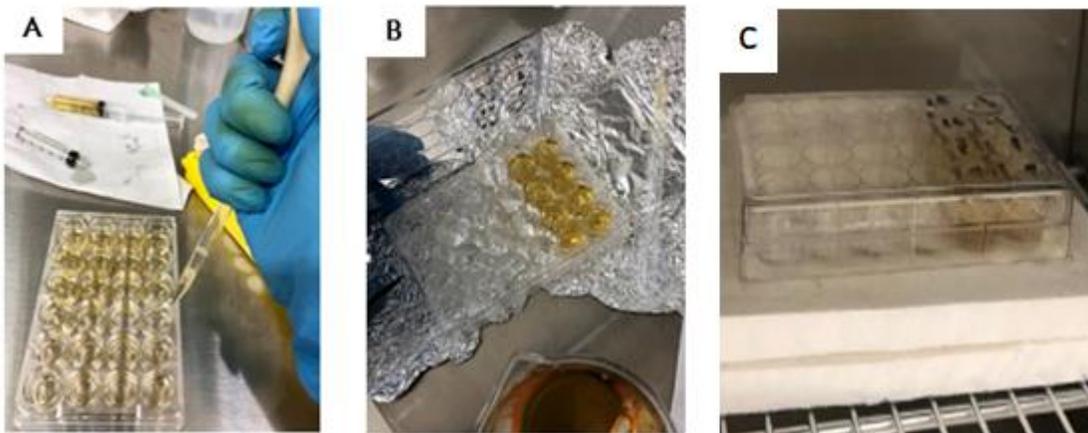


Figura 19 a)b) Preparacion de la resina,c) Proceso de polimeración de resina en horno.

2.5.5. Preparación de cortes para ultramicrotomo

Lo primero a realizar es retirar las placas de plástico, para esto se requiere el uso de un martillo, posteriormente fue necesario crear un choque térmico para romper completamente las placas, utilizando nitrógeno líquido y un horno a 55°C (figura 20), el proceso se repitió tantas veces como fue necesario, una vez que se tenían extraídas las muestras se cortaron estructuras de 1x1 mm.



Figura 20 En esta imagen se puede observar las muestras extraídas de la placa de cultivo posterior a la polimerización.

La resina que anteriormente se colocó en tubos eppendorf de 1.5 ml se metió al horno a polimerizar, posteriormente se retiró el plástico con la ayuda de un exacto, y con la ayuda de un esmerilador se formaron pirámides donde se pegaron los cortes de 1x1 mm extraído de las muestras (figura 21).

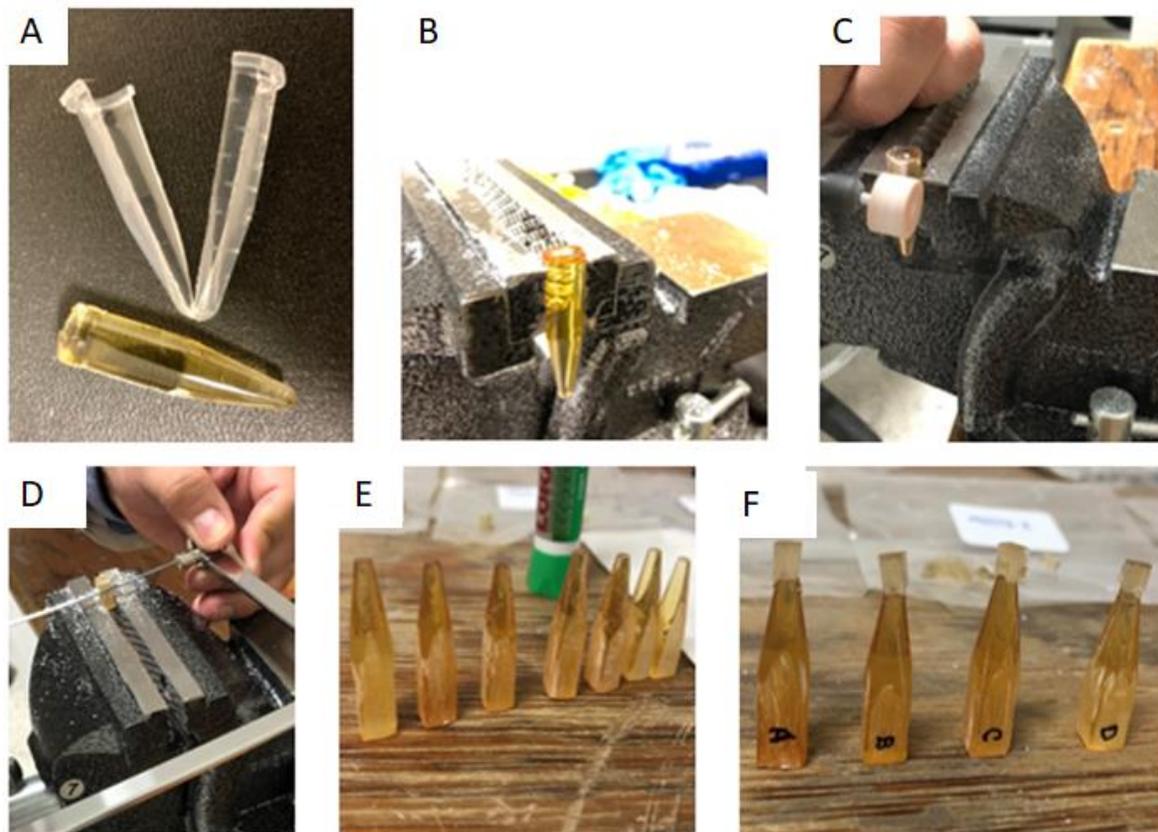


Figura 21 Esquema donde se describe la manera en que se cortan y colocan las muestras en las pirámides formadas por la resina de los tubos de 1.5.

El grosor de los cortes en ultramicrotomo (Leica) fue de 70 nm aproximadamente, para comprobar la presencia de células en los cortes fue necesario verificar tiñendo algunos de los cortes con azul de toluidina (figura 22), para lo cual se depositó una gota de agua doblemente desionizada en el porta objetos, con ayuda de un *loop* de acero se recuperaron los cortes y se depositaron en la gota de agua, se puso en una placa de calentamiento, se esperó a que la gota secase y que el corte quedara adherido a la placa, se agregó colorante azul de toluidina y se retiró el exceso de colorante con agua, para posteriormente verse en microscopio óptico.

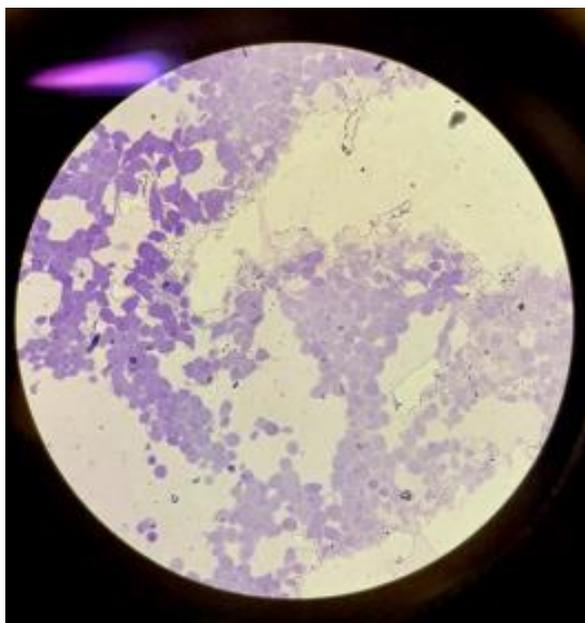


Figura 22 Células vistas en microscopio óptico teñidas con azul de toluidina.

2.5.6. Tinción.

El proceso de tinción de las muestras se llevó a cabo utilizando metales pesados (citrato de plomo y acetato de uranilo), primeramente se adiciono 5 ul de acetato de uranilo durante 1 minuto posteriormente se retiró el exceso de solución con la ayuda de papel filtro y se realizaron tres lavados con agua doblemente desionizada, posteriormente se adicionaron 5 μ l de citrato de plomo durante 1 min, se retiró el exceso de la solución con papel filtro y se nuevamente se realizaron 3 lavados con agua doblemente desionizada. Las muestras son almacenadas en un desecador hasta el momento de ser observadas en MET.

2.6. RESULTADOS

Las nanopartículas utilizadas para la internalización en células fueron las AuNEs, ya que mostraron tener una gran estabilidad por un tiempo prolongado y debido a sus propiedades pueden ser utilizadas en imagenología médica. Para este experimento se realizó un control negativo, control positivo, 72, 48 y 24 h, obteniendo los resultados que se muestran a continuación;

2.6.1. Control negativo

El control negativo se basó en una muestra de células HEK-293, las cuales no habían tenido ninguna modificación, en la figura 23 sección A podemos observar la estructura de la membrana celular, en donde no se observan cambios significativos, si no que se observa una estructura sin alteraciones, a su vez en la sección B observamos una serie de mitocondrias, pero sin contenido de acumulaciones en su interior como se observarán más adelante en otras condiciones,

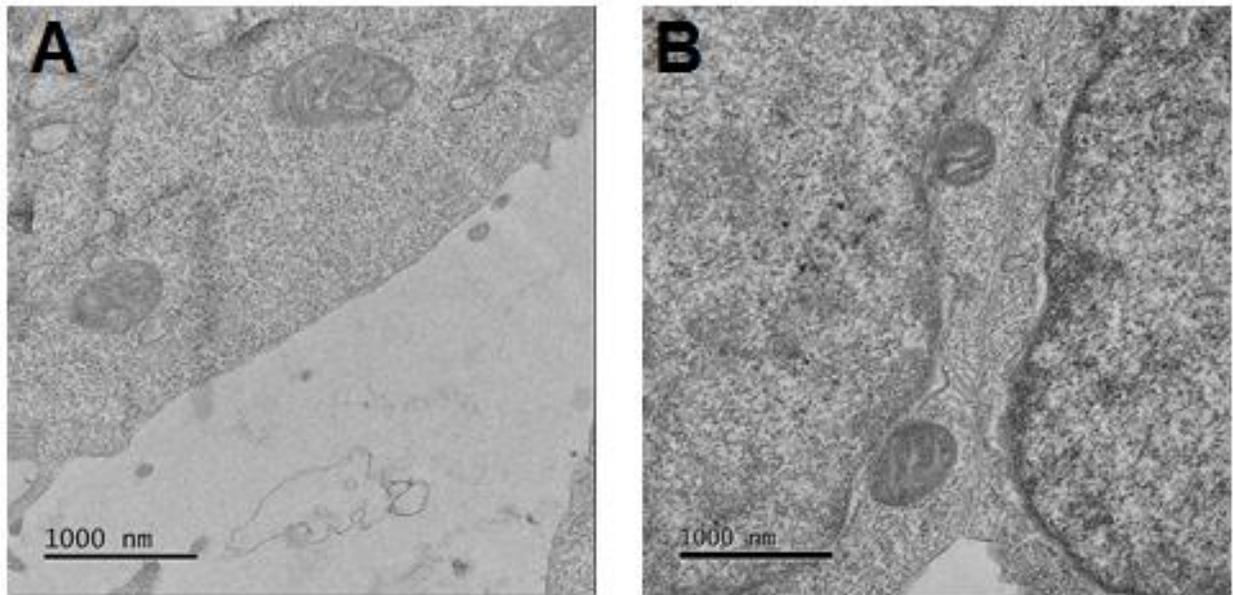


Figura 23 Células HEK 293 de MET control negativo

2.6.2. Control positivo

En el control positivo se agregaron un total de 100 partículas por células después de 1 hora de la fijación de estas, en la sección A y B de la figura 24 se puede apreciar el comportamiento de las AuNEs en la membrana plasmática las cuales presentan una distribución uniforme y no se observa agregación. En cambio, en la sección C y D de la misma figura las partículas se observan en endosomas y se comportan en cadenas de líneas de nanopartículas agregadas.

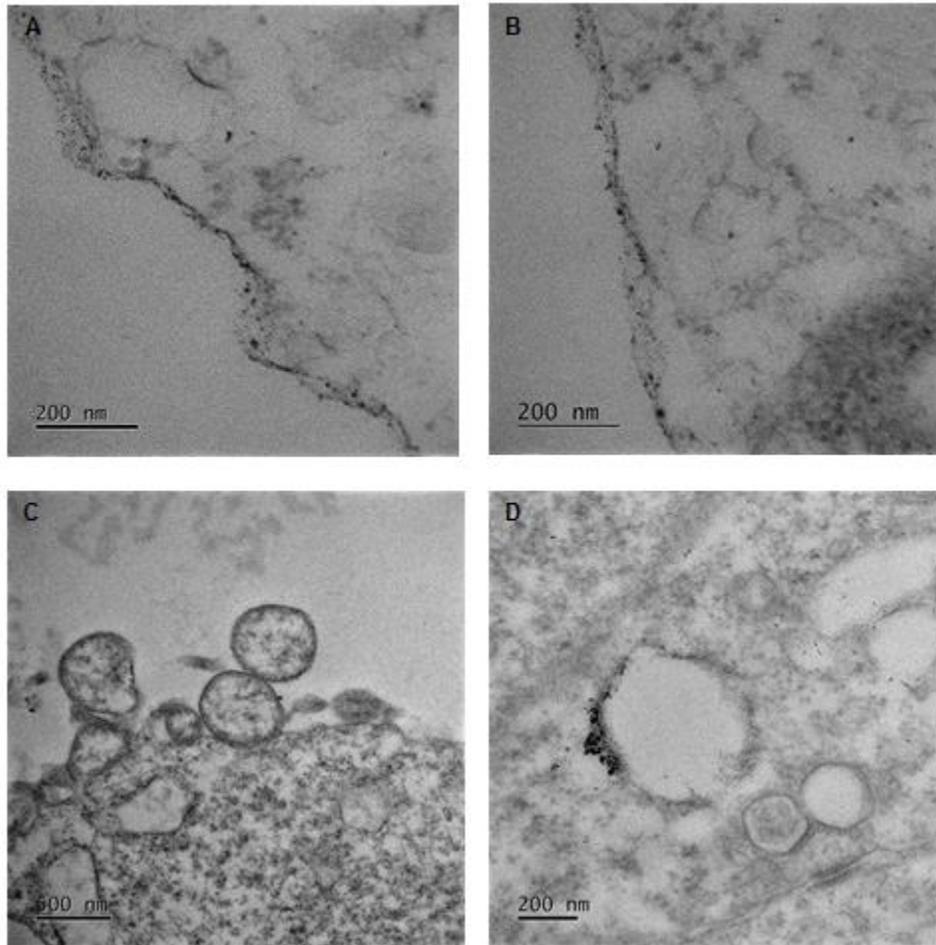


Figura 24 Imagen tomada en MET internalización de las AuNEs en células HEK-293, 1 h post fijación. A,B, se puede apreciar las AuNEs en las membranas celulares, C,D, se observan las AuNEs en los endosomas celulares.

Este comportamiento era el esperado ya que en un tiempo de 1 h solo se esperaba que las partículas se acumularan en la orilla de las células y una cantidad muy pequeña de ellas fuera envuelta en endosomas, por tal motivo se cree que aún no han entrado a las células.

2.6.3. Evaluación a 24 h

Para la preparación de la muestra de 24 h se agregaron un total de 100 partículas por células en el medio de cultivo, después de 24 h se realizó la fijación de las células, en la figura 25 se puede apreciar el comportamiento de las AuNEs.

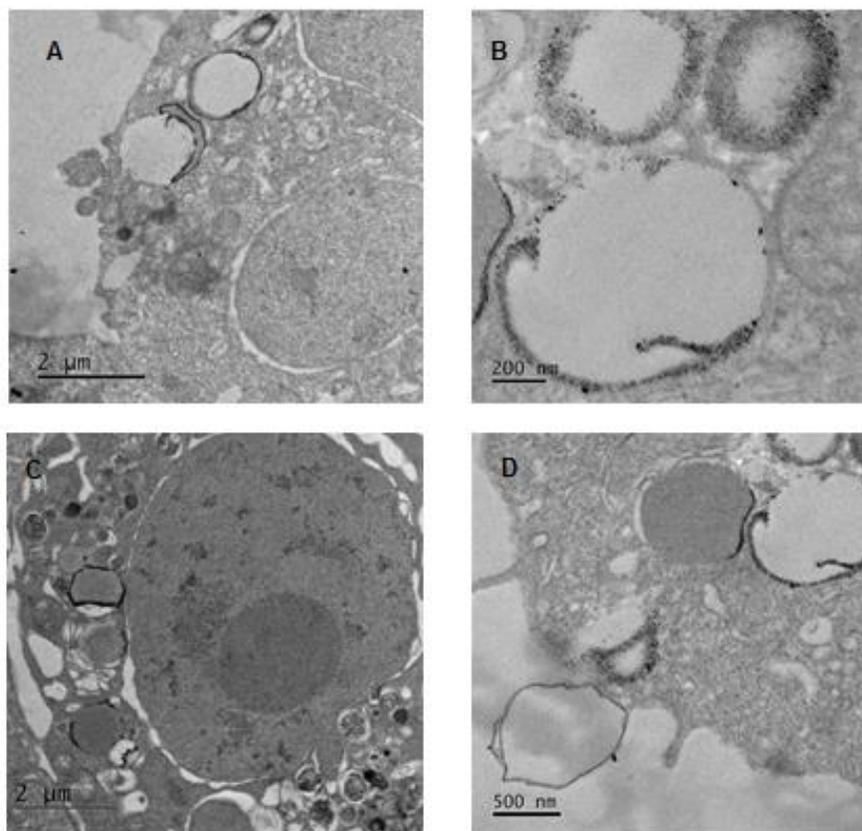


Figura 25 Imagen tomada en MET de la internalización de las AuNEs en células HEK-293, 24h antes de la fijación.

Es importante recalcar que en la figura 43 B) se observa la acumulación de las AuNEs alrededor de las vesículas, este comportamiento ya había sido reportado por

B. Devika Chithrani y colaboradores en el 2005 [44], cabe recalcar que en la figura 43 c) se puede corroborar que no se encuentran nanopartículas en el núcleo, esto es importante ya que si logran penetrarlo se podría llegar al ADN y desencadenar apoptosis [45], igualmente se observa un leve aumento en la cantidad de mitocondrias, tal como se esperaba ya que en la literatura ya se ha encontrado este cambio celular[46], lo cual nos indican que las células están presentando estrés.

2.6.4. Células 48 h

Para la preparación de la muestra de 48 h se agregaron un total de 100 partículas por células en el medio de cultivo, después de 48 h se realizó la fijación de las células, en la figura 26, se pueden observar cuerpos vesiculares conteniendo a las nanopartículas en tipo espiral alrededor, además se observa a las nanopartículas en otras partes de la célula, pero cabe recalcar que aún el núcleo se encuentra sin AuNEs como se observa en la figura 26 A). Sin embargo, realizando una comparación con el tiempo de 24 horas, se puede ver a las AuNEs más acumuladas entre ellas en pequeños conjuntos (figura 26 B)).

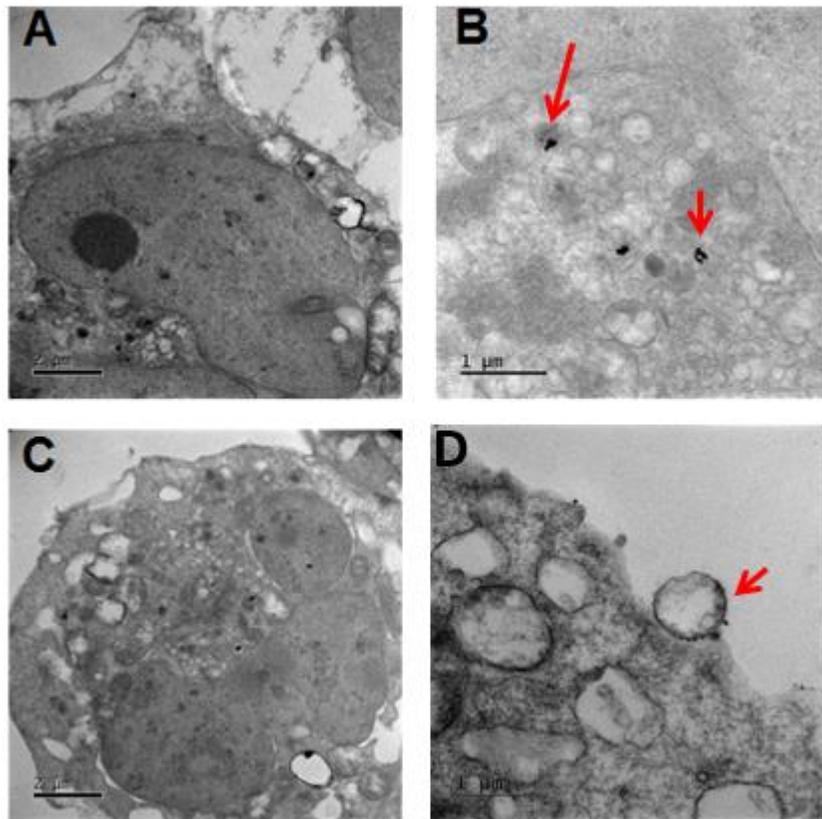


Figura 26 Imagen tomada en MET internalización de las AuNEs en células HEK-293, 48 h antes de la fijación.

Asimismo, se observa en la figura 26 D) un cuerpo vesicular que parece salir de la célula, aunque no se puede asegurar que efectivamente las AuNPs están siendo expulsadas

2.6.5. Células 72 h

Para la preparación de la muestra de 72 h se agregaron un total de 100 partículas por células en el medio de cultivo, después de 72 h se realizó la fijación de las células, en la figura 27 se puede apreciar una mayor cantidad de cuerpos vesiculares, además también se observa un incremento significativo en la cantidad de mitocondrias comparando con los tiempos de 24 y 48 h, lo que nos podría sugerir que en este tiempo la célula se encuentra en un estado mayor de estrés. También se observó una disminución en los conjuntos de AuNEs dentro de los cuerpos vesiculares.

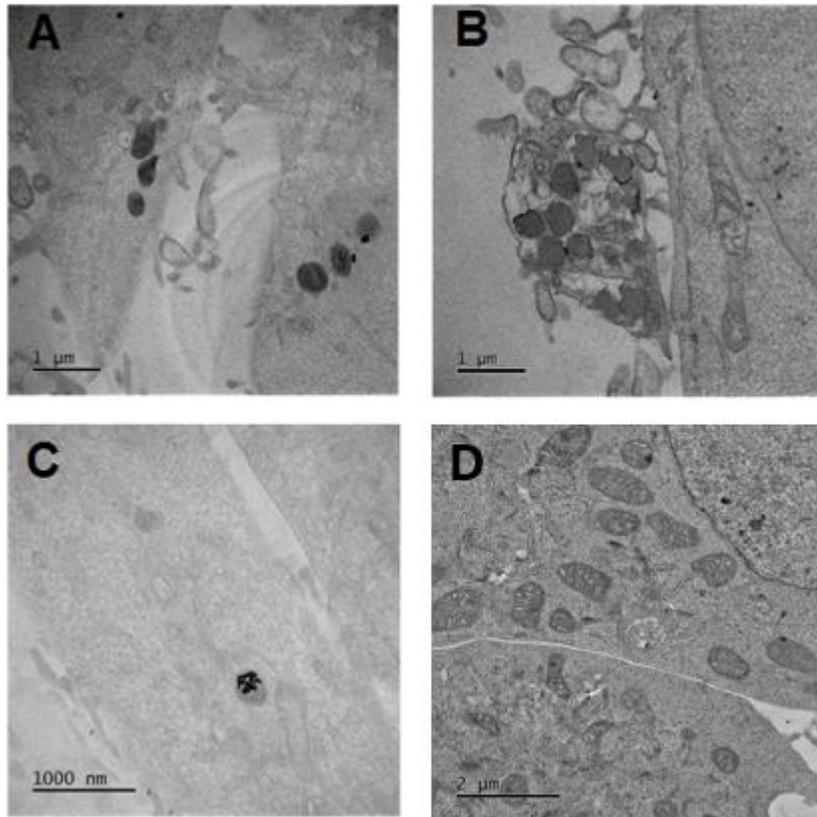


Figura 27 Imagen representativa en MET de AuNEs en células HEK 293

Aunque no se observa afectación en el núcleo de la célula, comparando con los controles negativo y positivo, si se logra observar un aumento de cuerpos vesiculares, y al no observar una gran cantidad de AuNEs se podría sugerir que para este tiempo ya se encuentran fuera de la célula.

2.7. CONCLUSIONES

Como segunda parte de este proyecto se logró el estudio del comportamiento de las AuNEs en células HEK-293, aunque no se observa un mayor daño en la morfología celular comparando con el control negativo, si se puede apreciar un incremento en los cuerpos vesiculares. Es importante recalcar que en ninguno de los tiempos evaluados se observaron AuNEs dentro del núcleo, ya que como se dijo anteriormente si estas atravesaran al núcleo celular se podría generar un daño significativo en las células.

También se puede apreciar que el comportamiento de las AuNEs en el control positivo era dispersas cerca de la membrana celular, pero en un tiempo de 24 h, ya se observan dentro de los cuerpos vesiculares, lo que sugieren que en este periodo de tiempo se llevó a cabo la entrada de estas por mecanismo de endocitosis, aunque para conocer el mecanismo específico de entrada de las AuNPs a las células se necesitaría hacer uso de otras técnicas y más estudios, a su vez para un tiempo de 72 h la cantidad de AuNEs dentro de las células es baja, lo que nos sugiere que ya se llevó a cabo la exocitosis.

Es importante recalcar que, aunque no se puede observar cambios morfológicos significativos al final del experimento, a las 72 h si se observa una mayor cantidad de mitocondrias lo que nos sugiere que existe estrés celular, estos experimentos ayudarán a futuro para su uso en terapias anticancerígenas.

CAPÍTULO III “ENCAPSIDACIÓN DE NANOPARTICULAS CON PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE DEL CCMV”

3.1. INTRODUCCION

Como se mencionó anteriormente, para que una nanopartícula pueda ser utilizada en el sector biomédico necesita ser biocompatible, por esta razón nosotros optamos por utilizar la cápside de un virus, ya que una característica interesante de los virus es la manera que se pueden auto ensamblar *in vitro* formando partículas tipo virus (VLP por sus siglas en inglés), las cuales están hechas con proteínas de un virus en específico, pero no contiene el material genético, por lo tanto no pueden ser infecciosas, las VLPs se están usando en los últimos años como nanoacarreadores, llevando diferentes tipos de moléculas a la célula, en la actualidad se están haciendo estudios con diferentes virus, en nuestro caso se utilizó el CCMV el cual se ha demostrado que puede entrar a la célula de mamífero sin presentar efectos adversos a la célula [47][48][49], además de que su nula inmunotoxicidad ha sido comprobada [50] y tiene la capacidad de desensamblarse y auto ensamblarse en ausencia de su material genético [51]. Por eso en este proyecto para aumentar la biocompatibilidad y estabilidad de las nanopartículas se usó la cápside del virus CCMV [52], ya que este cuenta con un tamaño de 28 nm apto para su uso como nanocontenedor [53] con lo cual se formaron nanopartículas envueltas con la cápside del CCMV.

3.1.1. Proteína de la cápside del CCMV

La proteína de la cápside está formada por 190 aminoácidos (PM = 19500 Da) y tiene un punto isoeléctrico de 4.8 [54].

El CCMV fue el primer virus icosaédrico auto ensamblado *in vitro* por *Bancroft Et. Al.* en 1966 [55], la proteína del CCMV es capaz de ensamblarse *in vitro* en

ausencia de su ARN en diferentes formas que van desde su forma nativa icosaédrica, bicapa, multicapa o disco, hasta la formación de tubos variando las condiciones de pH y FI en las que se encuentre, como se muestra en la Figura 45 [51].

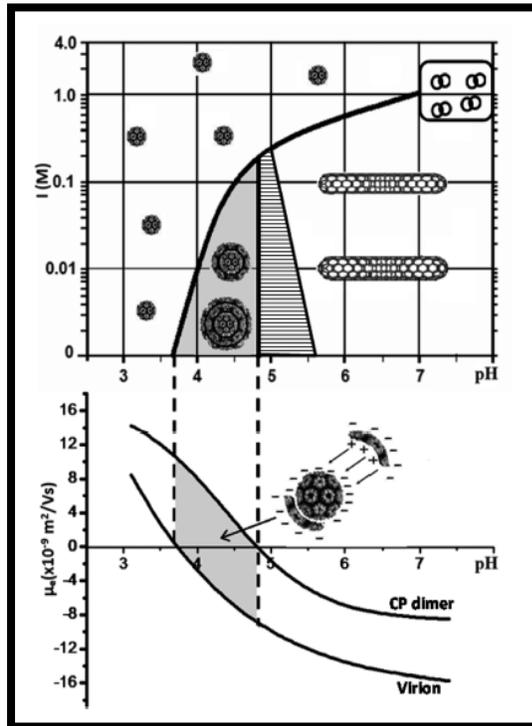


Figura 28 Diagrama de fases de las proteínas de la cápside del CCMV en diferentes pH y FI (Figura tomada de la referencia [51]).

Existen algunos factores que pueden afectar el reensamblamiento de la proteína del CCMV, como la temperatura, efecto de la fuerza iónica, pH, carga eléctrica superficial [56], entre otros, estos factores disminuirán la estabilidad de la proteína y provocarán precipitación, lo cual es irreversible y ocasiona la pérdida de la actividad biológica de la proteína.

3.1.2. Partículas tipo virus (VLPs)

Como se mencionó anteriormente es posible ensamblar las proteínas de la cápside viral en ausencia de su ácido nucleico, lo que permite utilizarla como nanocontenedor no infeccioso. De la cápside se pueden utilizar tres superficies: interior, exterior y la interfaz entre las subunidades de la proteína como se muestra en la figura 46.

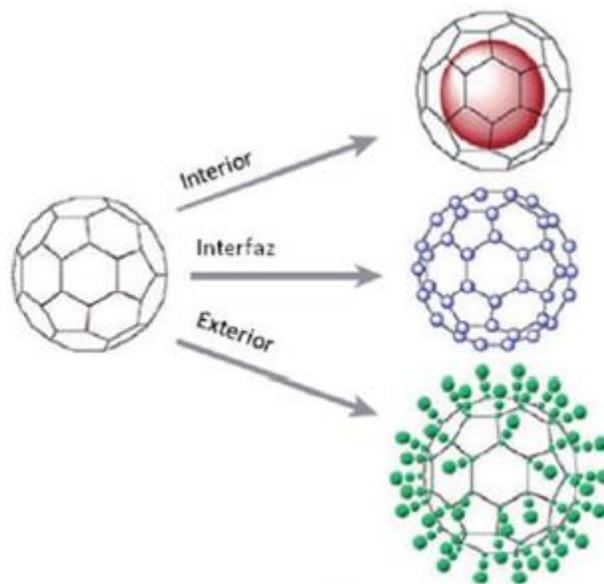


Figura 29 Superficie de un virus que puede ser utilizada como nanocontenedor. El interior por interacciones electrostáticas con amino terminal, la interfaz con partículas pequeñas y el exterior utilizando interacciones con la carboxilo terminal imagen tomada de la referencia [57].

El CCMV cumple con las características necesarias para ser utilizado como nanocontenedor biológico, ya que puede ser modificado covalentemente en la superficie exterior así como en el interior [58][59].

Existen varios antecedentes en donde se realizaron modificaciones al interior de la cápside, un ejemplo de estos fue el trabajo realizado por Trevor Douglas en 1997 donde se demostró que es posible introducir reactivos [60]. También hay antecedentes del auto ensamblaje de las proteínas de la cápside alrededor de especies sintéticas o biológicas por interacciones electrostáticas [61] [62] [63].

Además, Douglas et. al. demostraron que la carga en el interior de la cápside del CCMV puede ser modificada de catiónica a aniónica [64], cambiando los nueve residuos positivos en el amino terminal de la proteína (arginina y lisina) por residuos negativos (ácido glutámico), las propiedades de ensamble se mantuvieron idénticas a la nativa.

En el 2006 el grupo de Franzen [65] encapsidó AuNPs con proteína del mosaico necrótico del trébol rojo (RCNMV), este es un virus vegetal compuesto por 180 proteínas, con un diámetro exterior de 37 nm e interior de 17 nm. Utilizaron AuNPs de 5, 15 y 20 nm, con ácidos nucleicos nativos del virus y se descartaron las partículas de 20nm por el tamaño.

El auto ensamble de proteína viral alrededor de oro en ausencia de ácido nucleico fue reportado por primera vez en el 2003 [66], utilizando BMV el cual es de la familia bromoviridae, tiene un diámetro externo de 27 nm e interno de 17 nm, tiene 180 proteínas en su cápside, con una terminal positiva y una negativa y un arreglo T=3.

El primer trabajo de encapsidación de AuNPs con proteína de la cápside del virus CCMV se realizó en el 2009 [67], en donde se concluyó que se puede encapsidar AuNPs con proteína carente del amino terminal resultando en cápsides que pueden variar de tamaño y estructura, y variando el tamaño interior, con lo que se comprobó que se puede utilizar en biomedicina.

Además, en el 2017 M. Loredo et. al. demostró que al utilizar cápside del CCMV para el ensamblaje de nanolipoesferas estas lograron estabilidad por un periodo de tiempo prolongado [52].

Posteriormente en el 2020 Durán-Meza y colaboradores [68] mostró la encapsidación de AuNEs y AuNSs con cápside del virus CCMV.

Además de que ya se ha demostrado que la cápside del CCMV es capaz de entrar a células de mamífero sin la ayuda de ningún receptor [69]. Estos antecedentes nos muestran que la cápside del virus CCMV, puede ser utilizada como nanocontenedor, dándole una estabilidad y biocompatibilidad a las nanopartículas.

3.2. OBJETIVOS

- Encapsidación de AuNEs, AuNSs y AgNPs con proteína de la cápside del virus CCMV mediante micro diálisis, creando VLPs.
- Caracterización de las VLPs mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) y dispersión de luz dinámica (DLS).

3.3. HIPÓTESIS

- Las proteínas de la cápside viral del CCMV pueden auto ensamblarse, creando cápsides que contengan en su interior nanopartículas, formando partículas tipo virus.

3.4. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha visto un incremento en la utilización de cápsides virales como nanocontenedores, ya que estas partículas conocidas como VLPs muestran una estabilidad alta, y pueden ser funcionalizadas.

Debido a que las nanopartículas no presentan una buena estabilidad, como se vio en el capítulo uno, en este proyecto se planea la creación de nanopartículas encapsidadas con proteína del virus vegetal CCMV formando nanopartículas envueltas, que les proporcione biocompatibilidad, para ser utilizadas en aplicaciones biomédicas ya sea en imagenología médica o en terapias fototérmicas.

3.5. METOLOGÍA

3.5.1. Purificación de proteína del CCMV

Para la purificación de la proteína se utilizaron los métodos descritos por Lavelle *et al.*[51]. Primeramente, se realizó el desensamble del virión para lograr la liberación del ARN para posteriormente separarlo, por lo cual se realiza una diálisis en membrana con un tamaño de poro de 8000 a 12000 Da (ya que la proteína tiene un peso molecular de 19500 Da), se realiza en buffer de desensamble (500 mM de cloruro de calcio (CaCl_2), 50 mM de Tris-HCl a un pH = 7.5, 1 mM de EDTA a un pH= 8, finalmente se le agrega 1 mM de DTT y 0.50 mM de PMSF) por 24 horas a 4°C, este buffer causa que los viriones se expandan hasta el desensamble provocando la liberación del ARN, este se precipitará debido a los iones de calcio.

En seguida se retira la proteína de la membrana de diálisis y se coloca en tubos ultraclears para ser centrifugado (ultracentrífuga de mesa Beckman Coulter Optima MAX-XP) en un rotor de ángulo fijo (TLA-110Ti) a 100000 rpm por 126 minutos. Al finalizar la centrifugación, la proteína se retira rápidamente y se separa en fracciones de 200 μl , se mide la concentración y pureza de cada una de las fracciones mediante un espectrofotómetro UV-Vis, y sólo se conservan las que cuentan con una pureza mínima de 99.5% de proteína sobre ácido nucleico [70].

La proteína seleccionada se coloca en diálisis en 1 L de buffer de proteína (1 M de cloruro de sodio (NaCl), 20 mM Tris-HCl pH = 7.5, 1 mM de EDTA pH = 8, se le agrega 1 mM de DTT y 1mM PMSF al final) con una membrana de 12000 Da por 12 horas a 4 °C, este buffer sirve para la formación de dímeros y aumenta la estabilidad de la proteína. Cuando se finaliza el tiempo se retira la diálisis y se mide la concentración y pureza en espectrofotómetro UV-Vis y se almacena a 4°C.

3.5.2. Encapsidación de nanopartículas en proteína del virus CCMV

La encapsidación de AuNEs, AgNPs y AuNSs se llevó a cabo mediante microdiálisis por 12 h en buffer de citratos con un pH de 4 y una FI de 0.1 M, estas características favorecen la formación de cápsides en forma icosaédrica (idéntica a la nativa). Se utiliza una relación de 540 proteínas por partícula, es decir, tres cápsides por partícula para tener un exceso [51]. Después de 24h en buffer de citratos se pasó a buffer de fosfatos a pH 7.4 y FI de 0.01 M, para desensamblar cápsides vacías.

3.6. RESULTADOS

3.6.1. Purificación de proteína

La purificación de proteína se lleva a cabo utilizando ultra centrifugación, donde se colocó 1000µl de virión con una concentración de 1 mg/mL y se agregó 600µl de buffer de desensamble con el objetivo de tener un volumen inicial de 1.6 ml, cuando este proceso termina se retira el volumen en alícuotas de 200 µl, las cuales se analizan mediante espectroscopía UV/Vis para determinar si son aptas para los experimentos. La proteína con una pureza por encima de 1.5 se considera apta para ser utilizada, ya que esto corresponde a menos del 0.5% de contaminación con ARN como demostraron Warburg y Christian en 1941 [70]. La proteína obtenida se almacena en buffer de proteína 4 °C.

En la figura 47 se muestra un espectro típico de la proteína pura, obtenido por espectroscopía UV/Vis, se observa como la relación A280/A260 cambia drásticamente durante el proceso de extracción del ARN. Debido a que el virus CCMV tiene una absorción máxima a 260 nm, mientras que después de la eliminación del ARN, el máximo de absorción se desplaza a 280 nm.

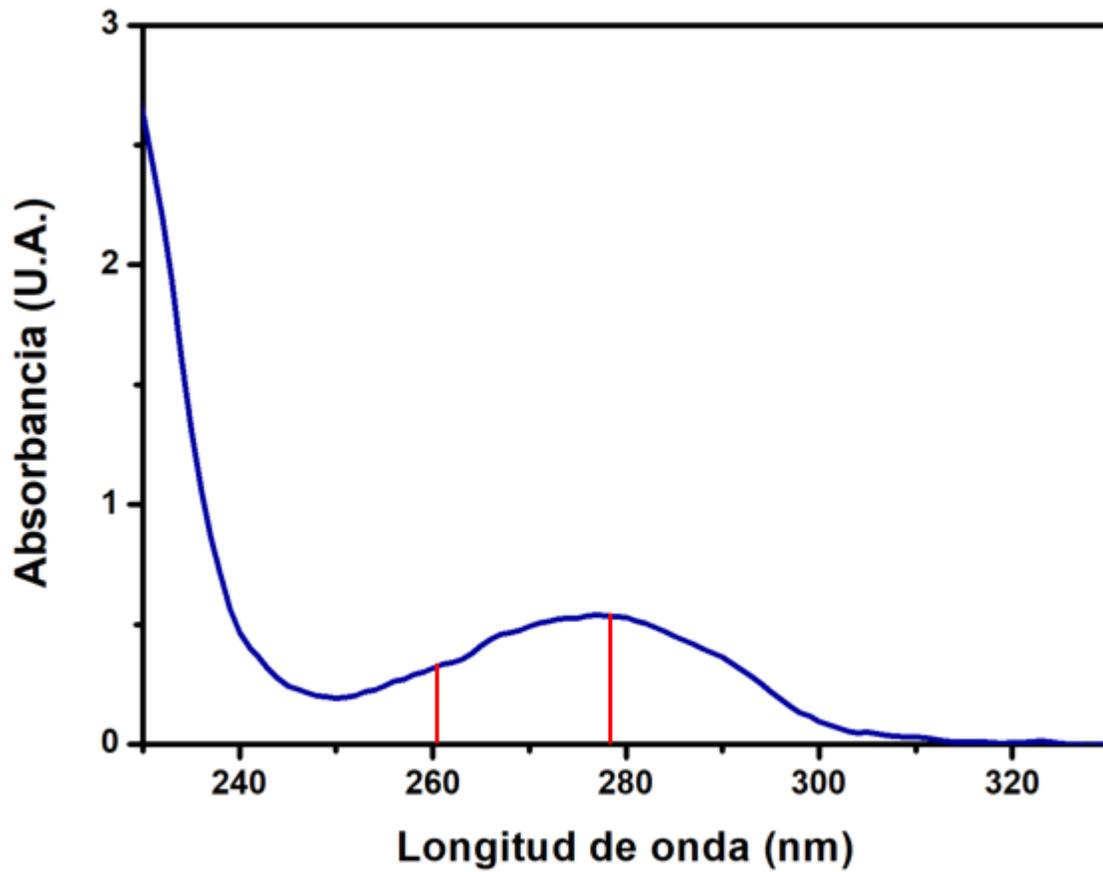


Figura 30 Gráfica del espectro de absorción de proteína, después de la purificación del virión, donde el máximo de absorción se observa en 280 nm debido a las proteínas (línea azul) y la absorción en 260 nm debido al ARN (línea verde).

3.6.2. Encapsidación de Nanopartículas

3.6.2.1. Encapsidación de AuNEs

La encapsidación de las AuNEs con cápside del virus CCMV se llevó a cabo mediante microdiálisis en buffer de citratos pH 4 y FI de 0.1 M, durante 24 hr favoreciendo las cápsides icosaédricas igual a la nativa. Las imágenes tomadas en MET de los AuNEs encapsidados con VLPs de proteína de CCMV se muestran en la Figura 48. En ellas se observa las AuNEs de un color oscuro debido a su densidad electrónica, mientras que la proteína del CCMV se observa de un color más claro, haciendo evidente la formación de una capa proteica alrededor de las AuNEs, dándoles a las AuNEs una mayor biocompatibilidad.

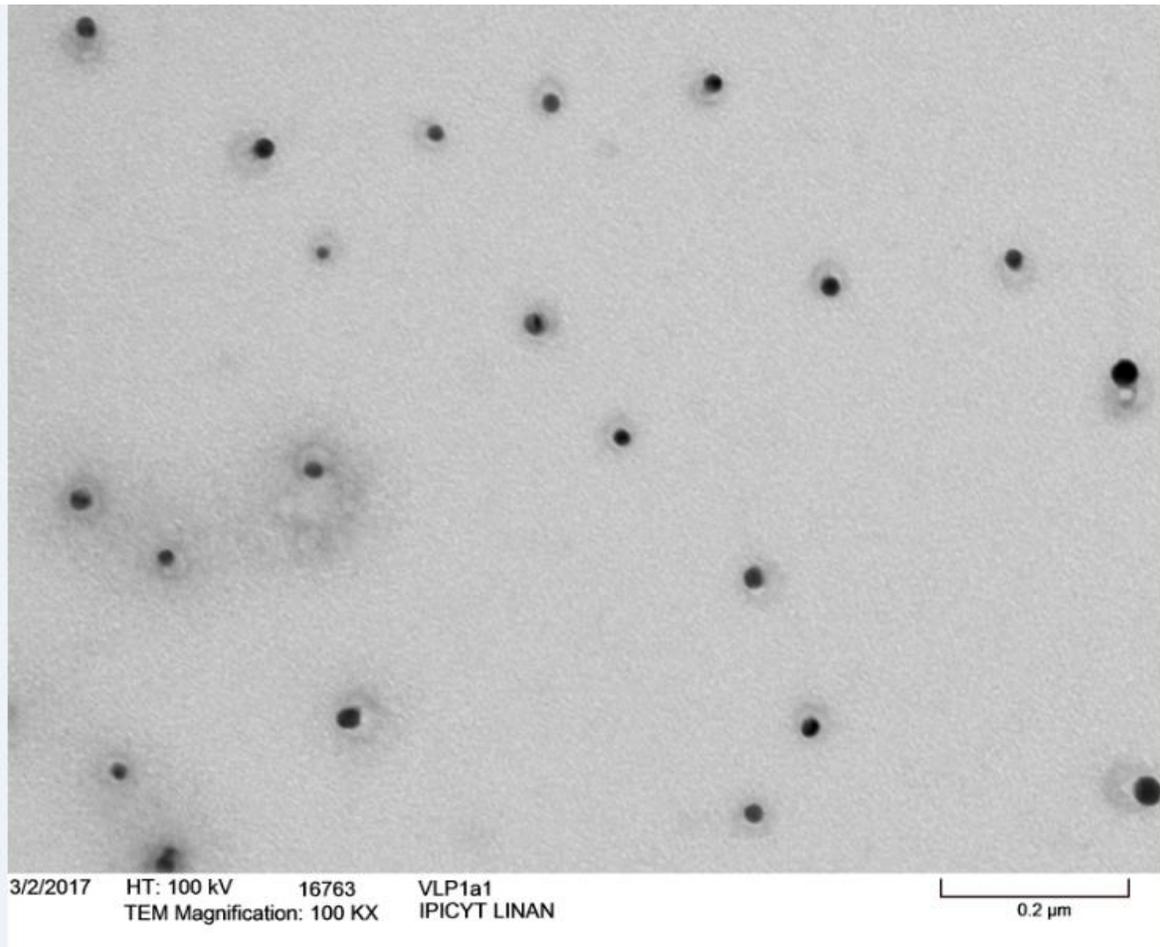


Figura 31 Imágenes tomadas en MET de AuNEs encapsidadas con proteína de la cápside del CCMV.

Debido a que las AuNEs presentan un tamaño promedio de 12 nm, es posible la encapsidación de 2 partículas por cápside como se observa en la figura 49.

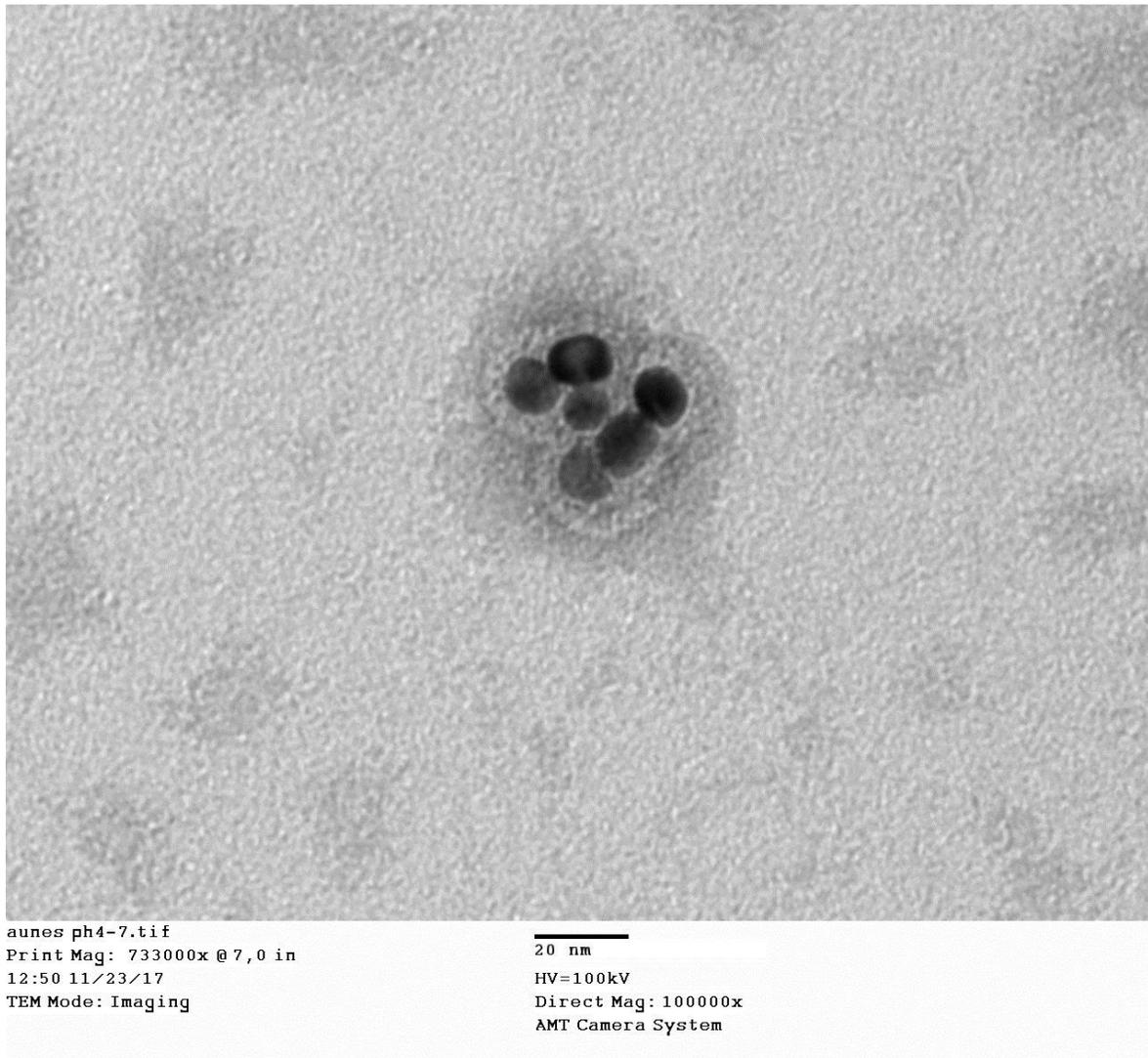


Figura 32 Imagen representativa de MET donde se puede apreciar la encapsidación de dos partículas por la cápside del CCMV formando VLPs.

3.6.2.2. Encapsidación de AuNSs

Para llevar a cabo la encapsidación de las AuNSs se utilizó buffer de citratos a pH 3.6 y FI de 0.1 M durante 24 hr a 4 °C para obtener cápsides icosaédricas, como

se puede apreciar en la figura 50 obteniendo VLPs de aproximadamente 28 nm de diámetro, y en su interior se observan las AuNSs de 21 nm de un color oscuro debido a su densidad electrónica, rodeados por una capa proteica de un color más claro, con lo que se comprueba que se logró adecuadamente la encapsidación.

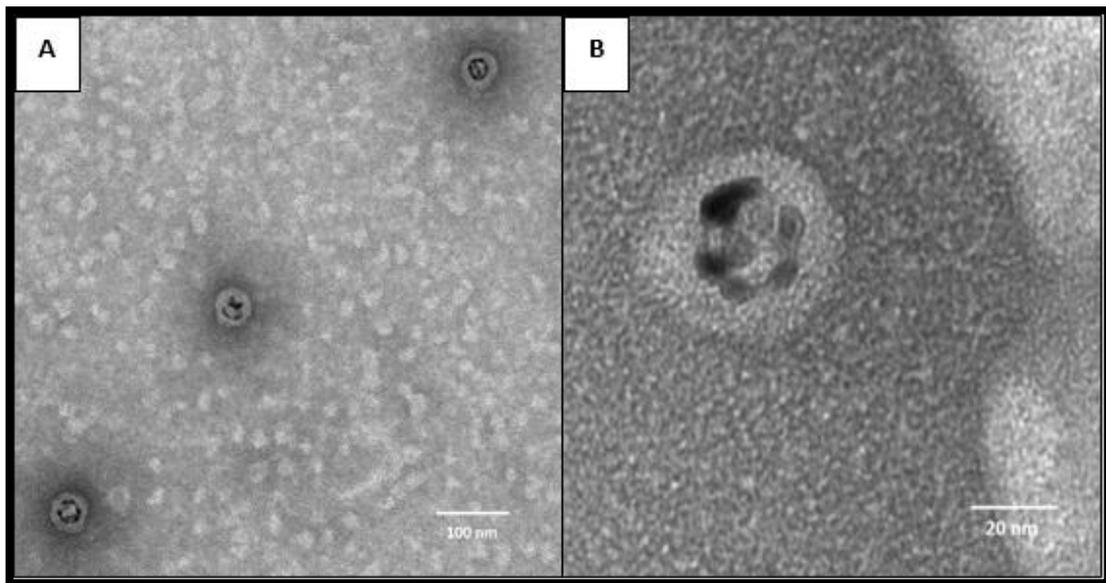


Figura 33 Imágenes tomadas en MET de AuNSs encapsidadas en VLPs

3.6.2.3. Encapsidación de AgNPs

Hasta el momento no se ha podido lograr la encapsidación de las nanopartículas de plata, esto se puede deber a que las AgNPs tienen un efecto antimicrobiano [71], por esta razón suponemos que cuando estas están en contacto con la proteína de la cápside del virus, interactúan de tal manera que se oxidan y logran degradar la proteína de la cápside del virus como se puede observar en la figura 51.

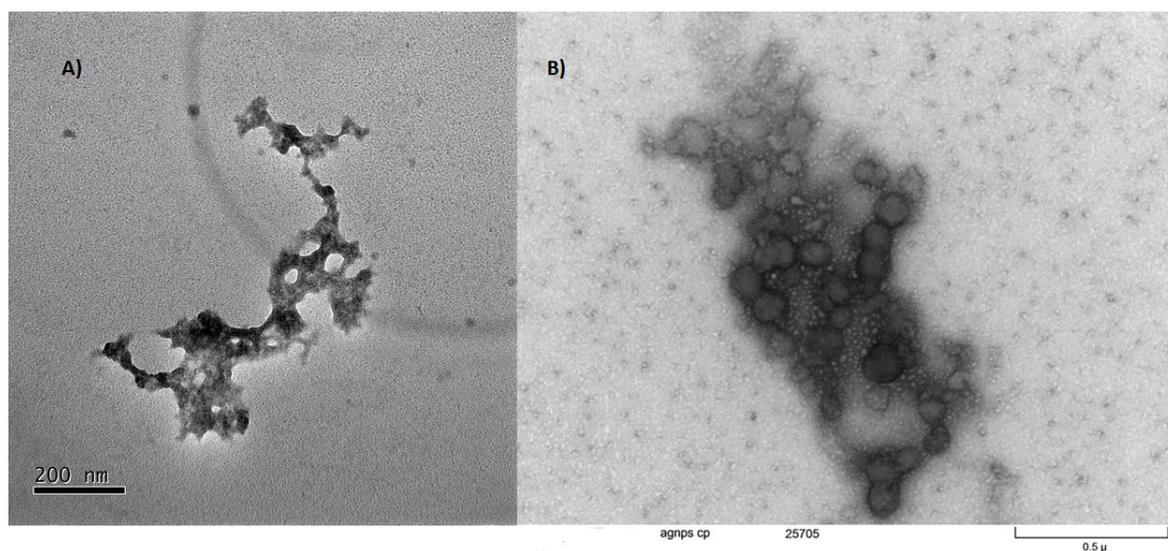


Figura 34 Imagen tomada en MET que muestra la proteína de la cápside del CCMV en contacto con las AgNPs.

3.7. CONCLUSIONES

Es importante resaltar que se logró el ensamble de las AuNEs y AuNSs con la cápside del virus CCMV formando VLPs.

Las AuNEs se lograron encapsidar con éxito, aunque estas presentaban una buena estabilidad como se vio en el capítulo I y además se lograron introducir a células HEK-293, se planea como trabajo a futuro ver los cambios que puedan surgir en las células cuando se utilizan AuNEs envueltas.

Las AuNSs presentan su absorbancia en el infrarrojo cercano, haciéndolas perfectas para terapia fototérmica, una desventaja de ellas era que no presentan una buena estabilidad, por esta razón al haber sido encapsidadas con la cápside del virus CCMV se aumentó el tiempo de vida, logrando una nanopartícula envuelta más estable.

Por otra parte, las AgNPs presentan actividad antimicrobiana, debido a esta característica creemos que no se lograron encapsidar con la cápside del virus CCMV.

CAPÍTULO IV “ESTUDIO DEL PROCESO DE HINCHAMIENTO DE LOS VIRUS CCMV Y BMV”

4.1. INTRODUCCION

La cuarta etapa del proyecto consistió en la amplificación, purificación y estudio del proceso de hinchamiento de los virus de planta CCMV y BMV.

Durante la realización del estudio del CCMV y BMV nos percatamos hasta el día de hoy no se conoce el mecanismo de entrega del material genético del CCMV y BMV hacia la célula, diferentes grupos de investigación han realizado experimentos en donde se ha demostrado que los virus sufren una hinchazón, que anteriormente se creía que era de un 10% de incremento en la cápside viral [72][73][74][75], debido a este incremento en el tamaño, surge la hipótesis de que los extremos 5` y 3` del material genético quedan expuestos, esto daría la posibilidad a la maquinaria celular de tomar el ARN y seguir con la replicación.

En el presente proyecto se evaluó el incremento de la cápside viral del CCMV y BMV que surge de los cambios de pH y FI, donde se demostró que la hinchazón llega a ser más de un 10% en condiciones específicas de pH y fuerza iónica (FI), implementando las técnicas experimentales de DLS, MET y AFM [76].

4.1.1. Virus

Los virus son conocidos desde hace varios siglos, el primer dato que se conoce sobre los virus data del año 3700 a.C donde se observan signos típicos de una poliomielitis parálitica en la figura de un sacerdote de Menfis. Otro antecedente de los virus es la momia del faraón Ramsés V, que se cree que falleció de viruela en el año 1196 a.C., también se conoce que en el año 1000 a. C. la viruela era endémica en China, y en defensa de éste virus se llevó a cabo la práctica de variolización, ésta fue utilizada hasta que Edward Jenner el 14 de mayo de 1796 utilizó material de una

infección por viruela de las vacas de la mano de Sarah Nemes para vacunar con éxito, de ahí la vacunación fue universalmente adoptada[77][78].

Un aporte muy importante para el desarrollo del estudio de los virus fue la “teoría germinal” propuesta por Robert Koch y Louis Pasteur en 1880, la cual demuestra que la vida no se origina espontáneamente, si no que se desarrolla a partir de gérmenes [79][80].

Los primeros indicios de la existencia de un virus de planta fueron dados en 1892 por Dimitri Ivanovski (1864-1920) un botánico ruso, quien demostró que extractos de plantas de tabaco estaban afectadas por lesiones de tipo moteado claro, al ser sometidos a ultrafiltración a través de instrumentos de cerámica, conservaban la capacidad de transmitir la enfermedad. Ya que estos filtros retenían las bacterias más pequeñas (por entonces conocidas como ‘etiología de infección’) se supuso que la entidad era debida a un “veneno” presente en los extractos y se elaboró la teoría viral de transmisión de enfermedad. Por el concepto de veneno se desarrolló el término virus[81].

El estudio de la estructura viral permite conocer cómo están hechas las partículas virales, cómo interactúan con el hospedero, cómo se protege el genoma, la forma mediante la cual la información genética (genoma) accede hasta los organelos celulares y la interacción con la célula hospedera para lograr un ciclo replicativo infeccioso y eficaz, con ensamblaje, transporte y liberación de partículas virales [77].

4.1.2. Características de los virus

En general los virus contienen una cubierta de proteínas llamada cápside (cp) que sirve de protección para el genoma viral, este genoma viral consta de una o varias moléculas de ADN o ARN, existen varias clasificaciones para agrupar a los virus, una de ellas es clasificarlos como envueltos o desnudos, los envueltos tienen una capa de

membrana que cubre a la cápside y los virus desnudos carecen de esta membrana, también algunos virus poseen en su estructura espículas [82].

El tamaño de los virus se encuentra en el rango de 20 a 250 nm, un virus necesita un hospedero para replicarse y poseen casi siempre un solo tipo de ácido nucleico en la partícula viral, una estructura y un mecanismo de reproducción[77].

Los virus carecen de información genética que codifique estructuras necesarias para la generación de energía metabólica o para la síntesis de proteínas (ribosomas). Ningún virus conocido posee el potencial genético o metabólico para generar la energía necesaria para desarrollar todos los procesos biológicos (por ej., la síntesis de macromoléculas), por lo cual son totalmente dependientes de la célula hospedera para esta función.

4.1.3. Generalidades del virus Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV)

El CCMV es un virus de planta, icosaédrico, desnudo, del género Bromovirus, familia Bromoviridae y tiene un diámetro externo de 28 nm e interno de 21 nm (figura 28). Tiene como principal hospedero la planta de frijol “*black eye*” *Vigna unguiculata* [83]. El CCMV es transmitido a través de un vector o por inoculación mecánica [84]. Los vectores son generalmente artrópodos de las especies *Coleóptera ruficornis*, *Ceratoma trifurcata*, *Diabrotica balteata* y *Diabrotica undecimpunctata* [85]. Normalmente el virus se encuentra dentro del núcleo, citoplasma y vacuolas de las células infectadas. La infección de este virus es característica por la formación de pequeñas manchas amarillas en las hojas o lesiones necróticas locales [53].

El virión se compone por 23.7 % de ácido nucleico, 76.3% de proteína y tiene un peso de 4.6×10^6 Daltons [86]. El CCMV encapsida 4 cadenas sencillas de ARN de sentido positivo en tres viriones distintos de composición similar, dos de estas

cadena se encapsidan en una sola cápside. El ARN 1 consta de 3171 nucleótidos y el ARN 2 tiene 2774 nucleótidos, estos están empaquetados por separado; el ARN 3 y ARN 4 están empaquetados juntos y constan de 2173 y 824 nucleótidos respectivamente [87]. Se cree que el ARN 1 y el ARN 2 participan en la replicación viral, a través de la codificación de proteínas involucradas en la replicación del ARN, mientras que el ARN 3 tiene un papel en la propagación de la infección dentro de la planta, a través de la producción de una proteína de movimiento viral de 32 kDa y el ARN 4 codifica la proteína de la cápside de 20 kDa[88].

La cápside de CCMV consiste en 180 subunidades idénticas de proteína, agrupadas en 32 capsómeros, formada por 12 pentámeros y 20 hexámeros, auto ensambladas alrededor del ARN [51][88] [89], está constituido por 190 aminoácidos, formando una triangulación $T=3$ [90] donde T representa el número de posiciones asimétricas que adopta la proteína de la cápside.

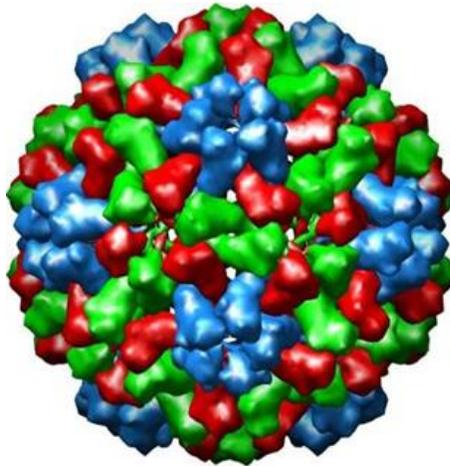


Figura 35 Estructura del virus Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV) figura tomada de la referencia [32].

El CCMV tiene un punto isoeléctrico de 3.7[54], en este punto la carga neta de la superficie es cero, una característica interesante del CCMV es su sensibilidad al pH y fuerza iónica. Al aumentar el pH del medio, la proteína de la cápside sufre un hinchamiento e incluso puede llegar a desensamblarse en monómeros o dímeros, que es la forma en que se encuentra más estable.

4.1.4. Generalidades del virus Brome Mosaic Virus (BMV)

El Brome Mosaic virus (BMV) es un virus icosaédrico (T3), miembro de la familia bromoviridae, el cual tiene un diámetro interno de 19 nm y un diámetro externo de 28nm, este virus infecta a muchas especies de gramíneas y puede transmitirse por inoculación mecánica o por varios vectores. La cápside está compuesta por 180 subunidades idénticas 12 pentámeros y 20 hexámeros (figura 29), y un genoma monocatenario de 3.2 kb, 2.8 kb, 2.1 kb y 0.8 kb designados ARN1, ARN2, ARN3 y ARN4, respectivamente. El ARN 1 codifica una proteína llamada 1a (109 kDa) [91], el ARN 2 codifica la proteína 2a (94 kDa) y la ARN polimerasa responsable del genoma viral[91] [92], mientras que el ARN 3 dicistrónico codifica para la proteína 3a implicada en la migración de célula a célula durante la infección y la proteína de la cápside, que es expresado a partir de un ARNm intermedio de replicación subgenómica, llamado ARN 4[93]. La proteína 3a y la cápside son esenciales en la infección sistémica en plantas, pero no para la replicación del ARN[90].

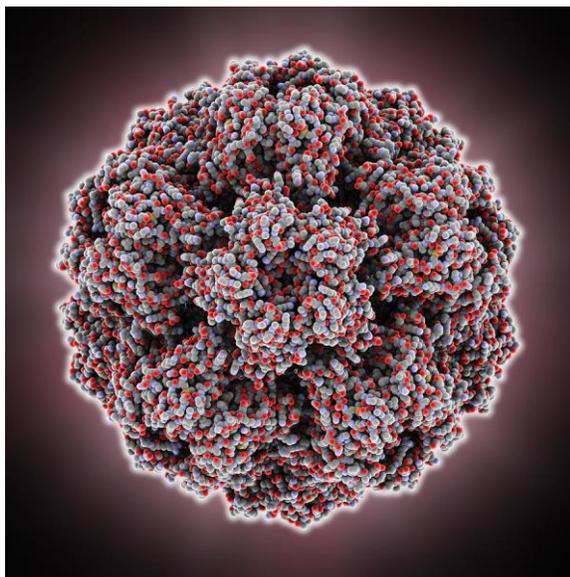


Figura 36 Estructura del Brome Mosaic Virus (BMV) imagen tomada de la referencia [94].

4.1.5. Hinchamiento del virus

El hinchamiento de los virus de plantas es un fenómeno muy estudiado, ya que nos puede ayudar a entender el comportamiento que presentan los virus al entrar a la célula. Estos estados de hinchamiento son controlados mediante el pH y la concentración de iones metálicos[95], el primer estudio sobre hinchamiento del CCMV y BMV del año 1964 por Incardona y Kaesberg [96], donde se menciona que la hinchazón es dependiente del pH y para estos virus se muestra alrededor de un pH de 6.5. Cabe resaltar que el BMV y CCMV muestran su estado nativo a un pH menor a 6.0, en presencia de Mg^{2+} [95]. En cambio, cuando las condiciones son 1 M y pH neutro, el virión se desensambla y pierde su ARN [97].

La hinchazón es el resultado de la expansión radial de la cápside del virión predominantemente alrededor de los ejes cuasi triples, las unidades morfológicas hexamérica y pentamérica se conservan, el ARN viral no se libera espontáneamente,

lo que hace que la hinchazón sea reversible [98][99], y ocurre cuando el Ca^{2+} , que se une a la cápside en estos ejes, se elimina por primera vez [73][74][100]. Los estados hinchados se controlaron mediante el pH y la concentración de iones metálicos; por ejemplo, la transición se invierte si el pH se reduce a 5.0 o si se aumenta la concentración de Ca^{2+} o Mg^{2+} .

Bancroft et al. [86] e Incardona y Kaesberg [96], mostraron un aumento en el radio hidrodinámico de la cápside viral del CCMV y BMV, el cual surge de un aumento radial de la proteína y el ARN en función del pH.

En el año 2002 Tama y colaboradores [73] mencionaron que el CCMV nativo es estable alrededor de un pH de 5.0 y sedimenta a 88 S. Sin embargo, a un pH de 7.0 y una fuerza iónica baja, la partícula sufre una transición a una forma hinchada, a su vez en el 2005 Robert Konecny y col. [98] también mencionaron que el CCMV es estable a un pH de 5.0, pero cuando el pH se aproxima a 7.0 y en ausencia de iones Ca^{2+} o Mg^{2+} se puede ver aproximadamente el 10% de hinchazón, en este experimento la fuerza iónica permaneció baja $<0.2\text{M}$. Además, estudios previos sugieren que la hinchazón es el resultado de una expansión de la cápside del virión de los ejes cuasi triples, conservando la morfología de los hexámeros y pentámeros [72][101] [73].

En el 2010 Yinglong Miao y colaboradores [102] estudiaron el proceso de la hinchazón en la cápside del CCMV (figura 30), donde ellos mencionan un 10% de hinchazón en el diámetro de la cápside, cuando existe un cambio de pH de 5 a 7 en ausencia de cationes divalentes y una FI baja de 0.2 M.

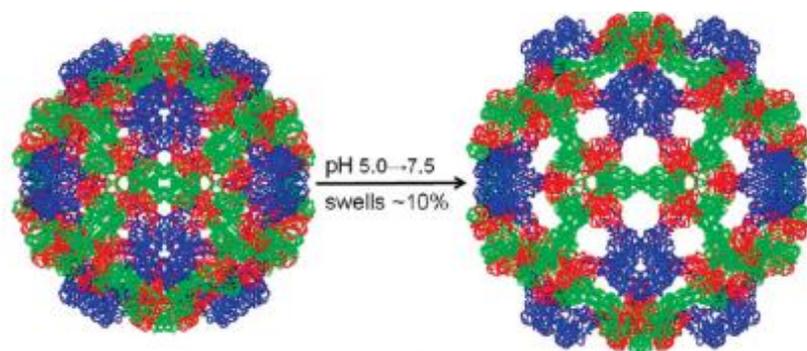


Figura 37 Hinchamiento del CCMV imagen tomada de la referencia [102].

En el caso del BMV Chauvin y colaboradores corroboró que el radio de las partículas aumento de 134 Å en un pH de 5.5 a 155 Å a un pH de 7.35, esto se determinó utilizando la técnica de dispersión de ángulo pequeño de neutrones[72].

Otro antecedente importante en el estudio de la hinchazón fue realizado por Llauro et al. donde analizaron la estabilidad de las partículas del virus TBSV-NPs en diversas condiciones de pH y quelación de iones de calcio. Descubrieron que los iones de calcio desempeñan un papel importante en este proceso de hinchazón, afectando a dos aspectos clave: la rigidez del virus y el límite elástico[103].

Comprender el proceso de la hinchazón que ocurre en la cápside del virus es esencial, especialmente para los virus de ARN, porque puede ayudarnos a comprender cómo un virus se desensambla y/o entrega su material genético dentro de las células, ya que este es un paso crucial en el proceso de replicación del virus (figura 31). En este trabajo, se estudió sistemáticamente el efecto combinado del pH y la fuerza iónica sobre el hinchamiento de la cápside de los viriones CCMV y BMV utilizando DLS y complementado con técnicas AFM y MET. Como se mencionó anteriormente, antecedentes muestran que el virión del CCMV y BMV se hincha aproximadamente un 10% a un pH ~7. Nuestros resultados muestran que, de hecho, en la mayoría de los casos de pH y fuerza iónica, el hinchamiento es de aproximadamente el 10%, lo que confirma estos resultados. Sorprendentemente,

encontramos que existen condiciones específicas de valores de pH y fuerza iónica en las que los viriones CCMV y BMV se hinchan entre un 20 y un 35%, lo que podría darnos una mejor idea de cómo el virión entrega su genoma a la maquinaria de replicación de la célula.

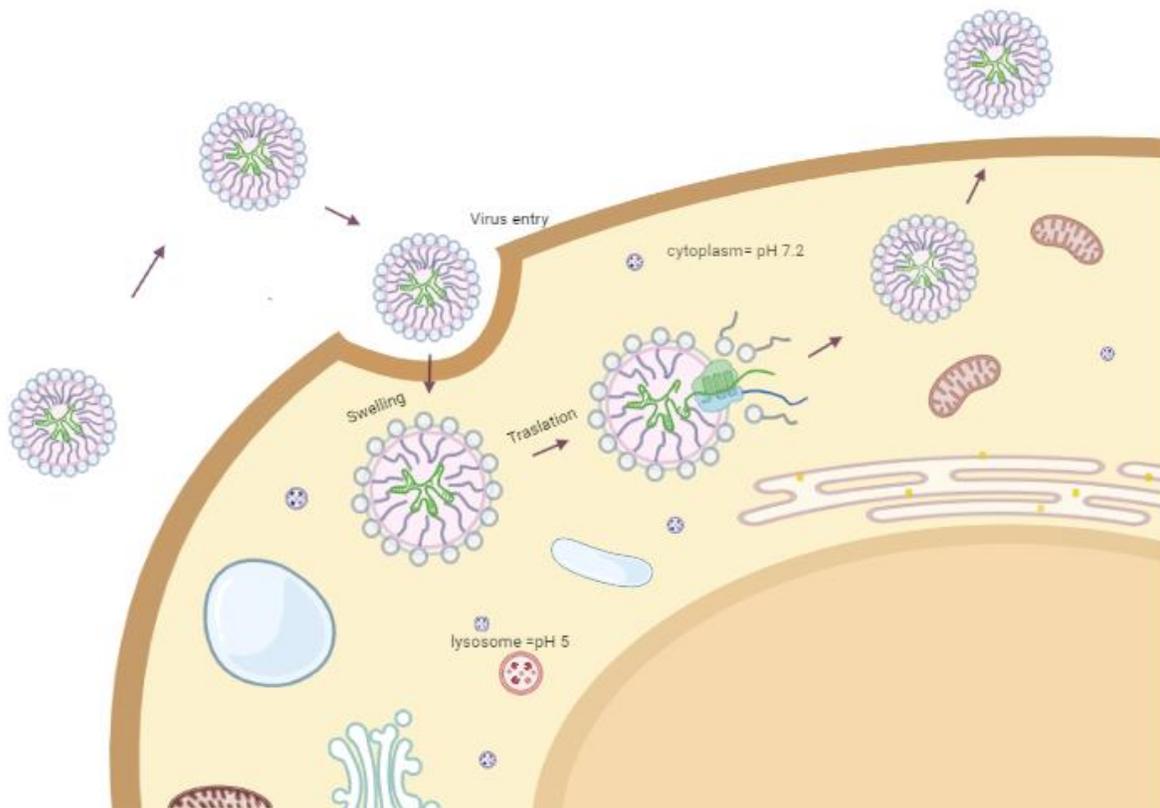


Figura 38 Representación esquemática de la liberación del genoma de un virus dentro de la célula.

4.2. OBJETIVOS

- Amplificación y purificaciones de los virus de planta CCMV y BMV.
- Estudio de la hinchazón con respecto al pH y FI de los virus CCMV y BMV mediante técnicas de DLS, MET y AFM.

4.3. HIPÓTESIS

- Se puede amplificar los virus de planta CCMV y BMV en condiciones de invernadero.
- Los virus CCMV y BMV pueden tener una hinchazón más alta del 10%.
- Los extremos 5' y 3' del material genético quedan expuestos, dando la posibilidad a la maquinaria celular de tomar el ARN y seguir con la replicación.

4.4. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se conocen miles de tipos de virus, aunque existen mecanismos de acción de los virus que aún no se conocen, uno de ellos es la entrega del material genético, entender este mecanismo es muy importante ya que nos ayudara a comprender como ocurre la entrega del material genético y el por qué los virus son tan eficientes, una teoría es que dicho mecanismo surge a partir de la hinchazón de la cápside viral, donde los extremos 5' y 3' del material genético quedan expuestos, dando la posibilidad a la maquinaria celular de tomar el ARN y seguir con la replicación, es por eso por lo que para esta etapa del proyecto se plantea la evaluación de los cambios del diámetro de la cápside del CCMV y BMV en diferentes condiciones de pH y FI.

4.5. METODOLOGÍA

4.5.1. Amplificación de los virus CCMV y BMV

La amplificación del CCMV se llevó a cabo en su hospedero natural, en frijol (*Cowpea Vigna unguiculata* (*Cowpea California Black Eye No. 5*) [104], llevándose a

cabo en invernadero, este proceso se realizó con 12 horas de luz y 12 de oscuridad, el primer paso a realizar fue la siembra (figura 32).

En el caso de la amplificación del virus BMV, fue realizada en cebada (*Hordeum vulgare*), la cual se llevó a cabo en condiciones de invernadero con 14 horas de oscuridad y 8 de luz.

Posteriormente de la amplificación cuando las plantas tenían un tamaño adecuado (aproximadamente 15 cm de altura) se procedió a la inoculación mecánica para ambos virus, ésta se realizó produciendo pequeñas lesiones en las hojas de las plantas tratando de hacer el menor daño posible, cuando se producen las lesiones llega el momento colocar el buffer de inoculación (0.01 M de fosfato de sodio y 0.01 M de cloruro de magnesio a un pH de 6, 1 ml de CCMV o BMV con una concentración de 1 mg/ml), el buffer fue esparcido dando pequeños masajes, 3 semanas posteriores a la inoculación mecánica se realizó la cosecha de las hojas que presentaron síntomas de infección (clorosis) que es la manifestación de manchas amarillas en las hojas, las hojas recolectadas se llevaron a almacenamiento a -20°C hasta el momento de la purificación del virus.



Figura 39 Imagen que muestra la siembra de frijol Cowpea California Black Eye No.

5.

4.5.2. Purificación del virus CCMV y BMV

La primera purificación de virus de plantas se realizó en 1964 por Kuhn [105], para este trabajo la purificación se realizará optimizando la metodología de diversos grupos de investigación [106] [107].

El primer paso que se realizó fue una molienda, las hojas previamente almacenadas se licuaron, con la misma cantidad de peso en hojas y volumen de buffer de extracción (0.5 M acetato de sodio, 0.08 M acetato de magnesio, titulado con ácido acético glacial a un pH de 4.5, con 1% de mercapto-etanol), con el objetivo de producir la liberación del virus por ruptura de la membrana celular conocida como lisis.

A continuación, se realizó una molienda en mortero con arena de mar desacidificada hasta obtener una pasta fina para asegurar que la membrana de las células se rompa y dejen libre al virus (figura 33a), la pasta fina obtenida de la molienda se filtra por una serie de gasas (Cheesecloth, Fischer Scientific) con el fin de separar el material sólido de la solución que contiene el virus.

Una vez obtenida la solución se agregó un volumen igual de cloroformo para separar los componentes celulares (figura 33 b), se dejó en agitación de 30 a 60 minutos. Pasado el tiempo de agitación se llevó a centrifugación por 17 minutos a 12000 g y 4 °C en una centrifuga de mesa (Heraeus Biofuge Stratus) con un rotor de ángulo fijo (Thermo 3335), en tubos de teflón con tapa resistentes al cloroformo (modelo 3114-0030).

Luego de la centrifugación se pueden observar dos fases, el sobrenadante con una tonalidad amarillo ocre y el pellet un color verde oscuro (figura 33 c), de la cual se recupera el sobrenadante (contiene el virus) como se observa en la figura 33d).

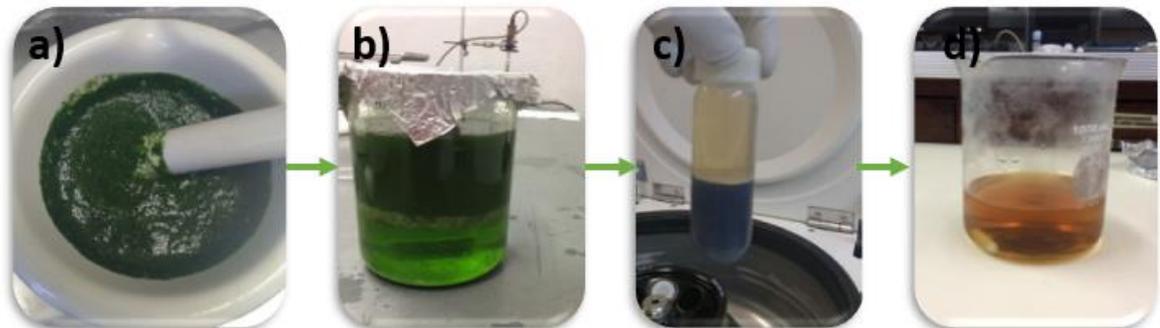


Figura 40 a) Molienda en mortero de las hojas, b) Muestra con cloroformo para separar los componentes celulares, c)d) observación de las fases el sobrenadante amarillo ocre que contiene el virus.

El sobrenadante recuperado se dejó agitar al menos 8 horas a 4°C para que el cloroformo se evapore, después se colocaron 23 mL de la solución recuperada en tubos de polipropileno (modelo 355642 para rotor SW-32Ti) y con una aguja de 2 mm de diámetro y 150 mm de largo sin punta se agrega una solución de sacarosa al 10% llamado “colchón de sacarosa” en el fondo del tubo lentamente, siempre cuidando que queden bien diferenciadas ambas soluciones como se muestra en la figura 34, a continuación se lleva a cabo una centrifugación por 138 minutos a 96416 g a 4 °C en ultracentrífuga (Beckman L-80 Ultracentrifuge). Luego de la centrifugación se desecha el sobrenadante, el pellet se resuspende con aproximadamente 50 µl de buffer de suspensión (50 mM de acetato de sodio y 8 mM de acetato de magnesio a un pH de 4.5) y se deja en agitación hasta obtener una mezcla homogénea de tonalidad marrón.

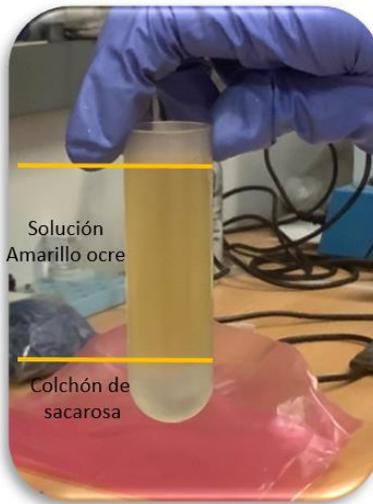


Figura 41 Imagen que muestra el colchón de sacarosa donde se puede apreciar la diferencia de fases.

Posteriormente se utiliza un gradiente de sacarosa al 25%, se colocan 30 mL de sacarosa en tubos ultraclaros (modelo 344058) y se llevan al ultracongelador (-80°C) por 1 hora. Luego se cambian a 4°C por 8 horas cuidando que el gradiente no se perturbe.

Por las paredes de los tubos se agrega 1 mL de la solución que contenía el pellet recuperado con el virus de CCMV o en su caso BMV, evitando romper el gradiente, en seguida los tubos se contrapesan y centrifugan a 96416 g por 78 minutos a 4 °C en la ultracentrífuga (Beckman L-80 Ultracentrifuge).

Al finalizar la centrifugación los tubos se iluminan con luz blanca dentro de un cuarto oscuro (debido al tamaño del virus esta dispersa luz azul claro cuando se le irradia con luz blanca policromática), por lo que se observa una franja azul aproximadamente a $\frac{3}{4}$ de altura del tubo como se observa en la figura 35.



Figura 42 Gradiente de sacarosa al 25% donde se observa la franja azul que contiene el virus a $\frac{3}{4}$ del tubo.

La solución recolectada se coloca en tubos de policarbonato de 3.2 mL (Marca Beckman modelo 362305) para el rotor de ángulo fijo (TLA-110Ti) con un volumen de 3 mL. Posteriormente se centrifuga (Beckman Coulter óptima MAS-XP) a 12074400 g por 100 minutos a 4 °C para eliminar la sacarosa, cuando el proceso de centrifugación termina, se descarta el sobrenadante de los tubos, y el pellet se resuspende en 100 μ l de buffer de suspensión.

La concentración de virus se mide en un espectrofotómetro UV-Vis (Modelo Nanodrop marca Thermo Scientific) tomando en cuenta la relación A260/A280 para poder calcular la pureza y concentración del virus y se almacena a -80 °C.

4.5.3. Estudio de los cambios en el tamaño de los virus CCMV y BMV

Para poder medir la efecto que tienen las sales sobre el virión del CCMV y BMV fue necesario hacer una serie de diálisis en una membrana de diálisis de 12,000 KD, por 24 h, a diferentes pH y con diferentes concentración de sales para variar la fuerza iónica (FI), para esto se necesitó realizar distintos buffers con las siguientes características, para los pH ácidos (4.8,5.4 y 5.8) se utilizaron buffers de citratos, para

los pH altos (6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.2, 7.4 y 7.6) se utilizó buffer de fosfatos, la concentración de virus utilizada fue de 0.3 ug/ul. En cada punto de pH se calculó la fuerza iónica con la siguiente fórmula $I=1/2(\sum_{i=1}^n c_i^2 z_i^2)$ para cada buffer y se diluyó 1/10 de tal manera que la fuerza iónica fuera de 0.01, para alcanzar la fuerza iónica deseada fue necesario agregar NaCl hasta obtener 0.1M, 0.2M y 0.3M según fuera el caso. El tamaño de partícula del virus se midió a cada pH y fuerza iónica utilizando dispersión de luz dinámica. Para cada muestra se realizaron al menos 7 experimentos con 3 mediciones cada uno y con 100 repeticiones, esto como herramienta primaria ya que al ser una alternativa accesible nos ofrece resultados al momento. Otra herramienta que se utilizó fue el microscopio de fuerza atómica (AFM) MultiMode V8 SPM NanoScope (Bruker, Santa Barbara, CA, EE. UU.) las muestras se midieron en celda líquida a temperatura ambiente. Las condiciones de pH y fuerza iónica, para las cuales se realizaron los experimentos, fueron a en el caso de CCMV de pH 7.4 y FI de 0.1 y para el BMV pH 7 y FI 0.1. Las imágenes se obtuvieron utilizando el modo fluido ScanAsyst. Para garantizar la adherencia del virus a la superficie de la mica en solución, se trató mediante dos métodos para cambiar la carga de la superficie de la mica de una carga negativa a una positiva, de modo que la cápside cargada negativamente se adhiera a la superficie de la mica. En el caso de CCMV, la mica se recubrió con 10 µL de solución de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, MW 70-150 kDa) para hacer que su carga superficial cambiara y se pueda utilizar como sustrato [108]. Después de la preparación del sustrato, se depositaron 20 µL de una solución de muestra de CCMV diluida (1 mg/mL) sobre el sustrato, se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y luego se secó cuidadosamente para dejar una capa delgada de la muestra sin permitir que se seque. Posteriormente, la muestra se montó en el escáner piezoeléctrico AFM, donde se ensambló la celda de líquido y se permitió que alcanzara el equilibrio térmico durante aproximadamente 15 minutos monitoreados con un termómetro termoacústico (TACT).

En el caso de las partículas del virus BMV, la mica recién cribada se suspendió primero en una solución de acetato de magnesio (33 mM) durante la noche para cambiar la carga superficial de negativa a positiva, y después de esto, se colocó en el escáner piezoeléctrico AFM y el líquido la celda fue montada después. Los experimentos se realizaron en la celda líquida, la cual se llenó con la solución de virus BMV en solución de fosfato a pH 7 y con una fuerza iónica de 0.1. Posteriormente, se dejó reposar durante dos horas para permitir que las partículas del virus BMV se adhirieran a la superficie de la mica a través de interacciones electrostáticas. Las imágenes también se obtuvieron usando el modo fluido ScanAsyst con una configuración de 512 píxeles/línea y una velocidad de escaneo de 0,5 Hz. La fuerza aplicada a ambas muestras, CCMV y BMV, se fijó al valor más bajo posible para evitar daños en la superficie. El análisis AFM se realizó con la medición de la altura de 100 partículas, este estudio se realizó en el sistema del equipo.

La última herramienta utilizada fue Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), JEM-200CX (JEOL) a 100 kV equipado con una cámara digital (SIA, EE. UU.). Una vez más, las muestras se prepararon en torno a las condiciones en las que se detectó una gran hinchazón mediante la muestra experimental DLS. Se depositó una gota de 6 μ l sobre una rejilla de cobre (malla 300) previamente recubierta con parlodion y carbón. Después de 1 min, el exceso de muestra se eliminó con un papel de filtro y luego la muestra se tiñó negativamente; con acetato de uranilo para muestras a pH < 6, y para pH > 6 con solución de ácido fosfotúngstico, que se preparó al mismo pH de cada muestra,[109]. Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ de uso libre para obtener los histogramas de distribución de tamaños, los cuales se construyeron a partir del análisis de al menos 100 partículas virales por cada punto realizado, cada una medida en dos direcciones.

4.6. RESULTADOS

4.6.1. Amplificación del virión

La infección en las plantas es dependiente de las condiciones ambientales, en los meses de verano la infección se ve favorecida para CCMV y en invierno es favorecida la infección del BMV, los síntomas característicos de clorosis se pueden observar después de cuatro semanas en aproximadamente un 50 a 60% del total de las hojas como se aprecia en la Figura 36.



Figura 43 a) Imagen que muestra clorosis en hojas de cebada infectadas con BMV, b)c) Clorosis en hojas de frijol infectadas con CCMV.

4.6.2. Purificación del virión

En cada proceso de purificación se utilizaron 300 gr de hoja, dependiendo de la cantidad de síntomas de infección que se observe en las hojas es la cantidad de mg de virus obtenido. La manera de determinar la pureza y cuantificar la cantidad de virus fue mediante espectroscopía UV/Vis.

Un espectro de absorbancia típico del virus CCMV se muestra en la figura 37 en donde se observa que el pico máximo se encuentra en 260 nm que corresponde a la longitud de onda donde absorben los ácidos nucleicos.

La pureza del virión se relaciona con la proporción entre la cantidad de ácido nucleico y de proteína presente, es decir, A_{260}/A_{280} la cual debe estar en un rango de 1.5 a 1.7 [70], para ser considerada como pura y apta para realizar experimentos.

El virus se almacenó en alícuotas de 1 mL con una concentración de 1 mg/mL y se guarda en un ultra congelador a -80 °C. Las purificaciones realizadas en el transcurso de este proyecto se realizaron con éxito, ya que se pudo realizar la amplificación de ambos virus con una pureza adecuada para poder ser utilizados en el estudio de la hinchazón del CCMV y BMV.

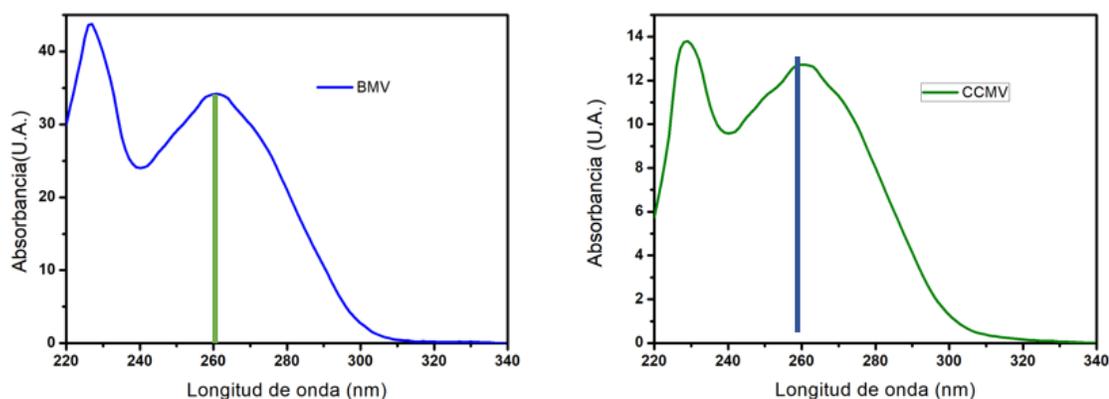


Figura 44 Gráfica que muestra el espectro de absorción típico del virus CCMV a una concentración de 1 mg/mL. La absorbancia máxima se da en 260 nm donde absorben los ácidos nucleicos (línea azul).

4.6.3. Diagrama de la evaluación del tamaño del CCMV y BMV

Como se mencionó anteriormente conocer el proceso de hinchazón de un virus es importante, para estudiar este fenómeno se llevó a cabo una serie de diálisis en las

que se utilizaron dos diferentes virus de la misma familia Bromoviridae, variando la FI y el pH, encontrando resultados bastante prometedores.

En la figura 46 a) y b) se pueden observar dos curvas de absorbancia, donde se muestra el cambio del tamaño de los virus CCMV y BMV en diferentes condiciones de pH y FI medido por DLS. Primeramente en color azul en la figura 38 a) y b) se muestra el CCMV y BMV a un pH de 6 y FI de 0.1 se observa que el diámetro de partícula que muestran es parecido a las condiciones de tamaño nativo de los virus, alrededor de 30 nm (este tamaño es 2 nm mayor al conocido en la literatura (28 nm) debido a que el equipo de DLS muestra en diámetro hidrodinámico), posteriormente en la figura 38 a) en color rojo se observan la curva de tamaño del CCMV a un pH de 7.4 y una FI de 0.1 donde se aprecia el cambio que el pico máximo se encuentra alrededor de 40 nm, a su vez en la figura 38 b) se muestra en color rojo la curva de tamaño para BMV en condiciones de pH 7.6 y FI 0.1, mostrando un pico máximo alrededor de 42 nm. A simple vista se puede apreciar la variación del tamaño cuando se presenta un cambio en las condiciones de pH, por lo que se asume que los viriones son susceptibles a los cambios de pH y surge un estado de hinchamiento.

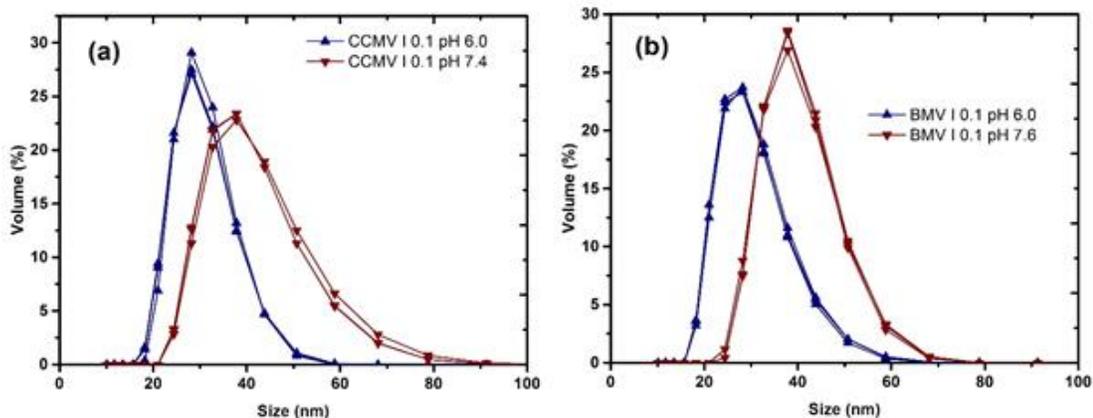


Figura 45 Medición de BMV y CCMV que muestra el cambio de tamaño DLS típico a) CCMV y b) BMV con una FI= 0.1 y con diferentes pH, donde se puede apreciar el cambio en el tamaño de los viriones.

Para la evaluación del tamaño del CCMV se utilizó el DLS el cual mostró los resultados que se observan en las figura 39, obteniendo que para una fuerza iónica de 0.1 la hinchazón fue de hasta 41 nm en un pH de 7.4, para una FI de 0.2 y 0.3 la hinchazón se presentó en un pH de 6.4, en ambos casos la hinchazón llegó a 42 nm, lo cual se considera un incremento significativo con respecto al tamaño que presenta el virus en distintas condiciones, ya que se encontró un 30-35% de hinchazón siendo significativo al 10% encontrado en la literatura. Como se mencionó anteriormente el CCMV es estable a un pH menor a 6.0, por lo que estos experimentos nos confirman esto, además cabe recalcar que es posible que esta hinchazón no sea uniforme, si no que se observara una deformación en la cápside al momento de la hinchazón, también se espera que las interacciones proteína-ARN se conserven, ya que este proceso es reversible con respecto al tiempo.

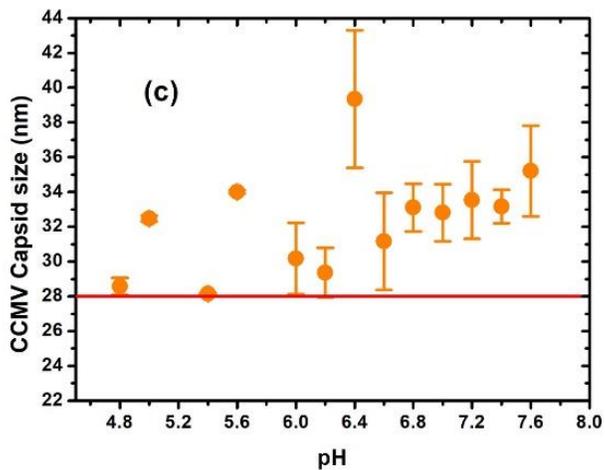
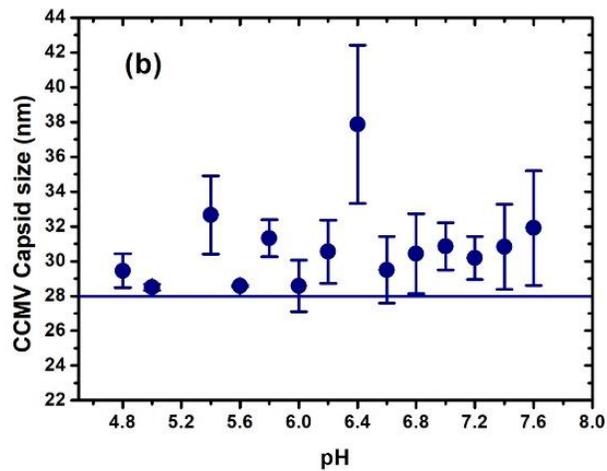
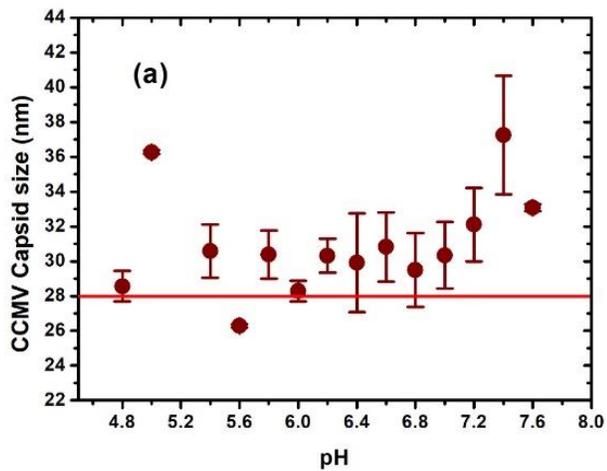


Figura 46 Cambios en el tamaño del diámetro del CCMV determinado por DLS en función del pH y la fuerza iónica (I) a) $I=0.1$, b) $I=0.2$, c) $I=0.3$.

Por otro lado, se realizó la medición de la hinchazón del BMV a las mismas condiciones que fueron utilizadas para el CCMV, para este caso en particular estas muestras un comportamiento particular, teniendo dos picos máximos, se puede observar que para una FI de 0.1 y 0.2 estos picos se encuentran en un pH de 6.8 y 7.6 y para una FI de 0.3 en un pH de 7.0 y 7.6, los valores de estos picos también se encuentran entre 37 y 42 nm (figura 40), representando una hinchazón 23 y 40%, siendo un cambio significativo del 10% conocido en la literatura. Estos puntos de hinchazón se muestran arriba de un pH arriba de un pH de 6 para FI de 0.1 y 0.2 lo cual concuerda con la literatura que dice que es estable debajo de un pH 6, en cambio para una FI de 0.3 el estado de hinchazón comienza en un pH de 5.8 lo cual nos podría indicar que el BMV es muy susceptible a los cambios en la FI.

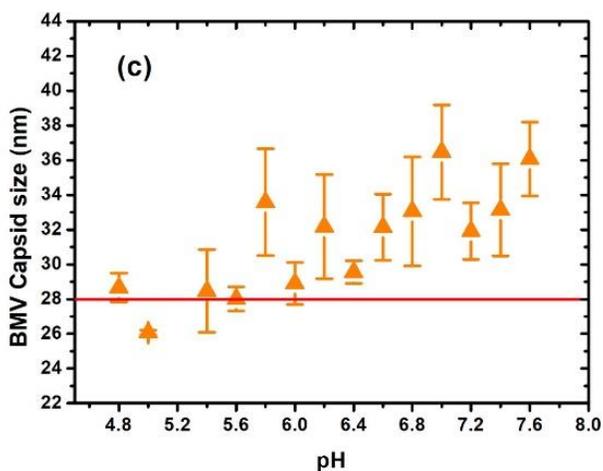
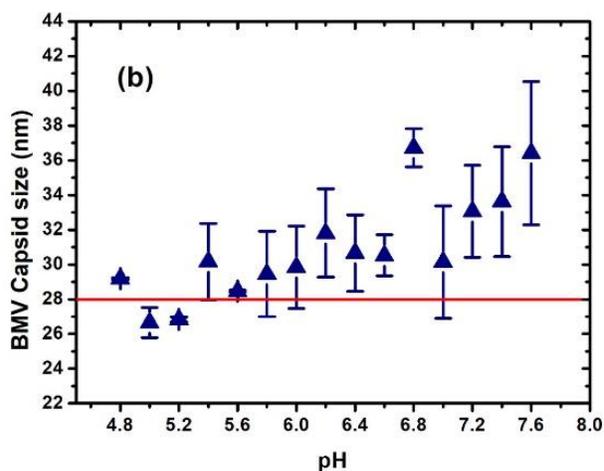
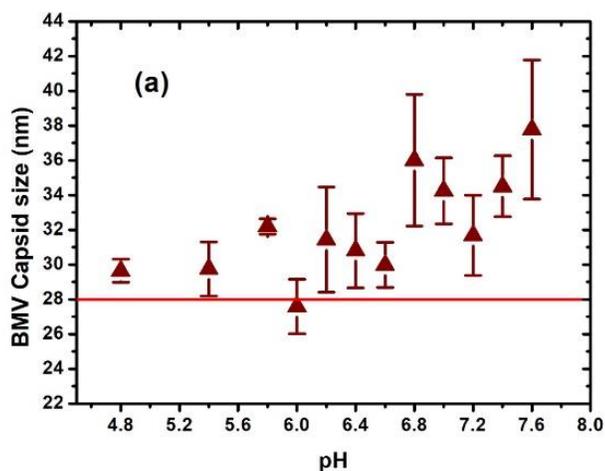


Figura 47 Cambios en el diámetro del tamaño del BMV determinado por DLS en función del pH y fuerza iónica, a) I=0.1, b) I=0.2, c) I=0.3.

En el caso del BMV se muestra mayor variación en el tamaño que presenta a diferentes condiciones de pH y FI. Con esto podemos suponer que el virus del BMV es más susceptible a los cambios de pH y FI comparado con el CCMV esto se puede deber a que la cápside del BMV es menos rígida [93].

Para comprobar los datos obtenidos en DLS, se utilizó la técnica de MET, donde pudimos observar el mismo grado de hinchamiento que en DLS, en la imagen 41 a) y b) se muestra una comparación directa entre el CCMV y BMV medida en MET (100 partículas medidas en dos direcciones utilizando ImagenJ) a diferentes condiciones de pH y FI, se puede apreciar un incremento significativo en el tamaño de la cápside viral cuando las condiciones de pH y FI son más altos.

Seleccionamos la fuerza iónica y el pH en los que el tamaño de los viriones es de aproximadamente 28 nm, y alrededor de las condiciones donde la hinchazón tiene su valor más alto según lo determinado por DLS. En la Fig. 41 a), la imagen obtenida corresponde a pH 4.5 y FI 0.1, por lo que esta figura muestra una imagen típica de CCMV, y también el tamaño típico del virión de 28 nm de diámetro. Mientras que los tamaños obtenidos a FI 0.1 y pH 7.4, y FI 0.3 y pH 6.4 muestran un tamaño de hinchamiento superior al 20 %. De manera similar la Fig. 41 b) muestra la comparación del tamaño normal (28 nm) en condiciones de FI 0.1 y pH 4.5 del virión del BMV, comparado con el tamaño de hinchazón en condiciones de FI 0.1 y pH 7.4, y I 0.3 y pH 7.4. Donde se puede observar una hinchazón mayor al 20 % para el virión BMV. La Fig. 41 c) muestran una imagen del tamaño normal del virión CCMV obtenida en

MET y las Figs. d) y e) muestran imágenes de los viriones hinchados a pH 7.4 y FI 0.1, pH 6.4 y I 0.3, respectivamente. Podemos observar como el tamaño de las muestras en condiciones de hinchamiento son mucho mayores, cabe recalcar que en los estados de hinchamiento algunas de las cápsides ya no son esféricas, están alargadas o deformadas. Lo cual era de esperarse, ya que para lograr un estado de hinchazón mayor del 10%, se esperaría que la cápside se encuentre deformada.

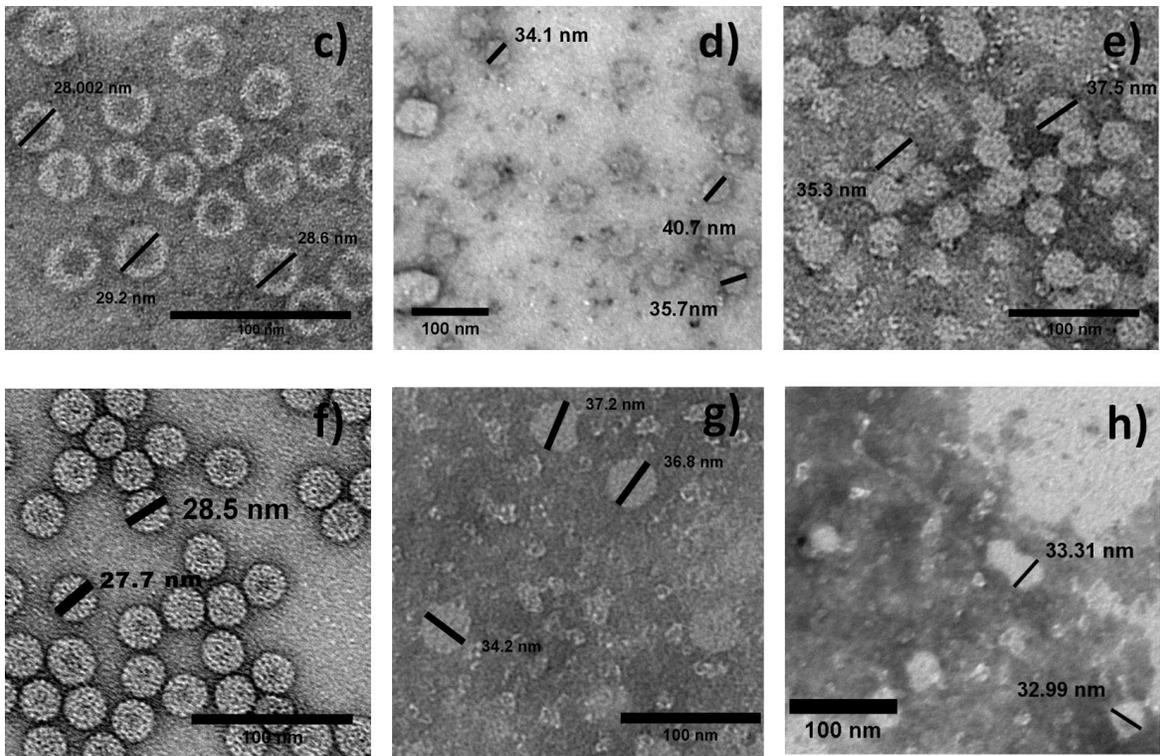
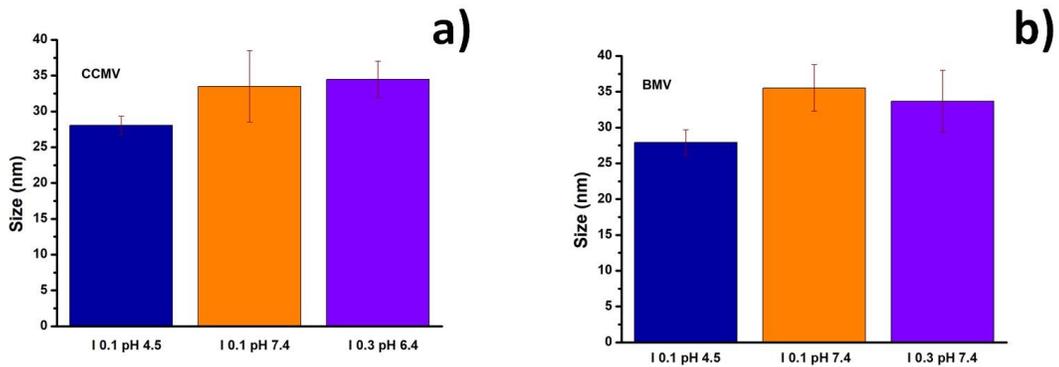


Figura 48 Imagen representativa de MET a) CCMV, b) Distribución de tamaño de BMV a diferentes condiciones de pH y FI, c) CCMV FI 0.1 y pH 4.5, d) CCMV FI 0.1 y pH de 7.4, e) CCMV FI 0.3 y pH 6.4, f) BMV FI 0.1 y pH 4.5, g) BMV FI 0.1 pH y pH 7.4, h) BMV FI 0.3 y pH 7.4.

Comparando estos resultados con los de DLS se puede observar que para el CCMV en condiciones de pH de 7.4 y FI 0.1 su tamaño fue de 37 nm comparado con 34 nm en MET esta diferencia se debe a que en DLS se mide el radio hidrodinámico, de tal manera en condiciones de pH 6.4 y FI 0.3 el CCMV en DLS mostro un tamaño de 39 nm y en MET el tamaño obtenido fue de 35 nm. Estos resultados corroboraron que existe un estado de hinchazón en el virus cuando es sometido a un cambio en el pH y la FI.

A su vez las imágenes 41 f), 41g) y 41 h) corresponden al virus BMV en condiciones de pH 4.5 y I 0.1, pH 7.4 y FI 0.1 y FI 0.3 y pH 7.4 respectivamente. Nuevamente se observa la diferencia significativa en el tamaño ante la variación del tamaño de pH y FI. Además, en los estados de hinchazón se observa que las cápsides se encuentran deformadas. Haciendo una comparación entre la técnica de DLS y MET de los estados de hinchamiento en condición de FI 0.1 y pH de 7.4 por DLS el tamaño obtenido fue de 35 nm, y para la técnica de MET fue de 36 nm y para una FI de 0.3 y un pH de 7.4 el tamaño fue de 34 nm para ambas técnicas, en general, los resultados observados por MET son consistentes con los resultados obtenidos por DLS, corroborando el estado de hinchazón en puntos específicos.

A su vez se llevó a cabo la caracterización de la hinchazón de los viriones CCMV y BMV por AFM en celda líquida. Las figuras 42 a) y b) muestran imágenes de viriones CCMV cuya altura se analizó en condiciones de pH 7.4 y FI 0.1. La figura 42 c) muestra las imágenes de perfil de los dos virus cuyas líneas de perfil se indican en las Figs. 42 a) y b). Se puede observar que el tamaño es mayor a 35 nm. En la Fig. 42 d) se muestra una comparación entre los resultados de AFM y los obtenidos con DLS para las mismas condiciones. Podemos concluir que el virus tiene un porcentaje de hinchazón similar medido por ambas técnicas; es decir, con un diámetro de 38.2 ± 6.9 nm por AFM y 37.2 ± 3.4 nm por DLS.

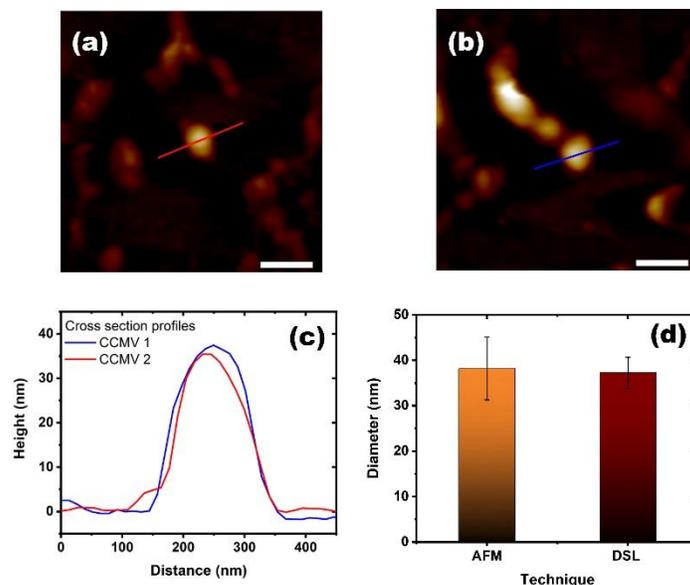


Figura 49 medición del virus CCMV realizado por AFM en celda líquida a pH 7.4 y FI 0.1. a) y b) AFM imágenes de los virus CCMV, c) perfiles de altura de las partículas del virus CCMV que se muestran en las figuras a) y b), d). Comparación del tamaño promedio del diámetro del virus observado por AFM y DLS en las mismas condiciones.

En la figura 43 a) y b) se muestran imágenes de dos viriones de BMV a pH 7 y FI 0.1. La Fig. 43 c) muestra las imágenes de perfil de los dos virus de BMV y también muestra que la hinchazón es muy similar. En la Fig. 43 d) se muestra una comparación entre los resultados de AFM con los obtenidos con DLS para las mismas condiciones.

También podemos concluir que el virus tiene un porcentaje de hinchamiento similar, con un diámetro de 36.3 ± 5.9 nm por AFM y 34.2 ± 1.9 nm por DLS.

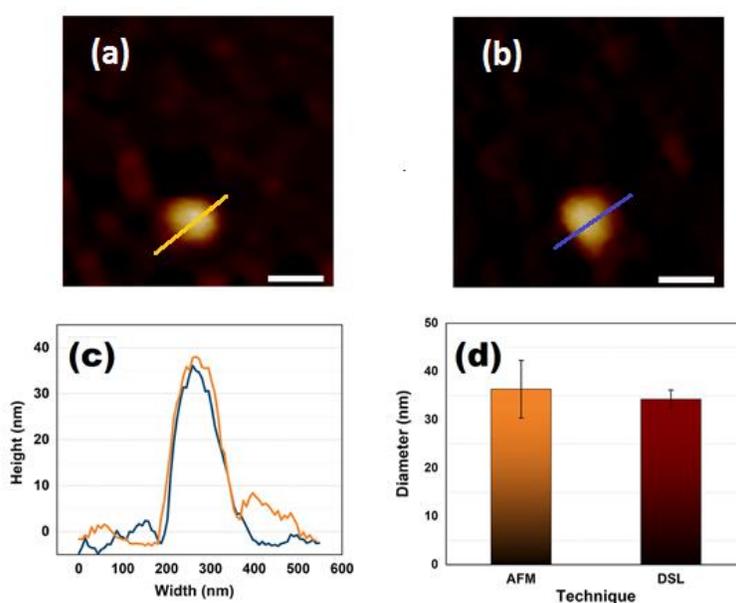


Figura 50 Estudio de Microcopia de Fuerza Atómica del BMV. a) y b) Imágenes AFM de los virus BMV en una celda líquida a pH 7 y I 0.1 en modo ScanAsyst. c) Perfiles de altura de las partículas del virus BMV mostrados en las Figs. a) y b) con las líneas sobre ello d) comparación de los resultados de AFM y DLS.

Estos experimentos realizados para algunos puntos específicos muestran una comparación con valores muy similares de los datos obtenidos por DLS, por lo confirmamos que los valores obtenidos son confiables.

En la figura 44 se muestra una comparación con experimentos realizados por Wilts y colaboradores [74], ellos utilizaron un buffer de fosfatos con una molaridad de

0.02, al cual se agregó PBS, lo que aumenta la fuerza iónica, además, también utilizaron EDTA, componentes que no se utilizaron en estos resultados. El comportamiento es muy similar, solo se muestra una diferencia de tamaño de aproximadamente 2 nm debido a la técnica de medición, ya que ellos utilizaron AFM en nuestro caso DLS. Por esta razón, sugerimos que el EDTA desempeña un papel importante en la estabilidad del virus y, por lo tanto, en ausencia de este la hinchazón es menor.

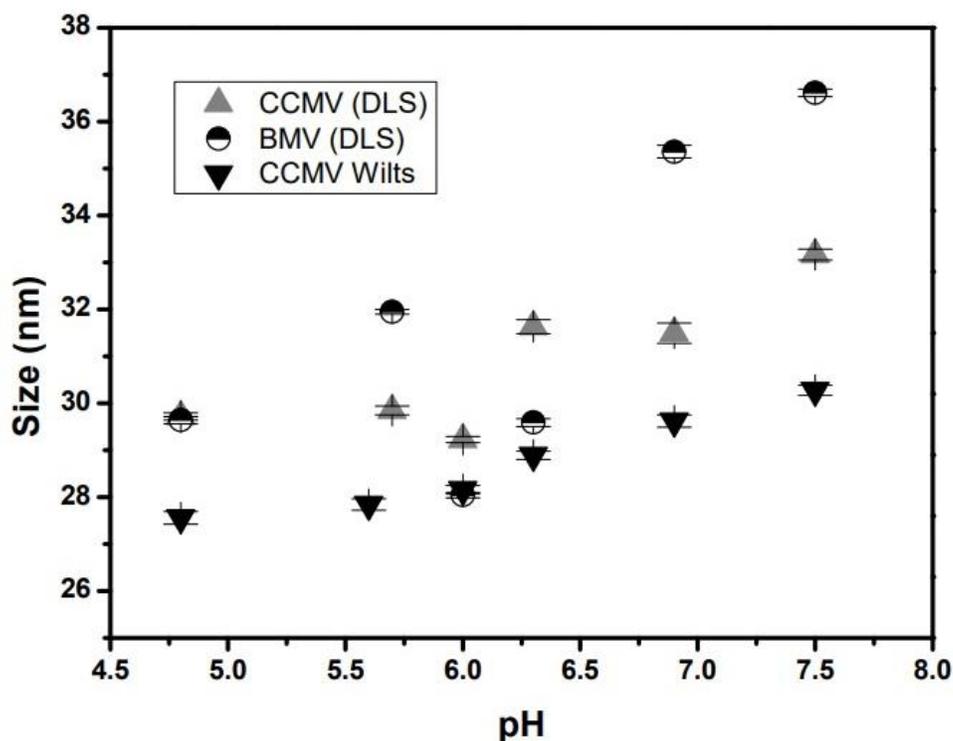


Figura 51 Imagen comparativa entre los resultados de Wilts realizados por AFM y los resultados obtenidos con las mismas condiciones en DLS para CCMV y BMV.

4.7. CONCLUSIONES

Como primera conclusión de esta etapa del proyecto, cabe destacar que se cumplió el objetivo de la amplificación y purificación de los virus CCMV y BMV en un invernadero artificial. Viéndose favorecida la obtención de BMV en temporadas donde el clima se mantiene frío, en cambio, la amplificación del CCMV se ve favorecida en los climas más cálidos.

El segundo objetivo de este proyecto fue el estudio de la hinchazón con respecto al pH y FI de los virus CCMV y BMV mediante técnicas de DLS, MET y AFM el cual se llevó a cabo con éxito. Es importante resaltar que, aunque el CCMV y el BMV sean virus muy parecidos, se pueden comportar de diferentes maneras dependiendo de las condiciones fisicoquímicas, presentando diferentes estados de hinchazón arriba de un pH de 5.6. Esta hinchazón puede ser fundamental para la entrega de ARN para que la célula pueda llevar a cabo el proceso de traducción. Este trabajo ayuda a la mejor comprensión de los virus y su comportamiento dentro de las células.

Bibliografía

- [1] R. Molins, “Oportunidades y amenazas de la nanotecnología,” *Innovación y Tecnol.*, pp. 38–53, 2008.
- [2] J. M. Provenzale and G. A. Silva, “Uses of nanoparticles for central nervous system imaging and therapy,” *Am. J. Neuroradiol.*, vol. 30, no. 7, pp. 1293–1301, 2009, doi: 10.3174/ajnr.A1590.
- [3] R. Sardar, A. M. Funston, P. Mulvaney, and R. W. Murray, “Gold nanoparticles: Past, present, and future,” *Langmuir*, vol. 25, no. 24, pp. 13840–13851, 2009, doi: 10.1021/la9019475.
- [4] I. Yildiz, S. Shukla, and N. F. Steinmetz, “Applications of viral nanoparticles in medicine,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 22, no. 6, pp. 901–908, 2011, doi: 10.1016/j.copbio.2011.04.020.
- [5] P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-sayed, and M. A. El-sayed, “Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine,” *Am. Chem. Soc.*, vol. 41, no. 12, pp. 7–9, 2008.
- [6] X. Huang *et al.*, “Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, pp. 2115–2120, 2006, doi: 10.1021/ja057254a.
- [7] C. kyu Kim *et al.*, “Gold Nanoparticles in Delivery Applications Gold nanoparticles in delivery applications,” *ELSEVIER*, vol. 60, pp. 1307–1315, 2008, doi: 10.1016/j.addr.2008.03.016.
- [8] I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, “Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 54, no. 5, pp. 631–651, 2002, doi: 10.1016/S0169-409X(02)00044-3.

- [9] S. Al-qadi and C. R. López, “Nanopartículas metálicas: oro,” *Univ. Santiago Compost.*, pp. 8–17.
- [10] A. Introduction, “Nanoparticles for photothermal therapies,” pp. 9494–9530, 2014, doi: 10.1039/C4NR00708E.
- [11] A. Sani, C. Cao, and D. Cui, “Comparison of the Native CCMV Virion within VitroAssembled CCMV Virions,” *Biochem. Biophys. Reports*, vol. 26, p. 100991, 2021, doi: 10.1016/j.bbrep.2021.100991.
- [12] A. J. Shnoudeh *et al.*, *Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles*. Elsevier Inc., 2019.
- [13] V. P. Zharov, K. E. Mercer, E. N. Galitovskaya, and M. S. Smeltzer, “Photothermal Nanotherapeutics and Nanodiagnostics for Selective Killing of Bacteria Targeted with Gold Nanoparticles,” *Biophys. J.*, vol. 90, no. January, pp. 619–627, 2006, doi: 10.1529/biophysj.105.061895.
- [14] J. L. West, “Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance,” *Med. Sci.*, vol. 100, no. 23, pp. 13549–13554, 2003.
- [15] *et al.* Sperling, Ralph A., “Biological applications of gold nanoparticles,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 37, pp. 1896–1908, 2008.
- [16] M. Salcedo-vargas, “La nanotecnología en apoyo a la investigación del cáncer,” *Nanotecnología en cáncer*, vol. 49, no. 6, pp. 621–630, 2011.
- [17] C. B. Raub, E. J. Orwin, and R. C. Haskell, “Immunogold Labeling to Enhance Contrast in Optical Coherence Microscopy of Tissue Engineered Corneal Constructs,” *HMC*, vol. 1, pp. 1210–1213, 2004.
- [18] H. B. Sokov K., Aaron J., “Optical systems for in vivo molecular imaging of cáncer,” *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 2, no. 1533–0346, 2003.

- [19] M. Das, K. H. Shim, S. S. A. An, and D. K. Yi, "Review on gold nanoparticles and their applications," *Toxicol. Environ. Health Sci.*, vol. 3, no. 4, pp. 193–205, 2011, doi: 10.1007/s13530-011-0109-y.
- [20] V. Vongsavat, B. M. Vittur, W. W. Bryan, J. Kim, and T. R. Lee, "Ultrasmall Hollow Gold À Silver Nanoshells with Extinctions Strongly Red-Shifted to the Near-Infrared," *ACS Publ.*, vol. 3, pp. 3616–3624, 2011.
- [21] Z. Liu *et al.*, "Fabrication and near-infrared photothermal conversion characteristics of nanoshells Fabrication and near-infrared photothermal conversion characteristics of Au nanoshells," *Am. Inst. Phys.*, vol. 86, pp. 10–13, 2005, doi: 10.1063/1.1874308.
- [22] S. Silver and L. T. Phung, "BACTERIAL HEAVY METAL RESISTANCE: New Surprises," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 50, no. 1, pp. 753–789, 1996, doi: 10.1146/annurev.micro.50.1.753.
- [23] K. Zheng, M. I. Setyawati, D. T. Leong, and J. Xie, "Antimicrobial silver nanomaterials," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 357, pp. 1–17, 2018, doi: 10.1016/j.ccr.2017.11.019.
- [24] E. Ertem *et al.*, "Core-Shell Silver Nanoparticles in Endodontic Disinfection Solutions Enable Long-Term Antimicrobial Effect on Oral Biofilms," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 40, pp. 34762–34772, 2017, doi: 10.1021/acsami.7b13929.
- [25] A. M. El-Kady, A. F. Ali, R. A. Rizk, and M. M. Ahmed, "Synthesis, characterization and microbiological response of silver doped bioactive glass nanoparticles," *Ceram. Int.*, vol. 38, no. 1, pp. 177–188, 2012, doi: 10.1016/j.ceramint.2011.05.158.
- [26] J. Mikiciuk, E. Mikiciuk, and A. Szterk, "Physico-chemical properties and inhibitory effects of commercial colloidal silver nanoparticles as potential

antimicrobial agent in the food industry,” *J. Food Process. Preserv.*, vol. 41, no. 2, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1111/jfpp.12793.

- [27] B. Bagchi, S. Banerjee, A. Kool, and P. Thakur, “Synthesis of eucalyptus / tea tree oil absorbed biphasic calcium phosphate – PVDF polymer nanocomposite films : a surface active antimicrobial system for biomedical application †,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016, doi: 10.1039/C6CP03493D.
- [28] X. Chen and H. J. Schluesener, “Nanosilver: A nanoparticle in medical application,” vol. 176, pp. 1–12, 2008, doi: 10.1016/j.toxlet.2007.10.004.
- [29] V. Sambhy, M. M. Macbride, B. R. Peterson, A. Sen, U. V Park, and V. Pennsylv, “Silver Bromide Nanoparticle / Polymer Composites: Dual Action Tunable Antimicrobial Materials,” no. d, pp. 9798–9808, 2006.
- [30] S. O. de la. O. | C. [Internet]. O. W. H. O. 2017, “No Title.” <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
- [31] I. Ojea-Jiménez, N. G. Bastús, and V. Puentes, “Influence of the sequence of the reagents addition in the citrate-mediated synthesis of gold nanoparticles,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, no. 32, pp. 15752–15757, 2011, doi: 10.1021/jp2017242.
- [32] Y. Wan *et al.*, “Quasi-spherical silver nanoparticles: Aqueous synthesis and size control by the seed-mediated Lee-Meisel method,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 394, no. 1, pp. 263–268, 2013, doi: 10.1016/j.jcis.2012.12.037.
- [33] A. L. Durán-Meza *et al.*, “Synthesis and characterization of extremely small gold nanoshells, and comparison of their photothermal conversion capacity with gold nanorods,” *Nanoscale*, vol. 8, no. 21, pp. 11091–11098, 2016, doi: 10.1039/C6NR00027D.
- [34] V. S. Stoll and J. S. Blanchard, “Chapter 6 Buffers. Principles and Practice1,” *Methods Enzymol.*, vol. 463, no. C, pp. 43–56, 2009, doi: 10.1016/S0076-

6879(09)63006-8.

- [35] E. Boisselier and D. Astruc, "Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 6, pp. 1759–1782, 2009, doi: 10.1039/b806051g.
- [36] Ф. Котлер, "Nanopartículas de plata para su uso como agente antibacteriano," p. 282, 2008.
- [37] R. Gowda, N. R. Jones, S. Banerjee, and G. P. Robertson, "Use of nanotechnology to develop multi-drug inhibitors for cancer therapy," *J. Nanomedicine Nanotechnol.*, vol. 4, no. 6, 2013, doi: 10.4172/2157-7439.1000184.
- [38] G. J. Doherty and H. T. McMahon, "Mechanisms of endocytosis," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 78, pp. 857–902, 2009, doi: 10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540.
- [39] M. Gutiérrez and S. López, "Mecanismo de entrada de los virus: una manera de conocer la célula," *TIP Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol. D.R. © TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 26, no. 131, pp. 26–34, 2010, [Online]. Available:
https://www.google.com.mx/url?sa=t&source=web&rct=j&url=http://www.scielo.org.mx/scielo.php%3Fscript%3Dsci_arttext%26pid%3DS1405-888X2010000100003&ved=0ahUKEwjWq6CcqqDYAhWE7iYKHeS_ALYQFghCMAQ&usg=AOvVaw3qH6rZWraM8SX54PSJuqse.
- [40] G. Ferro Flores, F. de M. Ramírez de la Cruz, B. E. Ocamo García, E. M. Morales Ávila, A. N. Mendoza Sánchez, and C. L. Santos Cuevas, "Radiofármacos : nanopartículas como sistemas multifuncionales para la obtención in vivo de imágenes moleculares," *Contrib. del Inst. Nac. Investig. Nucl. al Av. la Cienc. y la Tecnol. en México*, pp. 29–36, 2010.

- [41] L. Shen, J. Chen, N. Li, P. He, and Z. Li, "Rapid colorimetric sensing of tetracycline antibiotics with in situ growth of gold nanoparticles," *Anal. Chim. Acta*, vol. 839, pp. 83–90, 2014, doi: 10.1016/j.aca.2014.05.021.
- [42] A. Lux, "Microscopia electronica ultraestructura y citologia vegetal," *Univ. Auton. Nuevo León.*, vol. 1, pp. 1–43, 1984.
- [43] S. Edition, *Ultrastructural Pathology*. 2009.
- [44] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, and W. C. W. Chan, "Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells," *Nano Lett.*, vol. 6, no. 4, pp. 662–668, 2006, doi: 10.1021/nl052396o.
- [45] A. G. Rodriguez-Hernandez, J. C. Aguilar Guzmán, and R. Vázquez-Duhalt, "Membrana celular y la inespecificidad de las nanopartículas. ¿Hasta dónde puede llegar un nanomaterial dentro de la célula?," *Mundo Nano. Rev. Interdiscip. en Nanociencia y Nanotecnología*, vol. 11, no. 20, p. 43, 2018, doi: 10.22201/ceiich.24485691e.2018.20.62711.
- [46] I. Virmani *et al.*, "Comparative Anticancer Potential of Biologically and Chemically Synthesized Gold Nanoparticles," *J. Clust. Sci.*, vol. 31, no. 4, pp. 867–876, 2020, doi: 10.1007/s10876-019-01695-5.
- [47] H. K. Waghvani *et al.*, "Virus-Like Particles (VLPs) as a Platform for Hierarchical Compartmentalization," *Biomacromolecules*, vol. 21, no. 6, pp. 2060–2072, 2020, doi: 10.1021/acs.biomac.0c00030.
- [48] I. Balke and A. Zeltins, "Recent advances in the use of plant virus-like particles as vaccines," *Viruses*, vol. 12, no. 3, pp. 1–16, 2020, doi: 10.3390/v12030270.
- [49] I. Balke and A. Zeltins, "Use of plant viruses and virus-like particles for the creation of novel vaccines," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 145, pp. 119–129, 2019, doi: 10.1016/j.addr.2018.08.007.

- [50] C. R. Kaiser *et al.*, “Biodistribution studies of protein cage nanoparticles demonstrate broad tissue distribution and rapid clearance in vivo,” *Dep. Chem. Biochem.*, vol. 2, no. 4, pp. 715–733, 2007.
- [51] L. Lavelle, M. Gingery, M. Phillips, W. M. Gelbart, C. M. Knobler, and A. V. Obrego, “Phase Diagram of Self-assembled Viral Capsid Protein Polymorphs,” *Am. Chem. Soc.*, vol. 113, pp. 3813–3819, 2009.
- [52] M. Loredto-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.
- [53] A. de la Escosura *et al.*, “Viral capsids as templates for the production of monodisperse Prussian blue nanoparticles,” *Chem. Commun.*, pp. 1542–1544, 2008, doi: 10.1039/b800936h.
- [54] J. R. Vega-Acosta, R. D. Cadena-Nava, W. M. Gelbart, C. M. Knobler, and J. Ruiz-García, “Electrophoretic mobilities of a viral capsid, its capsid protein, and their relation to viral assembly,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 118, no. 8, pp. 1984–1989, 2014, doi: 10.1021/jp407379t.
- [55] B. J. B., G. J. Hills, and R. Markham, “A study of the self-assembly process in a small spherical virus formation of organized structures from protein subunits in vitro,” *Virology*, vol. 31, pp. 354–379, 1967.
- [56] S. B. Dergal, *Química de los alimentos*, Cuarta. México: Pearson Educación, 2006.
- [57] D. C. Hernández and L. Chávez Guerrero, “Virus, materiales naturales: Aplicaciones en nanotecnología,” *Ingenierías*, vol. 13, no. 46, pp. 16–22, 2010.
- [58] T. Douglas and M. Young, “Host–guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages,” *Nature*, vol. 393, no. May, pp. 152–155, 1998, doi: 10.1038/30211.

- [59] I. J. Minten, L. J. A. Hendriks, R. J. M. Nolte, and J. J. L. M. Cornelissen, "Controlled encapsulation of multiple proteins in virus capsids," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 49, pp. 17771–17773, 2009, doi: 10.1021/ja907843s.
- [60] T. Y. M. Douglas, "Host-guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages," *Nature*, vol. 393, pp. 152–155, 1998.
- [61] D. T., M. T. Klem, and M. Young, "Biomimetic synthesis of beta-TiO₂ inside a viral capsid," *J. Mater. Chem*, vol. 18, p. 3821, 2008.
- [62] F. D. Sikkema, M. Comellas-Aragonès, R. G. Fokkink, B. J. M. Verduin, J. J. L. M. Cornelissen, and R. J. M. Nolte, "Monodisperse polymer–virus hybrid nanoparticles," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 5, no. 1, pp. 54–57, 2007, doi: 10.1039/B613890J.
- [63] J. Cornelissen, M. Brasch, A. D. la Escosura, C. M. Y. Uetrecht, A. Heck, and T. Torres, "Encapsulation of Phthalocyanine Supramolecular Stacks into Virus-like Particles," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, pp. 6878–6881, 2011.
- [64] L. O. Liepold, J. Revis, M. Allen, L. Oltrogge, M. Young, and T. Douglas, "Structural transitions in Cowpea chlorotic mottle virus (CCMV).," *Phys. Biol.*, vol. 2, no. 4, pp. S166–S172, 2005, doi: 10.1088/1478-3975/2/4/S11.
- [65] L. 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, 2005, doi: 10.1021/ja057332u.
- [66] B. Dragnea, C. Chen, E. S. Kwak, B. Stein, and C. C. Kao, "Gold nanoparticles as spectroscopic enhancers for in vitro studies on single viruses," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 21, pp. 6374–6375, 2003, doi: 10.1021/ja0343609.
- [67] et al. Aniagyei, Stella E., "Synergistic effects of mutations and nanoparticle templating in the self-assembly of cowpea chlorotic virus," *Nano Lett.*, vol. 9, pp. 393–398, 2008.

- [68] A. L. Durán-meza, M. I. Escamilla-ruiz, X. F. Segovia-gonzález, M. V Villagrana- , J. R. Vega-acosta, and J. Ruiz-garcia, “Encapsidation of different plasmonic gold nanoparticles by the CCMV capsid protein,” no. September, 2018, doi: 10.20944/preprints201809.0294.v1.
- [69] 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.
- [70] O. W. and W. Christian, “Isolierung and cristallisation of garungs ferments,” *Biochem*, vol. 310, pp. 384–421, 1941.
- [71] J. S. Kim *et al.*, “Antimicrobial effects of silver nanoparticles,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 3, no. 1, pp. 95–101, 2007, doi: 10.1016/j.nano.2006.12.001.
- [72] C. Chauvin, P. Pfeiffer, J. Witz, and B. Jacrot, “Structural polymorphism of bromegrass mosaic virus: A neutron small angle scattering investigation,” *Virology*, vol. 88, no. 1, pp. 138–148, 1978, doi: 10.1016/0042-6822(78)90117-4.
- [73] F. Tama and C. L. B. Iii, “The Mechanism and Pathway of pH Induced Swelling in Cowpea Chlorotic Mottle Virus,” vol. 2836, no. 02, pp. 733–747, 2002, doi: 10.1016/S0022-2836(02)00135-3.
- [74] B. D. Wilts, I. A. T. Schaap, and C. F. Schmidt, “Swelling and softening of the cowpea chlorotic mottle virus in response to ph shifts,” *Biophys. J.*, vol. 108, no. 10, pp. 2541–2549, 2015, doi: 10.1016/j.bpj.2015.04.019.
- [75] D. T., Y. M., L. L., R. J., A. M., and O. L., “Structural transitions in Cowpea chorotic mottle virus (CCMV),” *Phys. Biol.*, vol. 2, pp. 166–172, 2005.
- [76] X. Fabiola *et al.*, “An Observation of a Very High Swelling of Bromovirus Members

at Specific Ionic Strengths and pH,” pp. 1–14, 2023.

- [77] A. J. Cann, *Principios de Virología Molecular*, 4th ed. ESPAÑA: ACRIBIA, 2005.
- [78] V. S. John Carter, *Virology Principles and Applications*. Liverpool: Bicentennial, 2007.
- [79] J. R. O. GUADALUPE CARBALLAL, *VIROLOGIA MEDICA*. ARGENTINA: CORPUS, 2014.
- [80] C. P. Roberto, “The Virology and its great developments,” *Rev. Multidiscip. Investig. científica*, vol. 3, no. 28, pp. 201–210, 2019.
- [81] R. D. Cadena Nava, “Partículas tipo virus y su potencial aplicación en bionanotecnología,” *Mundo Nano. Rev. Interdiscip. en Nanociencias y Nanotecnología*, vol. 7, no. 13, pp. 48–55, 2015, doi: 10.22201/ceiich.24485691e.2014.13.48708.
- [82] A. Nath and J. Berger, *Clinical Neurovirology*, Second edi. 2020.
- [83] X. Zhao, J. M. Fox, N. H. Olson, T. S. Baker, and M. J. Young, “In vitro assembly of cowpea chlorotic mottle virus from coat protein expressed in *Escherichia coli* and in vitro-transcribed viral cDNA.,” *Virology*, vol. 207, no. 2, pp. 486–94, 1995, doi: 10.1006/viro.1995.1108.
- [84] G. P. Ribeiro, S. D. Wyatt, and C. W. Kuhn, “Cowpea Stunt: A Disease Caused by a Synergistic Interaction of Two Viruses,” *Phytopathology*, vol. 68, no. 9, pp. 1260–1265, 1978, doi: 10.1094/Phyto-68-1260.
- [85] A. F. S. Mello, A. J. Clark, and K. L. Perry, “Capsid protein of cowpea chlorotic mottle virus is a determinant for vector transmission by a beetle,” *J. Gen. Virol.*, vol. 91, no. 2, pp. 545–551, 2010, doi: 10.1099/vir.0.016402-0.
- [86] et al. Bancroft, J. B., “Properties of cowpea chlorotic mottle virus, its protein and nucleic acid,” *Virology*, vol. 34, no. 2, pp. 224–239.

- [87] P. E. Dickerson, A. R. Trim, and C. Lane, "Conformational states of cowpea chlorotic mottle virus ribonucleic acid components," *Nucleic Acids*, vol. 5, no. 3, pp. 987–998, 1978.
- [88] J. M. Fox *et al.*, "Comparison of the Native CCMV Virion within VitroAssembled CCMV Virions by Cryoelectron Microscopy and Image Reconstruction," *Virology*, vol. 244, no. 1, pp. 212–218, 1998, doi: 10.1006/viro.1998.9107.
- [89] L. Liljas, "Virus assembly," *Struct. Biol.*, vol. 9, no. 47, pp. 129–134, 1999.
- [90] D. L. CASPAR and A. KLUG, "Physical principles in the construction of regular viruses.," *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, vol. 27, pp. 1–24, 1962, doi: 10.1101/SQB.1962.027.001.005.
- [91] P. Ahlquist, "Bromovirus RNA replication and transcription," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 2, no. 1, pp. 71–76, 1992, doi: 10.1016/S0959-437X(05)80325-9.
- [92] R. Sacher and P. Ahlquist, "Effects of deletions in the N-terminal basic arm of brome mosaic virus coat protein on RNA packaging and systemic infection.," *J. Virol.*, vol. 63, no. 11, pp. 4545–52, 1989, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2795712><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC251087>.
- [93] R. W. Lucas, S. B. Larson, and A. McPherson, "The crystallographic structure of brome mosaic virus," *J. Mol. Biol.*, vol. 317, no. 1, pp. 95–108, 2002, doi: 10.1006/jmbi.2001.5389.
- [94] S. P. L. Art, "Brome mosaic virus capsid." <https://fineartamerica.com/featured/brome-mosaic-virus-capsid-science-photo-library.html>.
- [95] R. W. Lucas, Y. G. Kuznetsov, S. B. Larson, and A. McPherson, "Crystallization of brome mosaic virus and T = 1 brome mosaic virus particles following a structural transition," *Virology*, vol. 286, no. 2, pp. 290–303, 2001, doi:

10.1006/viro.2000.0897.

- [96] N. L. Incardona and P. Kaesberg, "A pH-Induced Structural Change in Bromegrass Mosaic Virus," *Biophys. J.*, vol. 4, no. 1, pp. 11–21, 1964, doi: 10.1016/S0006-3495(64)86766-7.
- [97] 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.
- [98] R. Konecny, J. Trylska, F. Tama, D. Zhang, N. A. Baker, and C. L. Brooks, "Electrostatic Properties of Cowpea Chlorotic Mottle Virus and Cucumber Mosaic Virus Capsids," vol. 82, pp. 106–120, 2006, doi: 10.1002/bip.
- [99] J. A. Speir, S. Munshi, G. Wang, T. S. Baker, and J. E. Johnson, "Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy," *Structure*, vol. 3, no. 1, pp. 63–78, 1995, doi: 10.1016/S0969-2126(01)00135-6.
- [100] K. W. Adolph, "Structural transitions of cowpea chlorotic mottle virus," *J. Gen. Virol.*, vol. 28, no. 1, pp. 147–154, 1975, doi: 10.1099/0022-1317-28-1-147.
- [101] P. Pfeiffer and L. Hirth, "Aggregation states of Brome mosaic virus protein," *Virology*, vol. 61, no. 1, pp. 160–167, 1974, doi: 10.1016/0042-6822(74)90251-7.
- [102] Y. Miao, J. E. Johnson, and P. J. Ortoleva, "All-atom multiscale simulation of cowpea chlorotic mottle virus capsid swelling," *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, no. 34, pp. 11181–11195, 2010, doi: 10.1021/jp102314e.
- [103] A. Llauró *et al.*, "Calcium Ions Modulate the Mechanics of Tomato Bushy Stunt Virus," *Biophys. J.*, vol. 109, no. 2, pp. 390–397, 2015, doi: 10.1016/j.bpj.2015.05.039.

- [104] T. M. Virus, "Structure of small viruses," *Nature*, vol. 177, no. 4506, pp. 473–475, 1956.
- [105] W. Kuhn, "Purification, serology, and properties of a new cowpea virus," *Phytopathology*, vol. 54, pp. 853–857, 1964.
- [106] A. L. N. Rao, R. Duggal, F. Lahser, and T. C. Halls, *Methods in molecular genetics: Molecular Virology Techniques*, Cuatro. Orlando: Adolph K. W., 1994.
- [107] J. P. Michel, M. Gingery, and L. Lavelle, "Efficient purification of bromoviruses by ultrafiltration," *J. Virol. Methods*, vol. 122, no. 2, pp. 195–198, 2004, doi: 10.1016/j.jviromet.2004.09.005.
- [108] P. Dey *et al.*, "Multivalent Flexible Nanogels Exhibit Broad-Spectrum Antiviral Activity by Blocking Virus Entry," *ACS Nano*, vol. 12, no. 7, pp. 6429–6442, 2018, doi: 10.1021/acsnano.8b01616.
- [109] M. Krupovic and E. V. Koonin, "Multiple origins of viral capsid proteins from cellular ancestors," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 12, pp. E2401–E2410, 2017, doi: 10.1073/pnas.1621061114.

