

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

MATERIALES NANOHÍBRIDOS EN BASE A *VIRUS-LIKE PARTICLES*

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Carolina do Pazo - 165302

Natalia Puentes - 168317

Tutor: Lorena Betancor

Co-tutores: Bogdan Dragnea

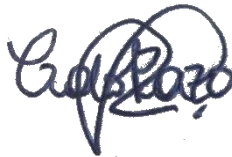
Irina Tsvetkova

2015

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Nosotras, Carolina do Pazo y Natalia Puentes, declaramos que el trabajo que se presenta en esa obra es de nuestra propia mano. Pudiendo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el Proyecto de grado;
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en el trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotras;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Carolina do Pazo



Natalia Puentes

03 de agosto del 2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queríamos agradecer a todas las personas e instituciones que han contribuido en nuestra formación:

- A nuestra tutora la Dra. Lorena Betancor, porque nos brindó la oportunidad de continuar con el tema novedoso que aprendimos en la pasantía de verano.
- Al Dr. Bogdan Dragnea y la Dra. Irina Tvetskova, nuestros co-tutores, por darnos la oportunidad de tener una grandiosa experiencia en los EEUU y poder aprender muchas cosas nuevas.
- A la Dra. Mabel Berois, por donarnos las muestras de VLP que nos permitieron llevar a cabo gran parte del presente trabajo.
- A la Lic. Josefina Louge, por ayudarnos a desarrollar los ensayos de citotoxicidad y dedicarnos tiempo a pesar de tener una beba.
- Al Dr. José Badano, por donarnos la línea celular NIH 3T3 para poder llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad.
- A la Dra. Helena Pardo, por la realización de los experimentos de DLS y potencial zeta en el Polo Tecnológico de Pando.
- A la Dra. Raluca Fratila, de la Universidad de Zaragoza por sacarnos fotos en el TEM de la muestra de nanopartículas de sílica.
- A la Lic. Pia Campot, por prepararnos las células y los reactivos para llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad.

Además queremos agradecer a los que fueron nuestro apoyo emocional en este tiempo y sin los cuales no hubiéramos podido culminar esta etapa:

- A nuestras familias, por apoyarnos incondicionalmente en todo momento de la carrera y siempre tirarnos para adelante en las decisiones que tomamos. Además, de brindarnos la oportunidad de irnos a estudiar afuera y deshacerse de nosotras por unos meses.
- A Marcos, por estar presente durante todo el proceso, en el mismo país, para dar su apoyo psicológico, emocional y hacernos los histogramas.
- A todas/os nuestras/os amigas/os que estuvieron siempre presentes brindando apoyo durante el desarrollo de la tesis.
- A Angie y Agus Z, que nos iluminaron el camino cuando la discusión de unos resultados parecían un campo minado.
- A Maria, por ser una gran compañera de laboratorio y haber compartido con nosotras la experiencia de una pasantía en el exterior.
- Al Pilti y a Steve, porque sin ellos la experiencia de la pasantía en EEUU no hubiese sido lo que fue.
- A todo el grupo de mascotas: Lady, Taby, Cleo (No) y Oddie por dar amor en momentos de estrés.

Por último queremos agradecer a la Universidad ORT por dejarnos utilizar sus instalaciones en el Laboratorio de Biotecnología para poder llevar a cabo este trabajo y a la Universidad de Indiana por brindarnos la oportunidad de trabajar en el Departamento de Química enriqueciendonos tanto profesional como personalmente.

Actualmente existe un gran interés por la nanotecnología dada su posible aplicación en diversas áreas, haciendo uso de las propiedades únicas que presentan los objetos a esta escala. Los principales productos de la nanotecnología son los nanomateriales, los cuales pueden ser naturales o artificiales. En este trabajo se ha buscado combinar distintos tipos de nanomateriales para la generación de nanohíbridos, los cuales combinan en el mismo nanosistema materiales distintos. Esto permite que el material resultante brinde características ventajosas frente a sus contrapartes aisladas. Se estudió la formación de nanohíbridos utilizando estrategias distintas y diferentes materiales inorgánicos combinados con *virus-like particles* (VLP). Se denomina VLP a las partículas formadas por las proteínas de la cápside viral que no presentan material genético y por ende no pueden ser infecciosas, aunque exhiben muchas de las propiedades de los virus. Las VLP son de gran interés para aplicaciones en biomedicina, como ser en el *delivery* de drogas, dado que pueden transportar drogas como cargas en su interior. Las ventajas que podría tener un híbrido VLP-material inorgánico es la posibilidad de mejorar la estabilidad del *carrier*. Intentando acercarnos a un posible uso como *carrier* de drogas, se prepararon materiales híbridos basados en VLP. En primer lugar se estudió la encapsulación de nanopartículas de oro y plata en el interior de VLP de *Brome mosaic virus* (BMV), un virus que infecta plantas. A partir de estos estudios, se pudo observar cómo interactúan las nanopartículas metálicas con las proteínas para lograr la formación de la VLP. Se determinó que es posible la formación de VLP encapsulando más de una nanopartícula dentro. En segundo lugar, se estudiaron distintas estrategias de unión a nanopartículas de sílica de VLP de Norovirus, un virus humano causante de la enfermedad gastroenterocolitis. Se observaron las propiedades que le otorga la sílica, un material inerte, al evaluar la estabilidad de las cápsides luego de la unión a la misma y su citotoxicidad frente a dos líneas celulares. Los ensayos de citotoxicidad sugirieron que los híbridos en las condiciones evaluadas no presentan citotoxicidad. Además, se logró caracterizar de forma exitosa dichos nanohíbridos a través de diferentes técnicas que brindaron información acerca de su forma y distribución de tamaño. Estos resultados constituyen la base de futuros análisis en los que se integrarán drogas a los híbridos para estudiar su uso potencial como *carriers* en sistemas biológicos.

PALABRAS CLAVE

Virus-like particles; Nanopartículas; Encapsulación; *Delivery* de drogas; Nanohíbridos.

1. Introducción	13
1.1 Nanotecnología y sus aplicaciones.....	13
1.1.1 Nanopartículas.....	14
1.1.1.1 Características de nanopartículas.....	14
1.2 Materiales híbridos y sus aplicaciones en biomedicina	15
1.3 Toxicidad de nanopartículas	20
1.4 VLP	21
1.4.1 VLP basadas en BMV y Norovirus.....	24
1.5 Nanopartículas inorgánicas	28
1.5.1 GNP.....	28
1.5.2 SNP	29
1.5.3 Nanopartículas de sílica	30
1.6 Encapsulación de nanopartículas	33
1.7 Unión de VLP en superficie.....	37
1.7.1 Adsorción iónica.	37
1.7.2 Unión Covalente	38
2. Objetivo.....	40
2.1 Objetivo General.....	40
2.2 Objetivos Especificos.....	40
3. Metodología	41
3.1 Materiales.....	41
3.2 Métodos.....	41
3.2.1 Expresión de BMV en <i>Nicotiana benthamiana</i> y su posterior purificación.....	41
3.2.1.1 Infección de <i>Nicotiana benthamiana</i> con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	41
3.2.1.2 Purificación del virus a partir de las hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	42
3.2.1.3 Purificación del virus por HPLC.....	42
3.2.2 Síntesis de nanopartículas inorgánicas.....	43
3.2.2.1 Síntesis de GNP 12 nm	43
3.2.2.2 Síntesis de GNP 3-5 nm.....	43
3.2.2.3 Síntesis de SNP 3-5 nm.....	43
3.2.2.4 Síntesis de SNP 17 nm.....	44
3.2.2.5 Determinación de la concentración de nanopartículas.....	44

3.2.3 Formación de híbridos de VLP de BMV	44
3.2.3.1 Funcionalización de nanopartículas inorgánicas con el ligando.....	44
3.2.3.2 Purificación de proteínas del virus BMV.....	44
3.2.3.3 Encapsulación de nanopartículas inorgánicas con ligando por las proteínas de la cápside viral	45
3.2.4 Caracterización por microscopia de las nanopartículas	45
3.2.4.1 Captura de imágenes en TEM.....	45
3.2.4.2 Medidas del diámetro de nanopartículas.....	46
3.2.4.3 Análisis estadístico.....	46
3.2.5 Estudio del proceso de desensamblado del virus BMV	47
3.2.5.1 Preparación de muestras y toma de medidas.	47
3.2.5.2 Análisis de curvas en el fluorímetro	47
3.2.6 Concentración de muestras de VLP de Norovirus.....	47
3.2.7 Análisis de proteínas por SDS-PAGE	48
3.2.8 Estrategia de cambio de pH de las muestras utilizando gel filtración.	49
3.2.9 Nanopartículas de sílica	49
3.2.9.1 Síntesis de nanopartículas de sílica con núcleo de BSA.....	49
3.2.9.2 Activación de las nanopartículas de sílica con Glutaraldehído	49
3.2.9.3 Determinación de la relación mg seco/ mg húmedo para las nanopartículas de sílica.	50
3.2.10 Estrategias de unión de nanopartículas de sílica a VLP de Norovirus	50
3.2.10.1 Unión covalente en nanopartículas de sílica con Glutaraldehído	50
3.2.10.2 Unión por atrapamiento en nanopartículas de sílica	50
3.2.10.3 Unión por adsorción en las nanopartículas de sílica.....	51
3.2.10.4 Entrecruzamiento del híbrido por adsorción con Glutaraldehído	51
3.2.10.5 Capacidad de carga de las nanopartículas de sílica	51
3.2.11 DSF.....	51
3.2.11.1 Concentración de saturación de las nanopartículas de sílica con <i>Sypro Orange</i>	51
3.2.11.2 Determinación de la estabilidad de los híbridos	52
3.2.12 DLS y potencial zeta de los híbridos	52
3.2.13 Ensayo de citotoxicidad	52
3.2.13.1 Mantenimiento y preparación de los sustratos celulares.....	52
3.2.13.2 Preparación de las muestras	53
3.2.13.3 Detección de la viabilidad celular.....	55
3.2.13.4 Análisis de los resultados de citotoxicidad	55

4. Resultados Obtenidos.....	56
4.1 Síntesis de GNP de un diámetro aproximado de 12 nm.	56
4.2 Formación de VLP <i>single core</i>	56
4.3 Síntesis de GNP de un diámetro aproximado de 3-5 nm.....	59
4.4 Formación de VLP <i>multi core</i> con GNP.....	60
4.5 Síntesis de SNP de un diámetro aproximado de 17 nm.....	61
4.6 Síntesis de SNP de un diámetro dentro de los 3-5 nm.....	63
4.7 Formación de VLP <i>multi core</i> con SNP	64
4.8 Proceso de desensamblado del virus BMV.....	68
4.9 Caracterización de muestras de VLP de las cepas GII-4 y GII-12 de Norovirus.	70
4.10 Relación (peso seco/peso húmedo) de nanopartículas de sílica.....	72
4.11 Unión de VLP de cepa GII-4 a nanopartículas de sílica.....	72
4.12 Capacidad de carga de nanopartículas de sílica con la cepa GII-12 de Norovirus	77
4.13 Saturación superficial de sílica con <i>Sypro Orange</i>	80
4.14 Estudios de estabilidad de los híbridos con VLP GII-4.....	81
4.15 Estudios de estabilidad de los híbrido con VLP GII-12	81
4.16 Preparación de los híbridos con VLP GII-12 para DLS	84
4.17 Ensayo de DLS y potencial zeta	87
4.18 Imágenes de TEM de nanopartículas de sílica.....	90
4.19 Ensayo de citotoxicidad	91
4.19.1 Línea celular NIH 3T3	91
4.19.2 Línea celular HaCaT	94
5. Discusión.....	97
5.1 Formación de VLP con <i>core</i> de oro.....	97
5.2 Formación de VLP con <i>core</i> de plata.	98
5.3 Proceso de desensamblado del virus BMV.....	99
5.4 Unión de VLP cepa GII-4 a nanopartículas de sílica.....	99
5.5 Estudios de estabilidad de híbridos VLP cepa GII-4.....	100
5.6 Capacidad de carga de la cepa GII-12 de Norovirus	100
5.7 Estudios de estabilidad de híbridos VLP cepa GII-12.....	101
5.8 Híbridos por atrapamiento con VLP cepa GII-12.....	103
5.9 DLS.....	103
5.10 Imágenes de TEM.....	105
5.11 Citotoxicidad.....	106
6. Análisis Económico	109

7. Conclusiones	110
8. Referencias Bibliográficas	111
9. Anexos.....	124
9.1 Anexo 1: Preparación de soluciones	124
9.2 Anexo 2: Medidas de diámetro de nanopartículas y VLP usando Image J	128
9.3 Anexo 3: Procedimiento para recuento celular y determinación proteica por BCA.....	131
9.4 Anexo 4: Análisis de datos en el GraphPad Prism 6	132

ABREVIACIONES

AgNO₃: Nitrato de Plata

APS: *Ammonium Persulfate* (Persulfato de amonio)

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

Ag: Plata

ARN: Ácido ribonucleico

Au: Oro

BCA: *Bicinchinic Acid* (Ácido bicinconinico)

BMV: *Brome Mosaic Virus* (no traducción)

BSA: *Bovine Serum Albumin* (Seroalbumina bovina)

CaCl₂·2H₂O: Cloruro de Calcio dihidratado

cm: centímetros

CsCl: Cloruro de Cesio

CO₂: Dióxido de Carbono

DLS: *Dynamic light Scattering* (Dispersión dinámica de luz)

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco)

DSF: *Differential Scanning Fluorimetry* (Fluorimetría diferencial de barrido)

DTT: Ditiotreitól

EDTA: *Ethylendiaminetetraacetic acid* (Ácido etilendiaminotetraacético)

g: gramos

GNP: *Gold Nanoparticles* (Nanopartículas de oro)

HAuCl₄·H₂O: Ácido cloroáurico monohidratado

HCl: Ácido clorhídrico

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografía líquida de alta eficacia)

KCl: Cloruro de Potasio

K₂CO₃: Carbonato de potasio

kDa: kiloDalton

KI: Yoduro de Potasio

MeOH: Metanol

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

MTT: Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio

mV: milivoltios

μL: Microlitros

μg: Microgramos

mL: Mililitros

mg: Miligramos

L: Litros

Mg(OAc)₂: Acetato de Magnesio

NaBH₄: Borohidruro de sodio

NaCl: Cloruro de Sodio

Na₂HPO₄: Fosfato de sodio dibásico anhidro.

nm: Nanómetros

NaOAc: Acetato de Sodio

PBS: *Phosphate Buffered Saline* (Buffer fosfato salino)

PdI: *Polydispersity Index* (Índice de Polidispersidad)

Pd: Paladio

PEG: Polietilenglicol

PEI: Polietilenimina

Pt: Platino

PVP: Polivinilpirrolidona

Rpm: revoluciones por minuto

RFU: *Relative Fluorescence Units* (Unidades de fluorescencia relativa)

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecilsulfato sódico)

SFB: Suero Fetal Bovino

SNP: *Silver Nanoparticles* (Nanopartículas de plata)

SO: *Sypro Orange* (no traducción)

SR: *Sypro Red* (no traducción)

TEM: *Transmission Electron Microscopy* (Microscopio electrónico de transmisión)

TEMED: *Tetramethylethylenediamine* (Tetrametiletilendiamina)

TEOS: Tetraetilortosilicato

TMOS: Tetrametilortosilicato

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

VLP: *Virus-Like Particles* (no traducción)

1.1 Nanotecnología y sus aplicaciones.

Las nanotecnologías se basan en el diseño y producción de objetos a escala nanométrica. Los nanomateriales son uno de los principales productos de las nanotecnologías (1,2). Existen nanomateriales naturales y artificiales, los primeros provienen de la naturaleza, como por ejemplo los virus, proteínas transportadas por la sangre que son esenciales para la vida, algunos minerales, ópalos, entre otros. En cambio, los nanomateriales artificiales son producidos a través de procesos de fabricación ingenieriles con el fin de obtener artefactos y estructuras comerciales, por lo que son de particular interés (3).

De acuerdo al número de dimensiones que se encuentren en el régimen nanométrico, los nanomateriales se pueden clasificar en cuatro tipos (**Figura 1**) (3,4):

- Materiales de dimensión cero, donde las tres dimensiones se ubican en el régimen nanométrico. Aquí es donde se encuentran las nanopartículas.
- Materiales de una dimensión. Tienen una longitud variable, pero conservan una sola dimensión en el régimen de los nanómetros, como es en el caso de los nanoalambres y nanotubos.
- Materiales de dos dimensiones, con áreas de tamaño indefinido, mantienen su espesor en el orden de 1 a 100 nm. Por ejemplo, las películas delgadas.
- Materiales de tres dimensiones, donde los sólidos tridimensionales están formados por unidades nanométricas.

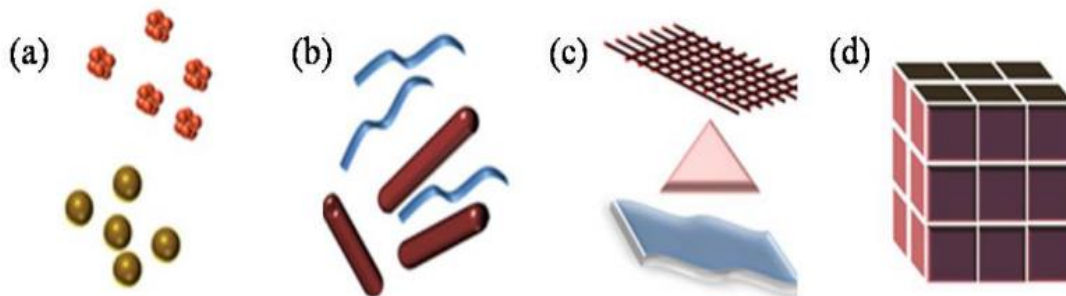


Figura 1. Clasificación de nanomateriales. (a) Materiales de dimensión cero, como ser esferas o agregados, (b) materiales de una dimensión, como nanofibras o nanotubos, (c) materiales de dos dimensiones, como películas, platos o redes, (d) materiales de tres dimensiones. Extraído del libro *Introduction to nanomaterials* (3).

Haciendo uso de estos nanomateriales, se han logrado obtener nuevas propiedades que los materiales no presentan a escala macro y que tienen el potencial para generar grandes impactos en los campos de la medicina, electrónica, óptica, cosmética, textil, tecnología de la información y protección ambiental (1-3). Por ejemplo, la nanotecnología se puede utilizar para diseñar fármacos que pueden tener como blanco órganos específicos o células cancerosas en el cuerpo, de forma de aumentar la efectividad de la terapia. Los nanomateriales también pueden ser añadidos al cemento, ropa u otros materiales para hacerlos más fuertes y a su vez más ligeros (3).

1.1.1 Nanopartículas

Las nanopartículas son objeto de intensa investigación científica, debido a una amplia variedad de aplicaciones potenciales en los campos biomédicos, ópticos, y electrónicos (5-7). Las razones por las cuales el uso de nanopartículas es atractivo están basadas en sus propiedades importantes y únicas, como por ejemplo que son del mismo rango de tamaño que las biomoléculas. También poseen un área superficial mucho mayor, si se las compara con la misma masa de material producido en un tamaño más grande. Esto puede hacer a los materiales más químicamente reactivos, ya que algunos materiales que son inertes en un tamaño mayor, son reactivos en escala nanométrica afectando las propiedades eléctricas y de solidez (8).

En el caso de las nanopartículas inorgánicas, gracias a su tamaño nanométrico, tienen propiedades físicas muy interesantes como ser diferentes propiedades fluorescentes o magnéticas. El uso de dichas propiedades ha permitido el desarrollo de biosensores más sensibles y selectivos, nuevas terapias y unir diagnóstico con terapia en un mismo dispositivo.

Las nanopartículas orgánicas e inorgánicas también pueden ser utilizadas como estructuras multifuncionales permitiendo la incorporación de diferentes biomoléculas a su superficie o dentro de nanopartículas huecas, esto se usa por ejemplo para atravesar membranas biológicas con más facilidad. El incremento de la solubilidad o estabilidad de biomoléculas o drogas es también una de las características de las nanopartículas más usadas para el desarrollo de la formulación de nuevas drogas (9).

1.1.1.1 Caracterización de nanopartículas

La caracterización de los materiales, es decir, la determinación de la forma, tamaño, distribución, propiedades mecánicas y químicas, es un punto muy importante. Dado que sirve para dos propósitos, primero como control de calidad y como parte de investigación, y también para el desarrollo de nuevos procesos, materiales y productos (8). Por lo que la caracterización

de nanopartículas es importante para comprender y controlar la síntesis y aplicaciones de las mismas. Este estudio se realiza usando una variedad de técnicas como ser:

- Microscopía electrónica de transmisión y de barrido (TEM y SEM, por su nombre en inglés *Transmission Electron Microscopy* y *Scanning Electron Microscopy*, respectivamente).
- Microscopía de fuerza atómica (AFM, por su nombre en inglés *Atomic Force Microscopy*).
- Dispersión dinámica de luz (DLS, por su nombre en inglés *Dynamic Light Scattering*).
- Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS, por su nombre en inglés *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*).
- Difractometría de rayos X (XRD, por su nombre en inglés *Powder X-Ray Diffraction*).
- Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por su nombre en inglés *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*).
- Fluorimetría diferencial de barrido (DSF, por su nombre en inglés *Differential scanning fluorimetry*)
- Determinación de potencial zeta.
- Espectroscopia UV-Vis.

Estas técnicas son utilizadas para la determinación de diferentes parámetros ya sea el tamaño de la partícula, la forma, dimensiones, cristalinidad y tamaño de poro. Además, la orientación, intercalación y dispersión de nanopartículas y nanotubos en materiales nanocompuestos pueden ser determinadas por dichas técnicas. Por ejemplo, la morfología y el tamaño de la partícula pueden ser determinados a través de TEM, SEM y AFM. La ventaja de AFM con respecto a los microscopios tradicionales, como SEM y TEM, es que mide imágenes tridimensionales por lo que la altura y el volumen de la partícula pueden ser calculados. Además, el DLS se usa para la determinación de la distribución de tamaño de las partículas. La difracción por rayos X se emplea para estudiar la cristalinidad, mientras que la espectroscopia UV-Vis se utiliza para confirmar la formación de la muestra. La técnica DSF permite estudiar la desnaturalización térmica de una proteína bajo una variedad de condiciones. Por último, el potencial zeta es una medida de la estabilidad de una partícula e indica el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundante en la partícula para desestabilizarla. En el presente estudio se trabajó con cinco de estas técnicas de caracterización de nanopartículas, estas fueron TEM, DLS, espectroscopia UV-Vis, DSF y potencial zeta (8,10-12).

1.2. Materiales híbridos y sus aplicaciones en la biomedicina

El creciente avance en la nanotecnología genera la necesidad de obtener nuevos nanomateriales, que presenten características ventajosas frente a sus contra partes utilizadas normalmente. Es por esto que se comenzó a innovar en materiales híbridos, dado que combinan dos o más materiales distintos en el mismo nanosistema, otorgando la capacidad de obtener materiales

avanzados con múltiples funcionalidades. Las posibilidades de crear híbridos son muy extensas, por lo que se procederá a indagar más a fondo sobre algunos nanohíbridos existentes (13-15).

Los nanomateriales metálicos, más específicamente, compuestos por Au, Ag, Pt y Pd, se han convertido en herramientas fundamentales para diversas aplicaciones tanto en el área electrónica, biomédica y catalítica. Esto se debe a sus propiedades electrónicas, catalíticas y ópticas únicas, las cuales están asociadas a su composición, tamaño, morfología y características de superficie (16-21). En muchos casos se hace necesario la utilización de materiales orgánicos, como ser polímeros sintéticos, pequeñas moléculas y macromoléculas para recubrir las superficies metálicas evitando que dichas nanopartículas se agreguen, dando origen a materiales nanohíbridos (22-29). Estos nanomateriales tienden a presentar propiedades sinérgicas, a diferencia de las que presentan cada uno de los elementos por separado. Lo cual permite ampliar las áreas en las que pueden ser aplicados (30-34). Dependiendo de los componentes estructurales de las nanopartículas híbridas, será la función que pueda destinársele a las mismas. Los componentes estructurales, como ser liposomas, micelas, sílica mesoporosa o biomimética, polímeros o virus, pueden transportar fármacos. Mientras que los componentes como GNP (Nanopartículas de oro, del inglés *Gold Nanoparticles*) o algunos nanotubos de carbono permiten la terapia por fotoablación, que consiste en romper uniones moleculares destruyendo el tejido por medio de volatilización, al aplicarse un láser a determinada longitud de onda, siendo muy utilizado para el tratamiento contra el cáncer (35).

En el caso de la medicina y el diagnóstico molecular, se han desarrollado nanohíbridos combinando nanopartículas metálicas con nanopartículas de sílica para detectar tejido enfermo sin comprometer los tejidos saludables. Además, al ser combinadas con biomarcadores específicos pueden ser utilizadas para observar el contexto en el que se encuentran las células afectadas por la enfermedad, tanto *in vivo* como *in vitro*. Por otra parte, los nanohíbridos pueden ser utilizados para mejorar las técnicas de imagenología, brindando la posibilidad de detectar específicamente las células enfermas y permitiendo su visualización en tiempo real (36).

Los híbridos que combinan nanopartículas inorgánicas con moléculas naturales, como ser lípidos y proteínas, son de gran interés debido a las posibles aplicaciones que podría dárseles, principalmente en el área de la biomedicina. Existen péptidos sintéticos que presentan similitudes con las proteínas capaces de nuclear la sílica, por lo que pueden utilizarse para el diseño de andamios moleculares que posibilitan la inducción de la formación de las nanopartículas de sílica permitiendo controlar dicho proceso. Por ejemplo, el lanreótido, un análogo sintético de la somatostatina, forma geles al ser colocado en agua. Dichos geles consisten en nanotubos peptídicos, que al agregarle alcóxidos de silicio el gel comienza a disociarse mientras se da la formación de un híbrido sílica/lanreótido. Lo interesante de este híbrido es que los tubos presentan una estructura de dos paredes que consiste en capas de sílica-péptido-sílica (36,37). A partir de esto, se comenzó a buscar si péptidos podían catalizar la formación de sílica. Se observó que las proteínas con propiedades autoensamblantes tenían la

capacidad de funcionar como andamios moleculares para la biosilificación (38), por lo que se comenzó a estudiar las cápsides virales.

Debido a la afinidad que presenta la sílica con los componentes externos de la cápside viral, los nanohíbridos compuestos por virus y sílica son de gran interés gracias a las propiedades que presentan los virus para desenvolverse dentro del organismo. Además, la forma de la cápside viral y la función que el virus pueda llevar a cabo, son propiedades sumamente interesantes para los nanohíbridos que se pueden obtener (13). Las cápsides virales pueden tener formas geométricas muy variadas desde tubos, como ser el virus mosaico del tabaco (TMV) de 300 nm, como se muestra en la **Figura 2a**, hasta formas icosaédricas como el *Cowpea Mosaic Virus* (CPMV) de 28 nm (**Figura 2c**) y pueden ser consideradas como posibles “bloques” para la construcción de diferentes materiales (39). Es por esta razón que han sido objeto de estudio como bloques para la biosilificación (40,41). Este proceso se ha evaluado mediante la utilización de precursores minerales, en las condiciones para que se dé la mineralización en presencia de TMV, donde se evidenció que varias reacciones pueden ser llevadas a cabo en la superficie de la cápside viral. Por otra parte, cuando se hidroliza TEOS (tetraetilortosilicato) y ocurre la condensación a bajas concentraciones de TMV, una capa fina de sílica amorfa logra cubrir la superficie de la cápside viral (41). Debido a esto, se procedió a estudiar las propiedades de calcinación del TMV en conjunto con los precursores de las nanopartículas de sílica (**Figura 2d**) (42). Otro virus utilizado para la obtención de estructuras de sílica es el bacteriófago T4 (**Figura 2b**), que mediante la condensación de TEOS con APTES ((3-Aminopropil)triétoxosilano), un aminosilano utilizado frecuentemente para la funcionalización de superficies, con el cual se logró la formación de fibras de sílica (**Figura 2e**) (43). Además, para la obtención de una estructura de sílica con cierta porosidad se realizaron estudios utilizando CPMV mediante calcinación (**Figura 2f**), método utilizado tanto para T4 como para TMV. Estos híbridos pueden tener diversas aplicaciones de interés debido a las propiedades que obtienen al ser combinados (13).

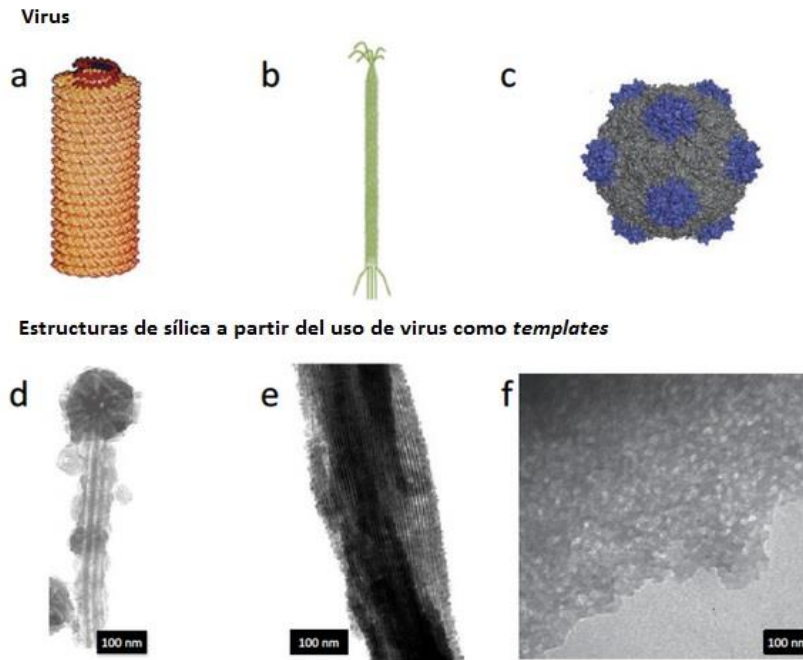


Figura 2. Ejemplos del potencial de los virus como andamios moleculares para generar estructuras de sílica. Se observan los virus: TMV (a), T4 (b) y CPMV (c), con sus respectivas estructuras de sílica formadas a partir de dichos virus: calcinación de TMV (d), T4 (e) y CPMV (f). Extraído del artículo *Self-assembly in biosilicification and biotemplated silica materials* (13).

Las nanopartículas metálicas son capaces de soportar una múltiple variedad de ligandos en su superficie, por lo cual son consideradas como candidatas para la biomedicina. Dentro de los ligandos utilizados se encuentran anticuerpos, lípidos y proteínas (44). Por ejemplo, GNP cubiertas con lípidos han sido desarrolladas para simular las partículas lipoproteicas de baja densidad, con el fin de estudiar cómo interacciona con ciertas proteínas de la membrana lipídica de las células (45). Se ha observado que las GNP pueden ser funcionalizadas a diversas moléculas, ya sea ADN, polietileneimina (PEI), tioles y otras más para poder ser transfectadas. También pueden ser modificadas y conjugadas a proteínas o péptidos ideales para actuar en el núcleo de las células (46). La habilidad de las GNP de lograr conjugarse fuertemente con moléculas biológicas ha sido muy explotada para tratamientos de cáncer, además de que se puede utilizar para el *delivery* de drogas (47). Se ha demostrado que funcionalizando agentes blanco, como ser anticuerpos o moléculas con afinidad a las células diana, a GNP se puede utilizar como una terapia viable para cáncer (48). Las GNP son capaces de convertir energía óptica en calor. Esto ocurre por la emisión cercana al infrarrojo la cual es particularmente usada para la terapia fototérmica, dado a la penetración de irradiación en los sistemas vivos (49-51). Entonces usando esta propiedad única, las nanopartículas pueden ser empleadas como una cirugía no-invasiva para matar células cancerígenas y remover tejidos enfermos (52). Además, este efecto fototérmico puede ser utilizado para mejorar la permeabilidad de la droga y controlar la liberación de la misma. Las “nanojaulas” de Au, que consisten en sistemas huecos de Au con agujeros en las esquinas truncadas, son recubiertas con una capa de un copolímero con una temperatura mínima crítica de 39 °C. Por debajo de dicha temperatura, el polímero es soluble en agua y tiene una conformación extendida que mantiene a la droga atrapada dentro de la “nanojaula”. Pero cuando la temperatura es mayor a 39 °C, el polímero pasa a ser hidrofóbico

debido a que se da una transición de fase y colapsa, por lo que libera la droga dentro de la jaula de Au (**Figura 3**) (53).

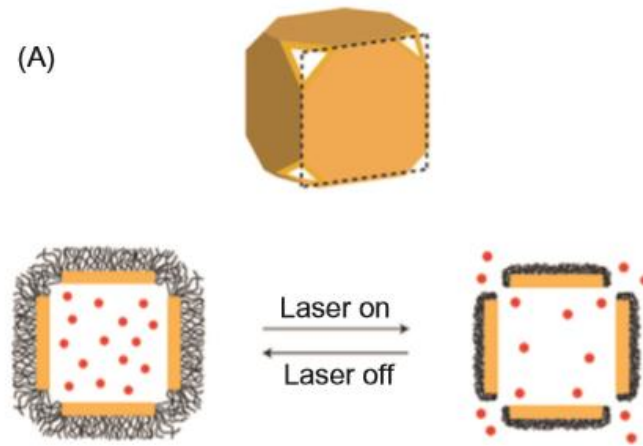


Figura 3. Ilustración esquemática del funcionamiento del sistema de “nanojaula” de Au. Se utiliza la vista de un lado de la jaula para la ilustración. Bajo la exposición de un láser, la luz es absorbida por la “nanojaula” y convertida en calor, lo que genera que el polímero inteligente colapse resultando en la liberación de la droga anteriormente cargada. Cuando el láser se apaga, las cadenas del polímero se van a relajar en su conformación extendida y se corta la liberación de droga. Extraído del artículo *Gold nanocages covered by smart polymers for controlled release with near-infrared light* (53).

Las nanopartículas orgánicas presentan una importante ventaja frente a las inorgánicas, dado que son biodegradables, por lo que pueden superar el riesgo de toxicidad crónica que pueden generar partículas que no lo son (54,55). Es por esta razón que se han utilizado mucho las *virus-like particles* (VLP) como *carriers* de moléculas terapéuticas (19), ya sea drogas anti-cáncer o el uso de virus modificados para la oncólisis viral, es decir, la destrucción de las células cancerígenas por la replicación de virus (56). Un ejemplo de asociación de nanomateriales es el de nanopartículas de sílica con virus para aplicaciones de *delivery* de drogas. Para tratamiento de cáncer se ha probado encapsular adenovirus competente para replicarse en materiales de sílica, con el fin de provocar una oncólisis viral (57). Aunque la caracterización morfológica de la construcción virus-sílica es incierta, el virus embebido en la cápsula de sílica tuvo una notoria actividad antitumoral en un modelo de cáncer de páncreas. Además, la encapsulación con sílica logró la desencadenación de una respuesta inmune significativamente menor a la observada con las partículas virales solas.

La **Figura 4** muestra de forma esquemática muchas de las aplicaciones biomédicas de los materiales nanohíbridos.

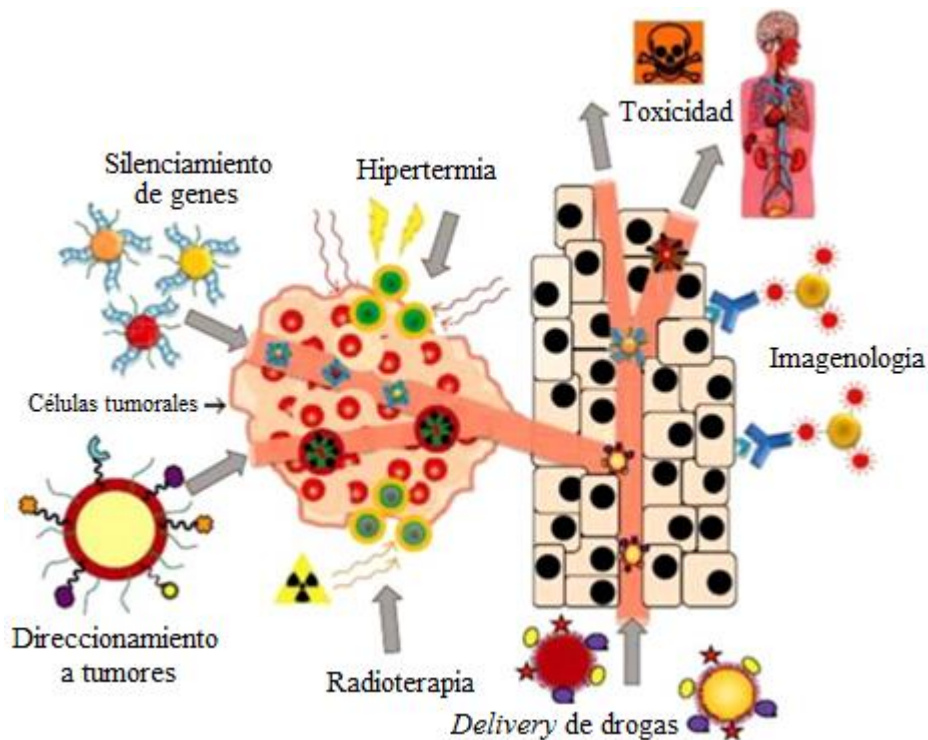


Figura 4. Esquema de varias aplicaciones biomédicas de nanopartículas empleadas para terapia. Entre ellas están: *delivery* de drogas, radioterapia, targeting de tumores, silenciamiento de genes, hipertermia, toxicidad e imagenología. Extraído del artículo *Noble metal nanoparticles applications in cancer* (58).

1.3 Toxicidad de nanopartículas.

Debido que las nanopartículas son utilizadas para detectar y tratar enfermedades humanas, es necesario entender qué efecto tienen cuando se utilizan, siendo esto crucial para que puedan ser aplicadas clínicamente. Por lo que, es importante que la investigación en nanotecnología logre descubrir y entender los múltiples factores que influyen la toxicidad de las nanopartículas para que sus propiedades no deseadas puedan ser evitadas. Por ejemplo, la toxicidad de la mayoría de los virus que son utilizados para aplicaciones en nanotecnología no ha sido evaluada aún. Estas nanopartículas pueden ser basadas en virus vegetales o virus patógenos, ya sean o no patógenos humanos. Por lo que las nanopartículas basadas en virus que no afectan humanos, presentan menos probabilidad de que interactúen con proteínas receptoras de la superficie de células humanas, para iniciar eventos de señalización intracelular que puedan finalizar en efectos tóxicos (59). Sin embargo, es imprescindible el estudio y la caracterización a fondo de estas nanopartículas para su uso clínico.

Desde el punto de vista de las nanopartículas inorgánicas, se han realizado estudios que sugieren que las SNP (Nanopartículas de plata, del inglés *Silver Nanoparticles*) son capaces de inducir toxicidad en los seres vivos. Se debe tener en cuenta que dichos estudios de toxicidad se realizaron en condiciones *in vitro*, que son drásticamente diferentes a las condiciones *in vivo* y

a concentraciones bastante elevadas de SNP. Por lo que se requieren de más estudios para poder confirmar el efecto tóxico de las SNP en los seres vivos, antes de concluir que son tóxicas (60). Para el caso de las GNP por más que los resultados generales que han sido reportados muestran controversia acerca de la toxicidad de dichas partículas, se cree que la absorción y la toxicidad de las GNP pueden ser controlables y manipuladas. Se ha demostrado la habilidad de “desintoxicar” y regular la absorción, de estas nanopartículas, a través de la funcionalización con ligandos inteligentes y benignos a la superficie de las GNP (61). Por último, la información existente acerca de la toxicidad de las nanopartículas de sílica tanto *in vivo* como *in vitro* sigue siendo controversial. Muchos estudios *in vitro* para potenciales aplicaciones farmacológicas, han demostrado que la sílica mesoporosa y biomimética no afectan la viabilidad celular o la integridad de la membrana plasmática (62,63). Otros estudios proveen evidencia que las nanopartículas de sílica generan toxicidad, dependiendo de una variedad de factores como ser la dosis, tiempo de exposición y tamaño (64).

En este trabajo nos hemos enfocado en la generación de híbridos utilizando VLP, sílica biomimética y nanopartículas metálicas. Por ello, nos detendremos en explicar las características de cada uno de estos materiales nanométricos.

1.4 VLP

En el correr de los años se ha descubierto que los virus pueden ser herramientas útiles para gran variedad de aplicaciones, como por ejemplo para el desarrollo de vacunas contra enfermedades virales (65-67). Se denomina VLP a una partícula formada por la cápside viral que carece de material genético, por lo tanto no presenta la capacidad de replicarse ni de ser infecciosa. Estas partículas proteicas se basan en la habilidad intrínseca que presentan varias subunidades de la estructura viral de auto-ensamblarse espontáneamente formando las VLP, lo cual también ocurre cuando se trata de proteínas recombinantes. Debido a que su función en la naturaleza es la de proteger y encerrar el material genético, se trata de materiales a escala nanométrica con propiedades químicas y físicas robustas, las cuales le permiten resistir temperaturas y pH extremos (68,69).

Las VLP se han convertido en una herramienta tecnológica ampliamente aceptada, principalmente en el área de desarrollo de vacunas debido a que la base de su inmunogenicidad innata radica en su estructura tridimensional, tan así que ya existen productos comercializados basados en VLP. A pesar de esto, resulta evidente que no todas las VLP generadas son apropiadas para su aplicación en el desarrollo de vacunas, algunas son producidas para facilitar la comprensión del proceso de ensamblado del virus, así como su morfología y arquitectura (70,71). Las singulares ventajas que presentan han impulsado el desarrollo de VLP como herramientas para terapia génica, la generación de nuevos materiales y en *delivery* de drogas. Esto último es debido a que las VLP están compuestas por proteínas capaces de ser reconocidas

por receptores de membrana permitiendo su endocitosis a la célula. Además, las VLP no son tóxicas dado a que su degradación genera proteínas, permitiendo llevar un cargo que, en microambientes específicos, es capaz de ser liberado en aquellas células afectadas (72).

Existen varios sistemas de expresión para la producción de VLP recombinantes, como ser varias líneas celulares de mamífero transfectadas; sistemas de células de insecto; diferentes especies de levaduras dentro de las cuales se encuentra *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*; bacterias como *Escherichia coli*; y plantas transfectadas (65,71,73).

Las VLP presentan gran interés desde el punto de vista científico, dado que pueden producirse fácilmente en cantidades que rondan los miligramos a escala de laboratorio y utilizando una metodología económica para su purificación. Las partículas que se obtienen son de tamaño nanométrico y generalmente son simétricas, polivalentes y monodispersas, dado que para cada virus las partículas son idénticas entre sí (74). Las cápsides virales pueden ser icosaédricas o en forma de bastón, con tamaños que varían desde 20 nm a 800 nm y de 20 nm a 2 µm, respectivamente (74,75). Además es posible la incorporación selectiva de materiales orgánicos o inorgánicos en zonas específicas de las VLP, por lo que se puede tener un control preciso sobre el tamaño, el espacio interno y en el ensamblado de nanomateriales que resulta en nanoarquitecturas reproducibles y uniformes (76).

Debido a que sus ventajas les permiten ser usadas para diversas aplicaciones, estas últimas se pueden dividir en:

- **Bioconjugación:** debido al carácter proteico de las cápsides virales, es posible utilizar protocolos de conjugación las cuales permiten unir ácidos nucleicos, polímeros y moléculas pequeñas a la superficie externa e interna de las partículas virales (77-80). En la **Figura 5** se observa la formación de la VLP donde se incorporan aminoácidos no naturales en la superficie de la misma, esto permite unir covalentemente los péptidos de interés afuera de la VLP.

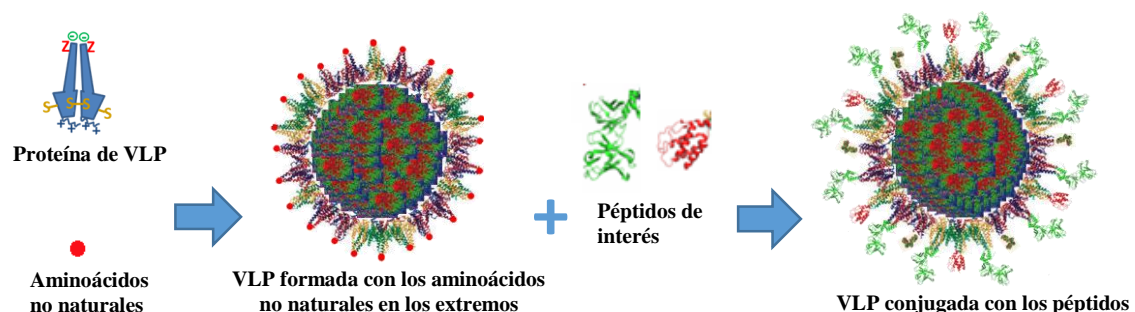


Figura 5. Esquema de la formación de VLP bioconjugada a una proteína de interés. Se observa cómo se puede conjugar la VLP a una proteína para su utilización en distintas áreas de biomedicina. Modificado de James Swartz, *Research group* (81).

- Encapsulación de Cargas Artificiales: las principales funciones de la cápside viral son proteger el genoma viral, considerado la carga natural, y dirigir dicha carga a las células blanco permitiendo el ciclo de replicación viral. Por esta razón, han buscado adaptar las propiedades naturales de la cápside viral para mantener la capacidad de auto-ensamblarse para la encapsulación de cargas artificiales, como ser drogas o nanopartículas inorgánicas (82,83). En la **Figura 6** se observa que la proteína que conforma la VLP se coloca en forma conjunta con la proteína cargo para que sea encapsulada al formarse la VLP.

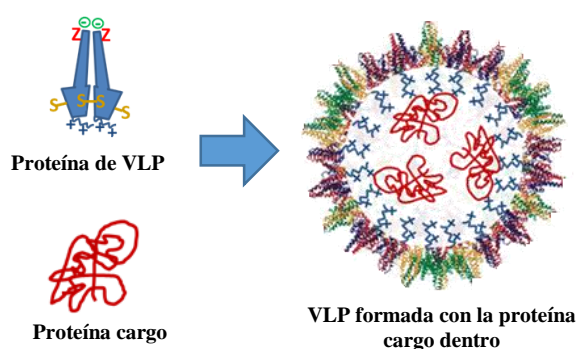


Figura 6. Esquema de la formación de la VLP con la proteína cargo encapsulada. Se observa cómo es posible incluir un cargo dentro de la VLP. Modificado de *James Swartz Research group* (81).

- Scaffolds virales para la síntesis de materiales: se han utilizado VLP para biomodelado, que es un proceso que simula la biomineralización. En donde, las VLP quedan expuestas a precursores metálico, donde las interacciones con los aminoácidos presentes en la cápside generan la nucleación del material en la cara externa de la partícula. Sus aplicaciones varían desde dispositivos electrónicos hasta dispositivos para la medicina (83-87). En la **Figura 7** se observa como las nanopartículas se nuclean (a) para ordenarse en los sitios peptídicos a lo largo del eje del bacteriófago M13 (b), que presenta una forma alargada, permitiendo generar nanocables. El virus utilizado como *scaffold* es removido mediante la aplicación de calor lo cual produce la fusión de las nanopartículas de carbón y sílice que permite obtener un nanocable solido (c) (88).

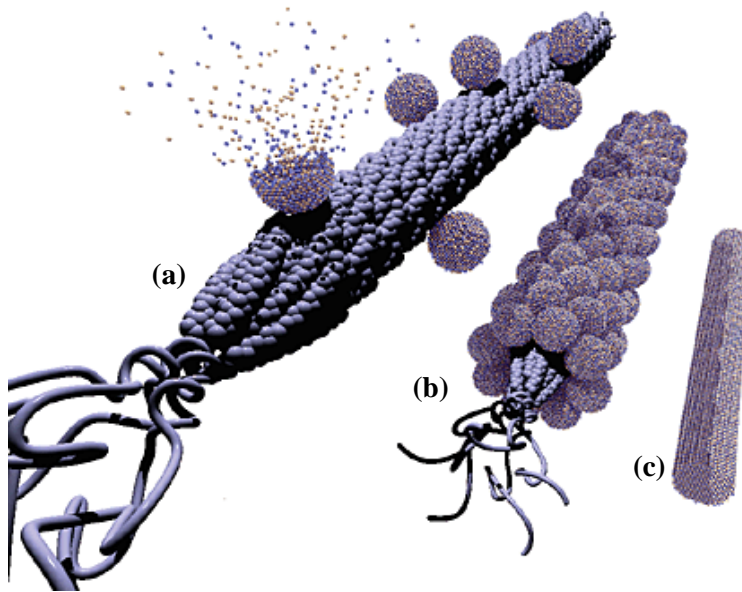


Figura 7. Virus como *template* para la obtención de nanocables. En (a) se observa como las nanopartículas de carbón con sílice se nuclean para unirse de forma ordenada a la cápside viral (b) y posteriormente formar un nanocable (c). Extraído del artículo *Advancing toward finer circuitry* (88).

- *Scaffolds* para la ingeniería de tejidos: La aparición de las VLP ha logrado interesar científicos expertos en distintas áreas permitiendo combinar diferentes habilidades para el diseño y la síntesis de materiales para la ingeniería de tejidos. Debido a que se pueden modificar las VLP a través de la química o la genética, se pueden simular las condiciones existentes en la matriz extracelular permitiendo así controlar la diferenciación de tejidos (82,83).

1.4.1 VLP basadas en BMV y Norovirus

Debido a que las características de las VLP dependen del tipo de virus que se utilice, se va a describir a continuación los dos virus utilizados en el presente trabajo, el BMV y Norovirus.

BMV es un virus de plantas con ARN de 8.216 kb y no envuelto, que pertenece al género *Bromovirus* en la familia *Bromoviridae* (89). Es un miembro del subgrupo *alphavirus-like* de virus ARN de simple hebra de sentido positivo. El genoma de BMV está compuesto de tres ARN mensajeros, pero el gen de la proteína de la cápside es expresado de un ARN subgenómico que se sintetiza a partir de la progenie (90). Para un número de triangulación $T=3$, que refiere al número de triángulos pequeños formados en una sola cara del icosaedro, las partículas son de un diámetro de 28 nm con un núcleo interior de 18 nm de diámetro. La cápside viral es icosaédrica, compuesta por 180 subunidades idénticas de una sola proteína de 19,4 kDa que forma subunidades pentaméricas o hexaméricas (91-93). La estructura de la cápside proteica

sigue el mismo patrón que muchos virus icosaédricos simples (94). Esto quiere decir que esta organización típica incluye un dominio rico en arginina, cargado positivamente y flexible que interactúa electrostáticamente con el ácido nucleico dentro de la cápside. También presenta un dominio exterior, de estructura muy bien definida, responsable de la organización icosaédrica por las interacciones entre las proteínas de la cápside (**Figura 8**) (95). La organización estructural y el hecho que la cápside puede ser fácilmente desensamblada y re-ensamblada *in vitro*, posiciona a BMV como un sistema modelo para el ensamblaje de virus ARN simple hebra icosaédricos (96).

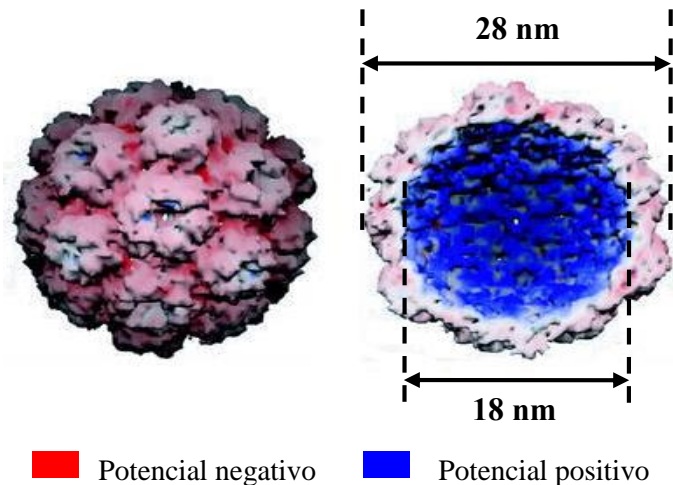


Figura 8. Representación del BMV con los potenciales de carga. Se observa en rojo el potencial de carga negativo hacia el exterior y en azul el potencial positivo en el interior del virus, donde se generan interacciones electrostáticas con la carga negativa del ácido nucleico. Extraído del artículo *The crystallographic structure of brome mosaic virus* (91).

El BMV tiene la posibilidad de desensamblarse paulatinamente, proceso que es reversible. Para poder hacer un seguimiento de este proceso una opción es la utilización de fluorocromos extrínsecos. Estos son muy utilizados para tener un control de la integridad de la proteína, especialmente con la caracterización de variantes conformacionales, como por ejemplo los inducidos por estrés del ambiente o cambios químicos de la proteína, así como varios tipos de agregados que puedan generar cambios en la morfología o tamaño. En el mercado hay una gran variedad de fluorocromos extrínsecos, pero en este trabajo se utilizaron dos. El *Sypro Orange* (SO, máximo de excitación 472 nm, máximo de emisión 569 nm) y el *Sypro Red* (SR, máximo de excitación 547 nm, máximo de emisión 635 nm). Se utilizan mucho en caracterización de proteínas, haciendo posible obtener resultados a partir de volúmenes muy pequeños por lo que son excelentes para estudios de alto rendimiento (*high-throughput*) para detectar cambios conformacionales o agregaciones (97-99).

En el estado ensamblado del virus el contacto de los residuos hidrofóbicos de las proteínas de la cápside con el solvente hidrofílico es minimizado, por lo que los fluorocromos exhiben una baja emisión. Un incremento gradual del pH, conlleva al comienzo del desensamblaje del virus y más áreas hidrofóbicas son expuestas, las cuales son reportadas como un aumento en la

emisión de fluorescencia. En muchos casos, los efectos de agregación son observados cuando las proteínas se despliegan y esto puede conllevar al plegado de áreas hidrofóbicas en moléculas individuales de proteínas resultando en una disminución de la emisión de fluorescencia (**Figura 9**) (100).

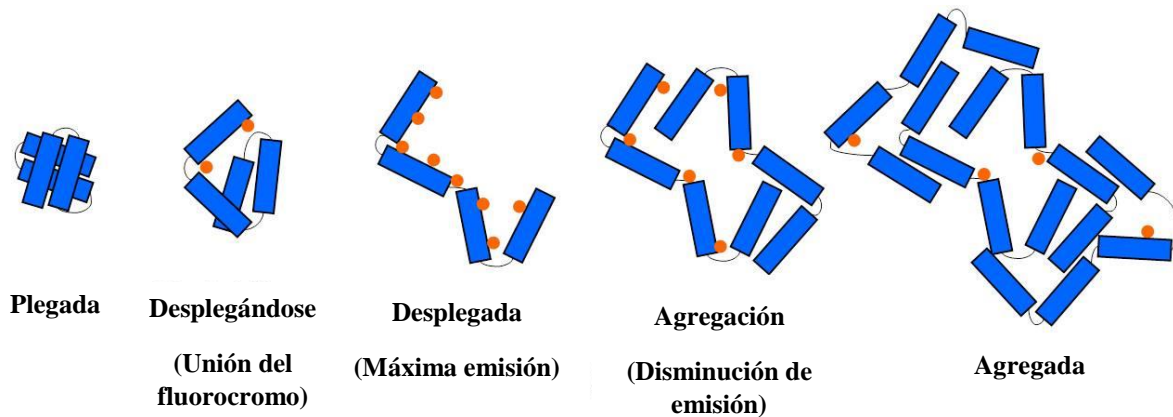


Figura 9. Representación de la interacción del fluorocromo con las zonas hidrofóbicas de la proteína a medida que sufre cambios conformacionales. Cuando se encuentra plegada la proteína el fluorocromo no tiene casi interacción con residuos hidrofóbicos por lo que no emite fluorescencia pero cuando esta comienza a desplegarse el fluorocromo se une a dichos residuos y emite fluorescencia. Llega un punto donde la proteína pasa de estar completamente desplegada (emisión máxima de fluorescencia) a un estado agregado donde la emisión de fluorescencia disminuye. Extraído del libro *Methods of Molecular Analysis in the Life Sciences* (100).

Los Norovirus pertenecen a la familia *Caliciviridae*, son virus pequeños no envueltos icosaédricos, con número de triangulación $T=3$ y de un diámetro aproximado de 27-40 nm. Actualmente son las principales causas de epidemias de gastroenterocolitis no-bacterianas tanto en países desarrollados como en desarrollo (101). Los Norovirus se han clasificado en cinco genogrupos en base a la identidad aminoacídica en la secuencia de la proteína principal de cápside (VP1) (102), dicha clasificación va desde el genogrupo I (GI) al genogrupo VI (GVI). Entre todos ellos solo los genogrupos I, II y IV pueden infectar a humanos y causar brotes de casos de Norovirus en la comunidad. Mientras que las cepas que infectan vacas y ratones se encuentran en GIII y GV, respectivamente. Además, se han identificado más de 25 sub-genotipos diferentes de GI y GII, siendo el sub-genogrupo GII-4 el más frecuentemente detectado como mayor patógeno por ser de los casos más reportados (103). Recientes estudios han demostrado que estos virus evolucionan a lo largo del tiempo a través de una serie de cambios en la secuencia de VP1 que permiten evadir la inmunidad en la población humana (103,104).

El genoma de Norovirus es ARN simple hebra de sentido positivo, aproximadamente de 7,7 kb de largo y codifica para tres ORFs. Los ORF1 y ORF2 codifican a VP1 que es la principal proteína de cápside y VP2 que es la menor proteína estructural, respectivamente (105). El virión de Norovirus está compuesto por 90 dímeros de VP1 y de una o dos copias de VP2 (106). La proteína VP1 varía entre 530 a 555 aminoácidos, lo que equivale a 58-60 kDa y tiene un punto

isoelectric teórico de 5,6. Esta proteína se pliega en dos dominios principales, el dominio de coraza (S, por su nombre en inglés *Shell*) y el dominio protruyente (P, por su nombre en inglés *Protruding*). El dominio S se localiza desde el extremo N-terminal hasta el aminoácido número 225 y contiene los elementos esenciales para la formación del icosaedro. El dominio P está constituido por los aminoácidos restantes y se subdivide en dos dominios, P1 y P2 (**Figura 10**). Es el responsable de los contactos que generan la dimerización de la proteína que incrementan la estabilidad de la misma y de las protrusiones con forma de copa que salen de la cápside. Se ha observado que los dominios S y P1 presentan un grado relativo de conservación de secuencia, mientras que P2 es una región hipervariable que se cree estar relacionada con el rol importante de unión a receptor y reactividad inmune (107)

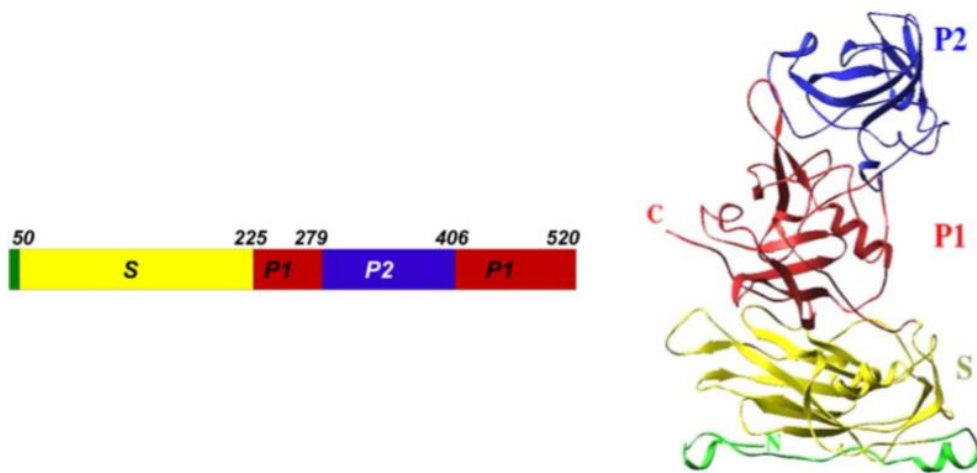


Figura 10. Esquema de los dominios de VP1 (izquierda) y modelización de un monomero de VP1 (derecha). El esquema muestra los dominios de VP1 con los mismos colores utilizados para cada region en el modelizado. En verde se observa el dominio N-terminal que se encuentra hacia el interior de la partícula (aminoácidos 10-49). El dominio de coraza (S) esta en amarillo (aminoácidos 50-225). En rojo se observa el subdominio P1 que va desde los aminoácidos 226-278 y 406-520. El dominio P2 en azul va desde los aminoácidos 279-405. Extraído del artículo *X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid* (107).

Se ha observado que VP1 se ensambla y forma la cápside viral en ausencia de VP2, aunque evidencia reciente sugiere que podría tener un rol en la estabilidad de la partícula (108) y parece ser esencial para la producción de virus infectivos (109). La proteína VP2 varía entre 208 a 268 aminoácidos, lo que equivale a 22-29 kDa y exhibe una gran variabilidad a lo largo de la secuencia entre cepas (110). Las funciones de esta proteína en el ciclo de replicación del virus no son conocidos, pero está claro que VP2 es la menor proteína estructural presente de a una o dos copias por virión (105).

1.5 Nanopartículas inorgánicas

1.5.1 GNP

Las GNP han sido muy utilizadas en los campos de electrónica (111), donde se han usado como conectores de resistores, conductores y otros elementos de chips electrónicos. También, como ya se mencionó, son utilizadas en el campo de la biomedicina en terapia fotodinámica (112) dado que se usan GNP que absorben cercano al infrarrojo, porque generan calor cuando se las excita a longitudes de onda de 700 nm a 800 nm, permitiendo así eliminar células tumorales blancas. Su uso para *delivery* de agentes terapéuticos (113) ha sido muy estudiado, ya que se puede recubrir la superficie de las GNP con diferentes moléculas. Además, se han usado mucho para diagnóstico (114), siendo capaces de detectar biomarcadores de una gran variedad de enfermedades u otras biomoléculas como ocurre en el caso de los test de embarazos. Otras aplicaciones que tienen son su uso en la fabricación de sensores (115), sondas usadas para imagenología (116) y para catálisis (117) de un gran número de reacciones químicas.

La química de la superficie de las GNP es muy versátil, lo que permite recubrirlas con polímeros y pequeñas moléculas que minimizan la agregación (**Figura 11**). El estudio de las propiedades químicas y bioquímicas de estas nanopartículas surge por la fuerte afinidad de unión del Au con tioles, disulfuros, fosfinas y aminas (118-120). El polímero más ampliamente utilizado como recubrimiento es el polietilenglicol (PEG) que es un poliéter ampliamente empleado en diversos campos, como ser en la industria. Dicho polímero presenta carga neutra y es altamente hidrófilo, evitando de este modo la adsorción de proteínas no específicas en la superficie de la nanopartícula, la absorción por el sistema reticuloendotelial y proporciona un aumento en los tiempos de circulación en sangre (121-123). La fuerte afinidad del Au por los tioles y las aminas permite a diferentes ligandos biológicos recubrir la superficie de Au, como por ejemplo ADN, péptidos, proteínas, anticuerpos, virus y receptores (**Figura 11**) (124,125). Por lo que el Au al tener la capacidad de conjugarse posee potenciales aplicaciones en varias áreas de la biomedicina.

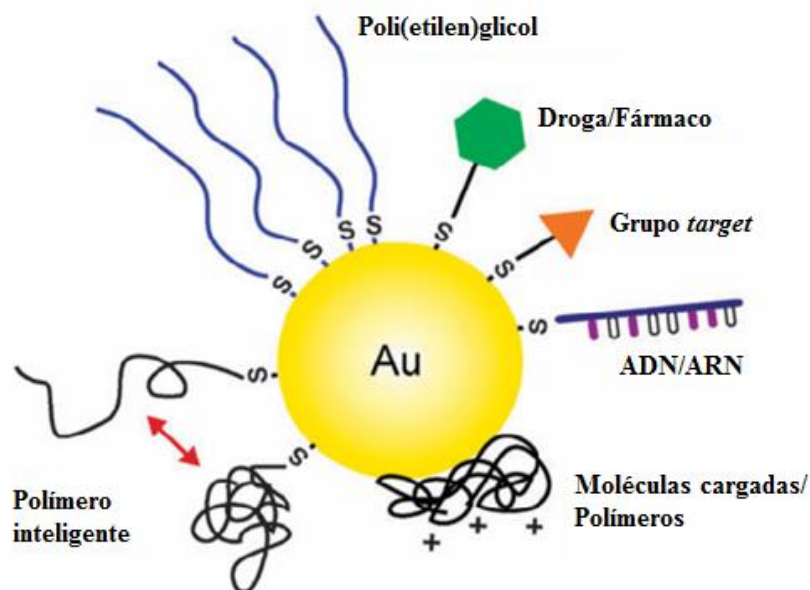


Figura 11. Diferentes funcionalizaciones a la GNP. La unión de diferentes moléculas se da a través de tioles o de adsorción pasiva. Extraído del artículo *Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications* (126).

1.5.2 SNP

Las SNP tienen propiedades ópticas, eléctricas y térmicas únicas por lo que han sido incorporadas en los campos de la fotovoltaica, la biología y la química. Actualmente, hay un aumento en el interés de utilizar las propiedades ópticas de las SNP como el componente funcional de varios productos y sensores (127). Estas nanopartículas se han aplicado en celdas fotovoltaicas (128,129) y en diodos emisores de luz (130), potenciando la eficiencia de los dispositivos.

Además de las propiedades eléctricas que tienen las SNP, también presentan una muy buena conductividad térmica. Los nanofluidos son una nueva clase de fluidos en la ingeniería, producidos mediante la dispersión de materiales de tamaño nanométrico en fluidos de base. Se ha observado que las SNP son capaces de aumentar la conductividad térmica sustancialmente, por lo que su papel en los nanofluidos constituye un gran avance tecnológico. A través de varias investigaciones se ha visto que la conductividad térmica de los nanofluidos de Ag disminuye a medida que el tamaño de la partícula se reduce (131,132).

Las SNP también poseen propiedades catalíticas, últimamente han recibido una atención considerable por su función versátil en muchas reacciones catalíticas que involucran la formación de enlaces carbono-carbono, oxidación de compuestos orgánicos, remoción de iones metálicos y actividades antimicrobianas muy eficientes (133).

Por último, las SNP han sido muy utilizadas como agentes anti-microbianos en la industria de la salud, almacenamiento de alimentos, en la industria textil y en un gran número de aplicaciones medioambientales. Es importante destacar que, por más que las mismas se vengán utilizando desde hace años, no se ha podido determinar la toxicidad de las SNP. Las SNP han sido empleadas en un gran rango de aplicaciones como agentes antibacterianos, desde la desinfección de aparatos médicos hasta tratamientos de agua (134-136). El mecanismo exacto por el cual las SNP causan un efecto anti microbiano no es conocido y es un tema muy debatido actualmente, por lo que existen muchas teorías (**Figura 12**).

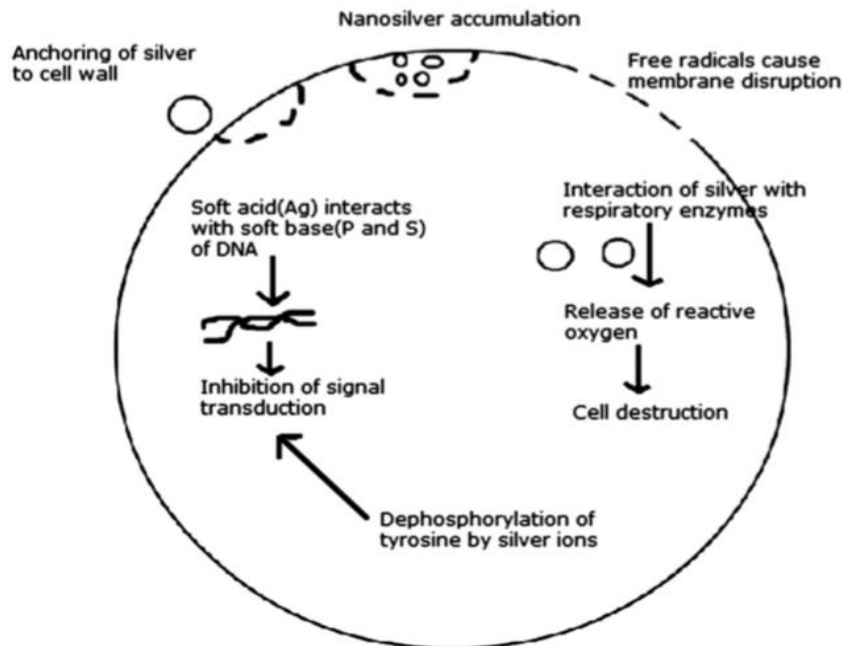


Figura 12. Mecanismos por los cuales las SNP actúan como agentes antimicrobianos en las células bacterianas. Se cree que puede ocurrir un anclaje de las SNP a la pared celular o una acumulación de las mismas que conlleve a la muerte celular. La interacción con SNP puede generar radicales libres que pueda resultar en la ruptura de la membrana de la célula o produzca especies reactivas de oxígeno, en ambos casos termina en muerte celular. También se maneja el hecho que la Ag reaccione con P o S del ADN o que se liberen iones de Ag de las nanopartículas y desfosforilen sustratos del proceso de señalización para la traducción de la célula, lo cual para los dos casos resulta en una inhibición en el proceso de traducción. Extraído del artículo *Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity* (134).

1.5.3 Nanopartículas de sílica

Las nanopartículas de sílica son biocompatibles y presentan baja toxicidad, siendo estas propiedades excelentes para *nanocarriers* a ser usados en biomedicina. La estructura de las nanopartículas de sílica puede ser controlada variando parámetros químicos, por lo que, tanto el tamaño de partícula como la forma puede seleccionarse a partir de determinados ajustes. Los grupos presentes en la superficie son beneficiosos para posteriores modificaciones que permitan introducir funcionalidades adicionales, como ser, reconocimiento celular, absorción de biomoléculas específicas, mejora de la interacción con células y aumento del consumo celular. Las nanopartículas de sílica pueden prepararse por métodos de moldeado, las cuales pueden

aplicarse para *delivery* de moléculas de diferentes pesos moleculares. Se han estudiado partículas de sílica en el rango de 50-200 nm como *nanocarriers* y *delivery* de antígenos, observándose que presentan una buena capacidad de carga, un buen desempeño al efectuar el *delivery* y la liberación de la carga (74,137-144).

La formación de sílica biológica fue definida como biosilificación y refiere a un mecanismo en donde las células generan nanoestructuras únicas de compuestos duros, mediante la utilización de proteínas como “andamios” que se ven atrapadas una vez que el material inorgánico se va formando. Esta reacción fomentó investigaciones para encontrar reacciones análogas, capaces de ser utilizadas en los mecanismos de unión. La biosílica es la sílica sintetizada *in vivo* a partir de organismos como diatomeas, radiolarios, esponjas y plantas, pero no debe confundirse con la sílica sintetizada *in vitro* donde se utilizan biomoléculas como péptidos y proteínas para facilitar la reacción. La síntesis *in vitro* es la reacción análoga la síntesis *in vivo*, la cual se utiliza para la unión de moléculas de interés a la sílica (145-147).

Existen dos clases importantes de biomoléculas que participan en la biosilificación: proteínas fosforiladas y las poliaminas. El primer tipo de proteínas es conocido como silafinas y son polipéptidos policatiónicos modificados de forma única que han sido implicados en la biogénesis de biosílica de diatomeas (147,148). Las diatomeas son el sistema modelo predilecto para el estudio del proceso de la biosilificación. Se trata de algas unicelulares que poseen paredes compuestas por biosílica amorfa con un micro y nano patrón especie-específico (149). A partir del mecanismo dentro de las diatomeas se buscó la forma de crear una ruta sintética para la producción de sistemas biomiméticos y bioinspirados en el mismo. Se logró aislar la silafina a partir de las células de la pared de diatomeas *Cylindrotheca fusiformis*, la cual demostró ser capaz de generar redes de nanoesferas de sílica en cuestión de segundos al agregarse una solución de ácido silícico (146,147). Desde entonces, muchas investigaciones se dedicaron al estudio del uso de las nanoestructuras de sílica para una gran variedad de aplicaciones. El desarrollo de las aplicaciones de la sílica *in vitro* fue más lento que lo esperado, debido a que se necesitaba comprender fundamentalmente los sistemas de las biomoléculas de sílica. A pesar de esto, se demostró su aplicabilidad en varias áreas, viendo su aplicación para la realización de sensores, revestimientos, catálisis y biocatálisis, *delivery* de drogas, materiales híbridos y *scale-up* (150).

El mecanismo propuesto para la polimerización de las nanopartículas de sílica biomimética involucra la presencia de grupos amino no cargados en las poliaminas, lo que facilita la condensación de ácido silícico vía intercambio protónico reversible, lo que resulta en la producción de una molécula de agua. La deposición de la sílica resulta de interacciones específicas entre los derivados del ácido silícico, como ser el tetrametilortosilicato (TMOS) y la biomolécula. Por otra parte las poliaminas, como el PEI, aceleran la polimerización del ácido silícico y co-precipitan con la sílica. Dicha precipitación es dirigida por las poliaminas de cadena larga y requiere de la presencia de iones fosfatos. Los aniones fosfato sirven como

agentes entrecruzantes iónicos, induciendo la formación de micro gotas ricas en poliaminas y fosfatos que solidifican cuando se les agrega el ácido silícico (150-152).

Muchos materiales de sílica nanoestructurados que fueron sintetizados, inspirados por la nanofabricación de sílica natural, derivaron en nanopartículas de diferentes formas como ser: esferas, esferas huecas, fibras y tubos (153-155). Pero las nanopartículas de mayor interés son las esféricas debido a sus posibles aplicaciones en el área tecnológica, para la cual se desarrollaron diferentes métodos con el fin de obtener diferentes tamaños de partículas a escala nanométrica que van de los 50 nm a los 800 nm (156). Por otra parte son muy utilizadas las nanopartículas de sílica mesoporosa, cuyo proceso de síntesis se diferencia del de sílica biomimética permitiendo obtener una superficie rugosa y no lisa.

Las ventajas de la utilización de las nanopartículas de sílica biomimética son: sus bajos costos, dado que no son necesarios muchos reactivos químicos ni consumo energético para una síntesis laboriosa; síntesis rápida, ya que la unión ocurre en segundos; suave, dado que la formación de las nanopartículas ocurre a temperatura ambiente y a pH neutro; tamaño de escala nano, estabilidad química y térmica. Además, presentan alta estabilidad en soluciones acuosas, son inertes y polimorfas, ya que presenta la posibilidad de diseñar diferentes formas variando las condiciones durante la precipitación de sílica (151,157-159). Este material ha sido utilizado debido a su nanoestructura, que le brinda una gran área superficial, una estructura ordenada y una mayor estabilidad ante la presencia de fuerzas químicas y mecánicas (160). Por otra parte, si se las usa para posibles aplicaciones como *delivery* de drogas, presentan propiedades físicas y químicas interesantes, como ser transparentes, poco apetecidas por microorganismos y presentar la posibilidad de actuar como barrera, limitando el efecto del ambiente externo en el núcleo de la partícula. La superficie de la sílica promueve la dispersión de las nanopartículas en soluciones acuosas, gracias a la estabilización electroestática, lo cual resulta beneficioso para realizar bioensayos (159-162). En la **Figura 13 (a)** se observa una imagen de SEM de las nanopartículas sintetizadas utilizando BSA como *core* que permite la obtención de moléculas más pequeñas y no agregadas (163).

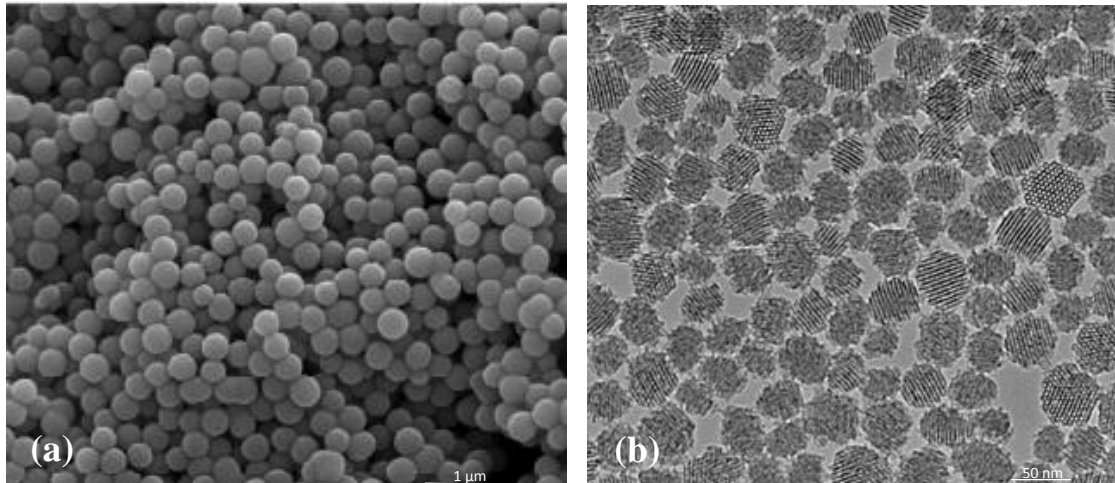


Figura 13. Imagen de microscopia de los dos tipos de nanopartículas de sílica. (a) Nanopartículas de sílica biomimética con BSA analizadas por SEM. (b) Nanopartículas de sílica mesoporosa analizadas por TEM. Extraído de *Protein templated biomimetic silica nanoparticles* (164) y *Leong cancer research lab* (165).

Existen variedad de estrategias de asociación de VLP con nanopartículas inorgánicas para la obtención de nanohíbridos, a continuación se describen brevemente las utilizadas en el presente trabajo.

1.6 Encapsulación de nanopartículas

La encapsulación de cargas artificiales se divide en dos subclases: la infusión de pequeñas moléculas dentro de la VLP ya formada y la encapsulación de materiales durante el auto-ensamblaje.

La infusión de pequeñas moléculas consiste en el mecanismo de “puertas reversibles”, que se abren y cierran gracias a modificaciones en el pH y en la fuerza iónica que modifican la estructura proteica de la cápside (164). En un ambiente ácido las VLP adquieren una conformación compacta, pero a medida que aumenta el pH ocurre una transición natural que conlleva a que las VLP se “hinchén” formando poros entre las proteínas de la cápside (**Figura 14**). Este estado permite la difusión de las moléculas pequeñas, al bajar el pH las partículas se contraen, por ende las moléculas quedan en su interior (166,167).

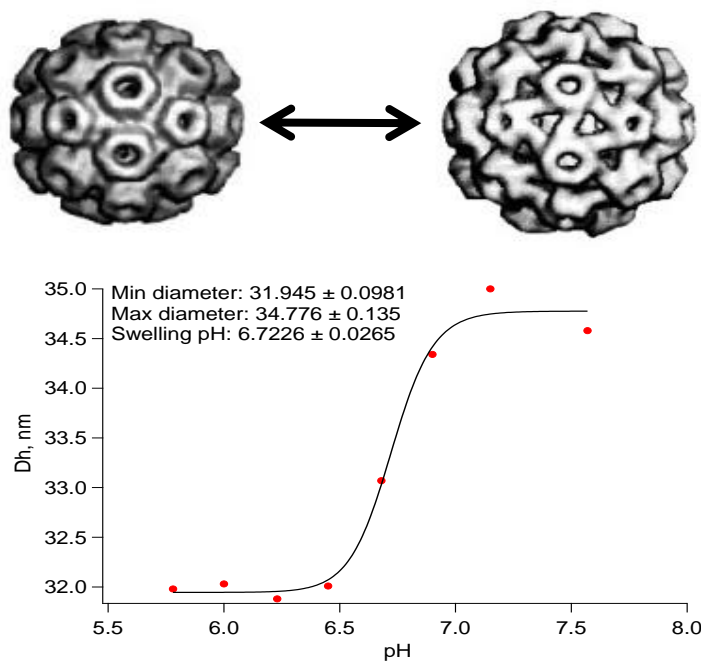


Figura 14. Ejemplo del fenómeno de hinchamiento. Modelización de BMV en su estado estable y cuando comienza a “hincharse” y grafico que demuestra la variación del diámetro de BMV a medida que ocurre este proceso. Se observa que el virus tiene como diámetro mínimo o en estado estable de aproximadamente 32 nm, mientras que logra un diámetro máximo de casi 35 nm. El pH al cual el virus comienza a “hincharse” es de 6,7. Modelado realizado por la Dra. Irina Tsvetkova.

En la encapsulación de materiales durante el auto-ensamblaje de la cápside, se coloca el material a encapsular, que pueden ser nanopartículas metálicas, junto con las proteínas de la cápside en las condiciones óptimas para que ocurra el ensamblaje. Por lo que, al formarse las VLP en presencia del material de interés, el material es el que va a ser encerrado dentro de las partículas (168-171). Existen dos principios básicos que permiten el auto-ensamblaje de VLP *in vitro* y la encapsulación de nanopartículas sintéticas: *OAS-templating* y *polymer-templating* (**Figura 15**) (82,172).

La tecnología de *OAS-templating* consiste en cubrir las nanopartículas con una molécula denominada origen de ensamblado (OAS sigla en inglés correspondiente a *Origin-Of-Assembly*), la cual inicia la unión de los monómeros promoviendo el auto-ensamblado como se observa en la **Figura 15 (a)** (172-175). Mientras que la metodología de *polymer-templating* consiste en cubrir la superficie de las nanopartículas con polímeros cargados negativamente que simulan la carga negativa del cargo natural, como se observa en la **Figura 15 (b)**. El polímero más utilizado fue el PEG, que gracias a su carboxilo terminal permite imitar al material genético de forma efectiva por tener carga negativa. Mientras que el carácter hidrofílico del PEG provee de un “molde” resistente a interacciones biomoleculares inespecíficas, evitando de este modo la adsorción de proteínas no específica en la superficie de la nanopartícula (176-180).

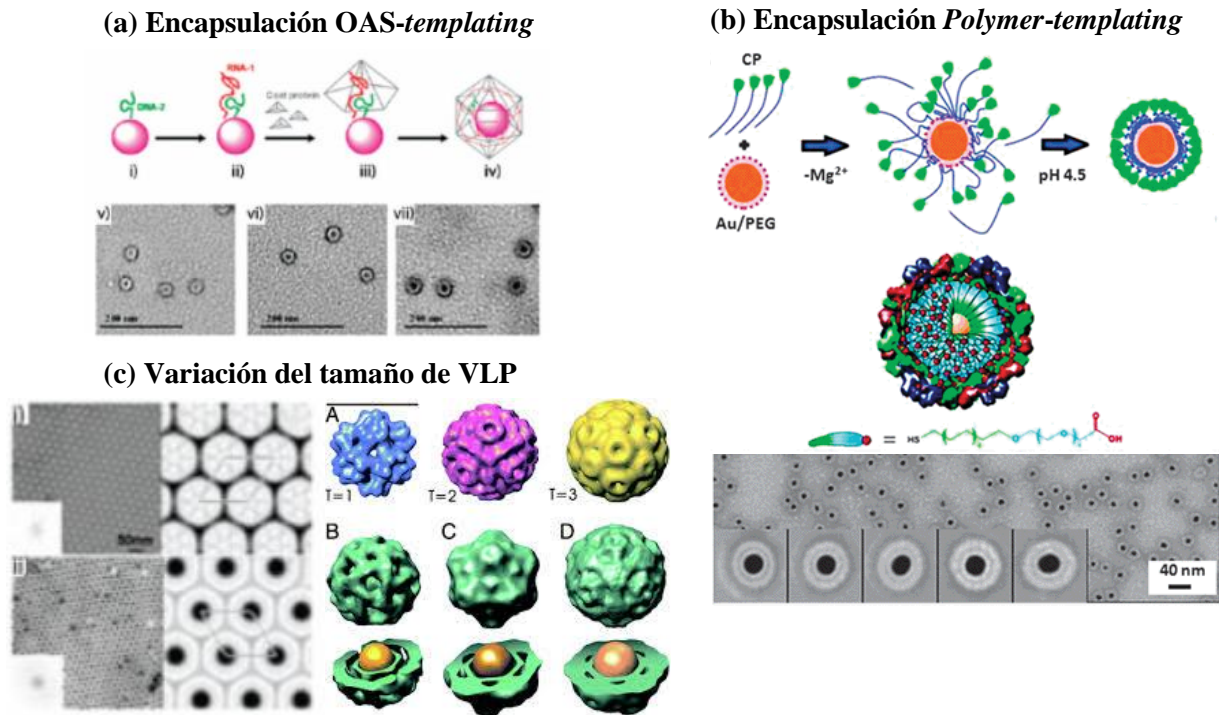


Figura 15. Técnicas de encapsulación de VLP y como afecta su tamaño. Se observan los pasos de encapsulación utilizando la técnica OAS-templating (A) y polymer-templating (B). Mientras que en C se muestra la dependencia que tiene el tamaño de la VLP según el tamaño de la nanopartícula utilizada y como a su vez se ve afectada su simetría. Modificado del artículo *The art of engineering viral nanoparticles* (82).

Para la encapsulación de nanopartículas metálicas se utiliza el procedimiento de *polymer-templating* descrito para BMV consiste en desensamblar el virus, mediante un *buffer* a pH 7,8 y fuerza iónica 1 M, que genera la separación de las proteínas de la cápside viral liberando el material genético del virus (**Figura 16 (1)**). Posteriormente se elimina el material genético, se agregan las nanopartículas funcionalizadas con PEG y se coloca en *buffer* a pH 7,5 y fuerza iónica 0,1 M (**Figura 16 (2)**), condiciones en la cual comienza el proceso de ensamblado alrededor de las nanopartículas. Para que las VLP terminen de ensamblarse, se utiliza un *buffer* pH 4,5 y fuerza iónica 0,1 M como se observa en la **Figura 16 (3)** (181). Por ende, las nanopartículas metálicas quedan en el interior de las VLP generando híbridos del tamaño de la cápside viral.

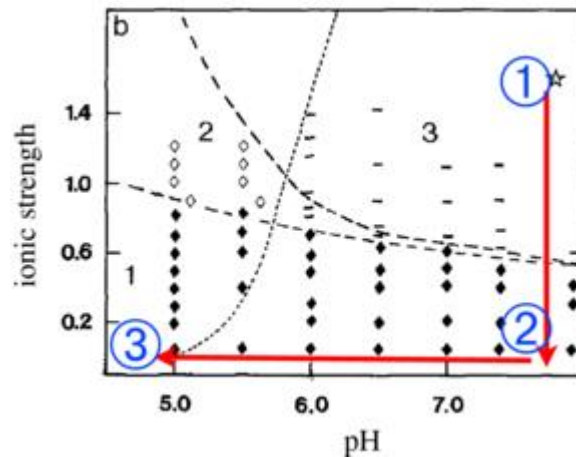


Figura 16. Mecanismo de síntesis de VLP de BMV a partir del desensamblado de la cápside viral. Se da en tres pasos: desensamblaje de la cápside viral (1), comienzo del auto-ensamblaje alrededor de las nanopartículas (2) y finalización del auto-ensamblaje de las VLP. Extraído del artículo *Impact of charge variation on the encapsulations of nanoparticles by virus coat proteins* (182).

Mientras que la encapsulación de VLP en nanopartículas de sílica consiste en el atrapamiento físico para capturar proteínas mediante uniones covalentes o no covalentes, donde se forma una “cáscara” de sílica por fuera de la VLP que la envuelve generando su encapsulación. Debido que se busca la inclusión de las proteínas dentro de una matriz tridimensional, es necesario formar las nanopartículas de sílica en presencia de las proteínas, lo que nos permite la formación de híbridos de mayor tamaño (183). La utilización de materiales nanoestructurados ha revolucionado la unión de proteínas debido al amplio rango de aplicaciones que presentan en el campo de la biomedicina (184,185). En la **Figura 17** se observa un esquema de como las nanopartículas de sílica envuelven a una o más VLP formando atrapándolas en su interior.

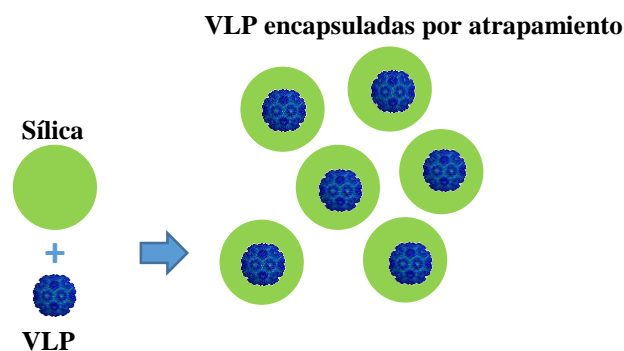


Figura 17. Esquema de encapsulación por atrapamiento. Se intenta mostrar como la síntesis de las nanopartículas en presencia de la VLP permite su atrapamiento dentro del mismo.

1.7 Unión de VLP en superficie

Otra estrategia para generar nanohíbridos es a través de la unión de proteínas a otro material, que puede ser a materiales inorgánicos o polímeros, permitiendo ser utilizada con distintos fines (186). Un material ideal debe ser inerte, estable y resistente, además de lograr evitar la contaminación microbiana y ser económica (183).

Al emplear estrategias de unión se puede producir un incremento de la estabilidad de la biomolécula unida. Esto se debe a que existe una estabilización conformacional de la proteína gracias a la presencia de uniones multipuntuales proteína-material de interés. El término de estabilidad refiere a la resistencia que posee la estructura proteica hacia factores adversos, como ser el calor y otros factores desnaturizantes. Por lo que se considera que una proteína es estable cuando preserva su integridad molecular a pesar de haber sido expuesta a un agente desnaturizante (163). Dependiendo de la estrategia de unión utilizada, se puede diferenciar entre reversible o irreversible, donde en el primer caso la proteína puede ser desorbida del soporte, permitiendo así liberar la proteína cuando sea necesario; mientras que en el segundo caso, la proteína está unida al soporte sin posibilidad de ser liberada (187). Sin embargo, la unión reversible no permite alcanzar grandes factores de estabilización (162,188).

En este trabajo se utilizaron dos métodos que permiten la unión de las VLP en la superficie de las nanopartículas de sílica biomimética, los mismos son explicados a continuación.

1.7.1 Adsorción iónica.

Resulta de las interacciones del tipo iónico o fuerza de atracción débiles, como ser puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals, de las proteínas con la superficie de las nanopartículas de sílica. Las proteínas adsorbidas están protegidas de agregación y proteólisis. Además de que las mismas no se ven modificadas a nivel conformacional, dado que se trata de un tipo de unión muy suave. A pesar de sus ventajas, la gran desventaja que presenta es su reversibilidad, ya que se puede provocar la desorción de la sílica con variaciones en el pH, temperatura y fuerza iónica (189,190). Dado que al aumentar la fuerza iónica los iones inorgánicos se unen con más afinidad a la sílica que la proteína, mientras que las modificaciones en el pH varía la naturaleza de las cargas en la superficie del material que se utilice y de la proteína haciendo que la misma se desorba (163). En la **Figura 18** se observa un esquema de cómo ocurre la unión por adsorción.

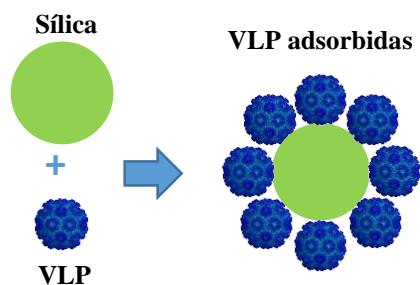


Figura 18. Esquema de la unión por adsorción iónica. Se muestra como quedan las VLP absorbidas a la superficie las nanopartículas de sílica.

1.7.2 Unión covalente

La técnica se basa en la formación de un enlace covalente entre las proteínas y la sílica, dicha asociación se produce debido a que los aminoácidos de la proteína reaccionan con grupos reactivos en las nanopartículas de sílica. Los materiales utilizados para la formación de nanohíbridos deben ser insolubles, siendo de origen natural, por ejemplo agarosa o dextrano; o soportes sintéticos, como ser derivados de poliácridamida o poliestireno. En la mayoría de los métodos es necesario incluir una etapa previa de activación del material, en este caso nanopartículas de sílica, utilizando un agente de unión que permita la unión covalente con la proteína, para que se mantengan las propiedades estructurales de la misma durante la unión, siendo esta última la característica más importante de esta técnica (186,191,192). En la **Figura 19** se observa un esquema de la unión donde se “activan” las nanopartículas de sílica al colocarle grupos funcionales que permitan la unión covalente con las VLP.

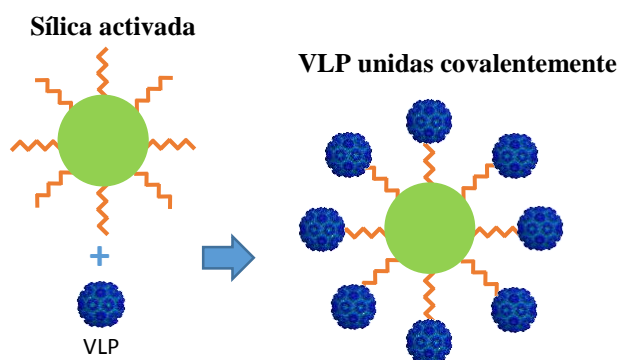


Figura 19. Esquema de la unión covalente. Se muestra como las VLP se unen a las nanopartículas de sílica previamente activado con un agente de unión.

Para la activación de las nanopartículas de sílica puede utilizarse el glutaraldehído, que es un compuesto químico de la familia de los aldehídos. Se trata de un compuesto estable sin riesgo de polimerización si se mantiene a concentraciones menores al 0,5%, dado que a concentraciones mayores se polimeriza. A nivel de toxicidad puede ocasionar sensibilización e irritación en piel o mucosas tras el contacto directo o la exposición a sus vapores. También es

irritante a los ojos, vías respiratorias y sensibilizante, por lo que debe ser empleado con cuidado. Se trata de un reactivo bifuncional muy versátil, el cual permite la unión de proteínas de forma covalente a través de su amino terminal en condiciones de pH neutro. El glutaraldehído es capaz de originar una malla irreversible e insoluble en agua, necesaria para la estabilización de las proteínas dado que le brinda mayor rigidez a la estructura proteica (163).

Las uniones pueden llevarse a cabo de dos formas: una utilizando nanopartículas de sílica previamente activadas, en donde el glutaraldehído actúa como agente de unión gracias a su solubilidad en solventes acuosos permitiendo que la unión se dé por intercambio iónico; y otra en donde las proteínas son absorbidas previamente a las nanopartículas de sílica mediante grupos aminos primarios, para posteriormente entrecruzar con glutaraldehído (193-198). La diferencia entre las dos estrategias mencionadas es que la modificación química de la proteína, usando sílica pre-activada, es mucho menor que cuando la enzima previamente unida es tratada con glutaraldehído (199). En condiciones de baja fuerza iónica, la unión de proteínas en nanopartículas de sílica activadas con glutaraldehído ocurre en primer lugar, mediante el intercambio iónico de la proteína con los grupos aminos de las nanopartículas de sílica, seguido por la reacción covalente que se da en menor tiempo comparada con la unión donde no se utiliza dicho agente (200). Ambos híbridos son más estables debido a que son capaces de resistir condiciones extremas de pH y temperatura (201,202).

La utilización de las estrategias descritas anteriormente permite obtener materiales híbridos de distintos tipos y tamaños para su posible utilización como *delivery* de drogas. Su ventaja radica en que permite que la droga sea distribuida a las células que se desean tratar, implicando una gran diferencia con la administración de drogas normal, donde las moléculas son distribuidas a todas las células sin preferencia alguna, a través de la circulación sanguínea. En cambio, al utilizar las nanopartículas modificadas como *carriers* de drogas conjugadas a biomoléculas tienen una variedad de ventajas. Primero, se pueden usar fuerzas externas, como ser imanes en el caso de híbridos con nanopartículas magnéticas, para concentrar los nanohíbridos inorgánicos/orgánicos en una región blanco y así aumentar la posibilidad de interacción con las células de interés. También las nanopartículas inorgánicas pueden ser modificadas para ajustar la adhesión de los nanohíbridos inorgánicos/orgánicos a la membrana celular (203). Por todo lo mencionado, en este trabajo se buscó la generación de híbridos utilizando nanomateriales como aproximación para su posterior utilización como sistemas de *delivery* de drogas.

2.1 Objetivo General

Generación de nanohíbridos utilizando VLP como futura herramienta para el *delivery* de drogas.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtener híbridos de VLP del virus BMV con nanopartículas inorgánicas.
- Analizar el fenómeno de “hinchamiento” en el virus BMV.
- Obtener híbridos de VLP de Norovirus en nanopartículas de sílica a través de distintas estrategias.
- Caracterizar los híbridos obtenidos utilizando las técnicas de DSF, TEM, DLS y Potencial zeta.
- Ensayar la citotoxicidad de los híbridos obtenidos en las líneas celulares NIH 3T3 y HaCaT por dos métodos de revelado distintos.

3.1 Materiales

Polietilenimina 50% (w/v) Mw 1300 (PEI), Glutaraldehído 25% (v/v), Ácido bicinconínico (BCA), Sulfato de cobre (II) y Sero-albúmina bovina 66 kDa (BSA), Polietilenglycol 300 (PEG3) y Polietilenglicol 400 (PEG4) de Sigma Aldrich®. Tetrametil ortosilicato (TMOS) para síntesis de MERCK. Columna de gel filtración PD-10 (Sephadex G-25) y la columna Superose 12 (10 x 300 mm) de General Electric Healthcare Life Sciences. Sypro Orange y Sypro Red soluciones stock de 5000X de Life Technologies. Marcador de peso molecular AccuRuler RGB Prestained Protein Ladder (10-180 kDa) proveniente de Maestrogen. Línea celular HaCaT de ATCC. La cepa C58C1 *Agrobacterium tumefaciens* proviene del laboratorio de Bogdan Dragnea del Departamento de Química, Universidad de Indiana. La línea celular NIH 3T3 proviene del Laboratorio de Genética Molecular y Humana del Institut Pasteur y fue brindada por el Dr. José Badano. Las muestras de VLP de Norovirus GII-4 y GII-12, fueron donadas por la Dra. Mabel Berois de la sección de Virología de la Facultad de Ciencias de Uruguay (204). Los demás materiales que se utilizaron fueron de grado analítico.

Los reactivos y equipos usados en la metodología del trabajo están nombrados a lo largo del ítem 3.2 Métodos. Por otro lado, la composición de medios y soluciones que se usaron se encuentran detalladas en el **Anexo 1**.

3.2 Métodos

3.2.1 Expresión de BMV en *Nicotiana benthamiana* y su posterior purificación

3.2.1.1 Infección de *Nicotiana benthamiana* con *Agrobacterium tumefaciens*

Se utilizan tres plásmidos conteniendo el material genético necesario para la expresión de la cápside de BMV, los cuales se transforman en la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación. Los cultivos conteniendo cada plásmido se crecen a partir de colonias aisladas a 30 °C en medio de crecimiento LB con kanamicina (50 µg/mL), 10 mM MES (pH 5,9) y 50 µM acetosiringona. Estos son centrifugados a 6000 rpm por 15 minutos y los *sedimentos* se resuspenden con el medio de infiltración para ser incubados a 25 °C por un mínimo de 3 a 5 horas. Cuando todos los cultivos bacterianos llegan a una densidad óptica a 600 nm (OD_{600nm}) de 0,5 se los mezcla, en las mismas proporciones (1:1:1), con medio de infiltración para obtener la misma concentración bacteriana en todas las muestras a infiltrar. Se utiliza una jeringa de 2 mL para tomar la solución y con la misma se va infiltrando lentamente las hojas de *Nicotiana benthamiana*, esto se realiza en tres zonas para cada hoja.

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* se crecen en una cámara de crecimiento con ciclos de temperatura de 26/22°C en el día/noche, respectivamente, y ciclos de 16 horas luz/8 horas oscuridad. Para cada experimento se utilizan plantas que tengan de 6 a 8 semanas de crecimiento para el momento de la infección y luego de la misma se dejan 4 días en la cámara de crecimiento vegetal (205).

3.2.1.2 Purificación del virus a partir de las hojas de *Nicotiana benthamiana*

Luego de 5 o 6 días post-infiltración se realiza la cosecha de las hojas de todas las plantas, las cuales se almacenan a -80 °C hasta la purificación del virus. Se trituran manualmente las hojas y se pesa la cantidad de material, teniendo en cuenta que por cada gramo de hoja se añade 2 o 3 veces más de virus *buffer*. Para todos los pasos que se mencionan a continuación las hojas deben permanecer siempre en hielo.

Se realiza un licuado de hojas con el *buffer* virus en una licuadora y luego la mezcla se filtra con una tela de malla en un recipiente en hielo. Lo filtrado se centrifuga a 5000 rpm durante 25 minutos a 4 °C. Se toman 25 mL de sobrenadante con virus, colocándose sobre un colchón de 5 mL de sacarosa 10%. Se centrifuga a 26000 rpm con rotor 32Ti en la ultracentrifuga Optima XPN de Beckman Coulter durante 3 horas a 4 °C. Esto se realiza con todo el sobrenadante con virus que se obtuvo de la centrifugación posterior a la filtración.

Habiendo terminado con las centrifugaciones, se agregan 500 µL de CsCl al 40% a cada tubo de centrifuga con sedimento y este último se resuspende. Los tubos se sellan con *parafilm* y se dejan en agitación durante la noche a 4 °C. Pasadas 16 horas, se junta todo el líquido de los tubos y se centrifuga a 10000 rpm con rotor 32Ti durante 10 minutos. Con una jeringa se toma todo el sobrenadante y se centrifuga a 52000 rpm con rotor 100Ti durante 30 horas a 4°C.

Una vez que termina la centrifugación, se colecta la banda del virus con una jeringa y con ayuda de una aguja que pincha el tubo por el extremo superior para dejar salir el aire. La banda que corresponde al virus es fina y blanca, ubicada en la parte inferior del tubo. El virus obtenido se dializa contra *buffer* SAMA, cambiando el *buffer* tres veces en 24 horas. Por último, se mide la concentración del virus usando *Nanodrop* a una absorbancia de 280nm con un coeficiente de extinción de 51,5 L/g.cm.

3.2.1.3 Purificación del virus por HPLC

Se utiliza una columna Superose 12 (10 x 300 mm) de GE Healthcare Life Sciences con *buffer* SAMA como fase móvil. La muestra se analiza a 0,5 mL/minuto y se recolectan fracciones de

1,5 mL de manera automática. En estas condiciones el volumen de elución de la muestra fue de 12 mL. Terminada la corrida se seleccionan algunas muestras a medir concentración de proteínas y determinar si contienen virus usando *Nanodrop* a una absorbancia de 280 nm y coeficiente de extinción 51,5 L/g.cm. Por último, las muestras se almacenan a 4 °C o a -80 °C.

3.2.2 Síntesis de nanopartículas inorgánicas

3.2.2.1 Síntesis de GNP 12 nm

Se agrega 1 mL de $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 79 mL de agua, mientras que por otro lado se mezclan 4 mL de citrato de sodio 1 % v/v con 45 μL de ácido tánico 1 % v/v y 45 μL de K_2CO_3 2,5 mM en 16 mL de agua. Estas dos soluciones se mezclan muy rápidamente y se calientan con agitación a 60 °C. Durante esta etapa se espera observar cambios en la coloración de la solución, desde azul oscuro-gris a violeta hasta llegar a un rojo anaranjado en unos pocos minutos. Cuando se obtiene un color rojo-anaranjado se calienta la mezcla por otros 10 minutos más y luego se deja reposar a 25 °C (206).

3.2.2.2 Síntesis de GNP 3-5 nm

Se prepara una solución $2,5 \times 10^{-4}$ M de $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $2,5 \times 10^{-4}$ M de citrato de sodio en 20 mL de agua y se deja agitando por 5 minutos a 25 °C. Por otro lado, se prepara la solución 0,1 M NaBH_4 , se enfría a 4 °C y se toman 0,6 mL para agregar a la primera solución realizada. Se debe observar un cambio de color inmediato a rosa luego de añadir el NaBH_4 . Por último, se deja agitando la solución por unos minutos hasta no ver más cambio de color (207).

3.2.2.3 Síntesis de SNP 3-5 nm

Se disuelven 0,75 g de dodecilamina en 25 mL de ciclohexano, luego se agregan 6 mL de formaldehído acuoso 37 % y se agita la solución vigorosamente durante 10 minutos a 25 °C. Se separa la fase de ciclohexano y se lava dos veces con agua. Se prepara una solución de AgNO_3 pesando 0,2 g de dicho reactivo y disolviéndolo en 10 mL de agua, esto se agrega a la solución de ciclohexano previamente separada bajo fuerte agitación. Se debe observar un cambio de color de la fase orgánica a rojo rubí luego de mantener la agitación por 40 minutos a 25 °C. Se separa la fase acuosa donde se encuentran las SNP (208).

3.2.2.4 Síntesis de SNP 17 nm

Se agregan 2,5 mL de 10^{-2} M AgNO_3 a 75 mL de agua y luego se añaden 5 mL de 10^{-2} M de ácido mercaptoacético mientras se agita la solución. Luego de 10 minutos de agitación se agrega lentamente 2,5 mL de 10^{-2} M KI y pasados unos minutos se agregan 20 mg de NaBH_4 a la solución, donde se deja agitando al menos 20 minutos para obtener las SNP. Durante el proceso de síntesis se debe observar una serie de cambios en la coloración de la solución comenzando en verde-amarillo a nuez-marrón, luego marrón y finalmente naranja (209).

3.2.2.5 Determinación de la concentración de nanopartículas

Se determina la concentración de nanopartículas a través de medidas de absorbancia por espectrofotometría UV-Vis. Para las muestras de GNP se usa la absorbancia medida a 400 nm y para poder determinar la concentración de nanopartículas se utiliza la Ley de Lambert-Beer ($l=1$ cm, $\epsilon_{400\text{nm Oro}}=11,2$ cm²/mg). En cambio, para poder determinar la concentración de SNP se usa la absorbancia medida a 320 nm ($l=1$ cm, $\epsilon_{320\text{nm Plata}}=7,3$ cm²/mg).

3.2.3 Formación de híbridos de VLP de BMV

3.2.3.1 Funcionalización de nanopartículas inorgánicas con el ligando

Para las GNP se utiliza como ligando PEG4, mientras que para las SNP se utiliza PEG3 y PEG4. El ligando es colocado en un exceso del 5% para asegurar que cada partícula quede cubierta en su totalidad por el mismo. Para ello, es necesario calcular la cantidad de ligando que se puede pegar por área de cada nanopartícula y luego se procede a calcular el exceso. Posteriormente, se le agrega el volumen adecuado de ligando a la solución de nanopartículas en agitación suave y se deja por 24 horas a 25 °C. Pasado este tiempo, se centrifugan las nanopartículas funcionalizadas para quitar el exceso de ligando. La solución se centrifuga a 20000 rpm durante 40 minutos a 5 °C. Al terminar la centrifugación, se procede a descartar el sobrenadante y a conservar el *sedimento*. Las nanopartículas centrifugadas se lavan por centrifugación con H₂O milliQ.

3.2.3.2 Purificación de proteínas del virus BMV

Se dializa la solución de virus purificada por HPLC contra el *buffer* de desensamblaje por 1 o 2 días hasta que se observe un precipitado blanco dentro de la membrana de diálisis, el cual corresponde a ARN viral. Luego se centrifuga la muestra dializada a 40000 rpm durante 45 minutos a 5 °C y se toma el sobrenadante con cuidado de no tocar el *sedimento*, que corresponde

al ARN viral. Se determina la concentración de la muestra usando *Nanodrop* a 280 nm y un coeficiente de extinción molar de 8,24 L/g.cm.

Para poder eliminar el calcio presente en la muestra de proteínas se dializa dicha muestra contra el *buffer* Tris 0,01 M pH 7 y se incuba toda la noche. Al otro día se debe cambiar el *buffer* por el *buffer* TKM y se incuba por 24 horas. Por último, se determina la concentración de proteínas virales al igual que como se mencionó anteriormente y se procede a guardar la muestra a 4 °C.

3.2.3.3 Encapsulación de nanopartículas inorgánicas con ligando por las proteínas de la cápside viral

A partir de la concentración de las proteínas virales se procede a calcular el volumen a tomar para tener 0.5 mg/mL de concentración en 100 µL de volumen final de reacción. En el caso de las GNP la relación cápside – nanopartículas funcionalizadas es 1:1 por lo que a partir de la concentración de partículas por mililitro se procede a calcular el volumen de nanopartículas a tomar. En el caso de las SNP se realiza la relación 1:1, 1:5 y 1:20. Se mezcla en un tubo *ependorff* los volúmenes calculados de proteínas y nanopartículas, completando con *buffer* TKM hasta llegar al volumen final de 100 µL. Posteriormente, se procede a colocar la mezcla en una membrana de diálisis con un corte de 12K-14K nm, que fue previamente lavada con agua milliQ. La mezcla se dializa contra *buffer* TNKM durante 24 horas a 4 °C con agitación suave. Pasado este tiempo, se descarta el *buffer* con cuidado de no perder la membrana y se agrega *buffer* SAMA dejándolo 24 horas a 4 °C con agitación suave. Por ultimo, las VLP se guardan a 4 °C.

3.2.4 Caracterización por microscopia de las nanopartículas

3.2.4.1 Captura de imágenes en TEM

La preparación de las muestras, de híbridos de VLP de BMV, a ser observadas en el microscopio consiste en tomar un trozo de *parafilm* donde colocan unas pequeñas gradillas de carbón y se agrega una gota de la muestra de interés sobre cada una de las gradillas. Solamente en el caso de las VLP, se va a teñir la muestra con acetato de uranilo, del cual se le agrega una gota una vez que la muestra se haya secado sobre la grilla.

Mientras que en el caso de las muestras de nanopartículas y de los híbridos de VLP de Norovirus, fueron preparadas y analizadas por la Dra. Raluca Fratila en la Universidad de Zaragoza, España.

Las imágenes de TEM resultantes en ambos casos fueron analizadas utilizando el programa ImageJ para la obtención de los diámetros de las muestras analizadas.

3.2.4.2 Medidas del diámetro de nanopartículas

A partir de las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico se utiliza el programa ImageJ para realizar el análisis de las mismas. Para obtener el diámetro de las nanopartículas y de las VLP una vez formadas se pueden usar dos técnicas, la primera consiste en medir de forma manual el diámetro de cada partícula por muestra, mientras que la segunda consiste en utilizar la función *threshold* que da datos de área, de la cual debemos calcular el diámetro por separado. Una vez que tenemos un número de valores significativo para cada muestra analizada se utiliza el programa IGOR Pro para el análisis de esos valores, el programa brinda un histograma dando el diámetro promedio de la muestra (**Anexo 2**).

3.2.4.3 Análisis estadístico

Se utiliza la prueba *t* de Student de dos muestras como análisis estadístico para dos muestras desapareadas, la cual sirve para comparar las respuestas de dos grupos diferentes de muestras. Las suposiciones que se hacen son que cada grupo es considerado una población diferente, que las respuestas en cada grupo son independientes de aquellas en el otro grupo y que la distribución de las variables de interés es normal. Para realizar el test se van a plantear dos hipótesis, una nula y otra alternativa, a ser evaluadas con los datos. La hipótesis nula establece que la diferencia entre los dos grupos de datos es 0, en cambio, la alternativa plantea que existe una diferencia entre las medias observadas. Una vez que se plantean las hipótesis se procede a calcular la estadística-t, esta se realizó a través del *software* GraphPad que permite ingresar los datos y seleccionar la prueba *t* que queremos. En este caso se elige la prueba *t* para dos muestras desapareadas con diferentes varianzas, la cual es conocida como prueba *t* de Welch. A partir de esto, el *software* brinda como resultado una variedad de datos calculados, como por ejemplo el valor *p* y qué hipótesis es la que describe a ambas muestras. El valor *p* está definido como la probabilidad de obtener un resultado al menos tan extremo como el que realmente se ha obtenido (valor del estadístico calculado), suponiendo que la hipótesis nula es cierta. Se rechaza la hipótesis nula si el valor *p* asociado al resultado observado es igual o menor que el nivel de significación establecido, convencionalmente 0,05 ó 0,01. Teniendo en cuenta un intervalo de confianza del 95%, el límite establecido del valor *p* será de 0,05.

3.2.5 Estudio del proceso de desensamblado del virus BMV

3.2.5.1 Preparación de muestras y toma de medidas.

Se analiza el cambio conformacional de la cápside viral, denominado “hinchamiento”, durante el proceso de desensamblado a través de cambios en el pH. Para ello se procede a utilizar un fluorímetro y dos fluorocromos *Sypro Red* (SR) y *Sypro Orange* (SO). Se trabaja a una concentración final de 1X del fluorocromo, siendo la concentración inicial de 5000X indicada por el fabricante, y se analiza a valores de pH de 4 a 7,4.

Un total de cinco muestras son las que se preparan para medir en el fluorímetro por cada pH analizado en un volumen final de 50 μ L, las cuales son:

- 1- *Buffer*
- 2- *Buffer* + DMSO 10%
- 3- *Buffer* + DMSO 10% + 2 μ L BMV (2 mg/mL)
- 4- *Buffer* + DMSO 10% + Fluorocromo 1X
- 5- *Buffer* + DMSO 10% + 2 μ L BMV (2 mg/mL) + Fluorocromo 1X

La preparación de los *buffers* a diferentes pH está detallada en el **Anexo 1**.

Las medidas se realizan a una longitud de onda de absorbanza/emisión de 470/570 nm y 550/630 nm para el SO y SR, respectivamente.

3.2.5.2 Análisis de curvas en el fluorímetro

Se realizan gráficos de unidad de fluorescencia relativa (RFU, por su nombre en inglés *Relative Fluorescence Units*) en función de la longitud de onda (nm) para cada pH estudiado a través del programa IGOR Pro.

3.2.6 Concentración de muestras de VLP de Norovirus

Para neutralizar la membrana del concentrador se agregan 450 μ L de PVP al 2 % (P/V) al concentrador para que cubra toda la membrana y se centrifuga a 1350 rpm. Luego, se agregan 450 μ L de agua destilada y se vuelve a centrifugar a 1350 rpm para limpiar la membrana. Esta queda pronta para su posterior utilización.

Se utilizan concentradores con un corte de membrana de 100 kDa, uno para cada cepa de Norovirus. Primero, se agregan 100 μ L de agua destilada para embeber la membrana, se deja unos minutos y posteriormente se centrifuga a 13500 rpm durante 3 minutos. Este proceso se repite una vez más dado que en la primera centrifugación solo pasa la mitad de la muestra de agua. Posteriormente, se agregan 100 μ L de la muestra soluble de VLP y se procede a centrifugar una vez a 13500 rpm por 3 minutos, obteniendo un volumen final de 50 μ L. Se guardan 5 μ L de cada cepa para correr un gel de poliacrilamida, y a los 45 μ L restantes se le agregan 45 μ L de PBS, se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones descritas anteriormente, obteniendo un volumen final de 45 μ L. Nuevamente, se guardan 5 μ L de cada cepa y los 40 μ L restantes se sacan cuidadosamente del concentrador para ser guardados en tubos *eppendorff* a 4 °C.

3.2.7 Análisis de proteínas por SDS-PAGE

La preparación de los geles de poliacrilamida se encuentra detallada en el **Anexo I** (210).

Para la determinación de la pureza de las muestras iniciales se utiliza un gel Bolt 4-12 % Bid-Tris Plus proveniente de Novex. Las muestras a sembrar se preparan mezclando 5 μ L de la misma con 11,75 μ L de *buffer* de carga y 0,7 μ L del agente reductor, una vez mezcladas se calientan a 100 °C por 5 minutos. Pasado este tiempo, se siembran 20 μ L de cada muestra en cada pocillo y el marcador de peso molecular AccuRuler RGB prestained protein ladder de Maestrogen, el gel se deja correr por 40 minutos a 140 V. Posteriormente se procede a realizar la tinción del gel.

Para identificar si las muestras fueron concentradas y posteriormente unidas a las nanopartículas de sílica se utilizan los geles al 15%. Las muestras de los híbridos generados se preparan pesando 50 mg, agregando 75 μ L de *buffer* de carga 1X, se calienta a 100 °C por 5 minutos y se toma el sobrenadante para sembrar. En el caso de las muestras de sobrenadantes al realizar las uniones se toman 30 μ L y se las mezcla con 10 μ L de *buffer* de carga 1X, se calientan a 100 °C por 5 minutos y se siembran. Una vez que todas las muestras fueron sembradas se procede a correr el gel a 110 V hasta que pasa el gel concentrador y posteriormente se aumenta a 120 V. Se deja correr por una hora y luego se lleva a cabo la tinción del gel.

Para la tinción, se sumerge el gel en azul de *Coomassie Brilliant Blue* y se lo deja con agitación suave por 16 horas a 25 °C. Al día siguiente se retira el gel de la solución de *Coomassie* y se procede a lavar el excedente del colorante utilizando agua destilada. Una vez que el excedente es retirado se procede a observar los resultados obtenidos. El mismo se lleva a cabo utilizando los protocolos de Kang *et al.* (2002) (211) y Neuhoff *et al* (1988) (212).

Para la tinción con solución de nitrato de plata, se sumerge el gel en la solución de lavado I en un volumen suficiente para que quede cubierto y se deja agitando por una hora. Se descarta la solución de lavado I y se sumerge el gel, en un volumen similar, de la solución de lavado II agitando suavemente por 15 minutos. Este paso se repite una vez más y al descartarse la

solución de lavado II, se realizan dos lavados de 15 minutos cada uno sumergiendo el gel en la solución reductora. Posteriormente, se realizan dos lavados de 15 minutos cada uno utilizando la solución de nitrato de plata, al terminar dichos lavados se enjuaga con agua destilada dos veces y se descarta. Se cubre completamente el gel con solución reveladora y se agita suavemente hasta que se visualicen las diferentes bandas. Inmediatamente se detiene la reacción agregando ácido acético, se enjuaga con dicha solución para eliminar todo rastro de solución reveladora y se agita suavemente por 30 minutos. La preparación de las soluciones es detallada en el **Anexo I** (210).

3.2.8 Estrategia de cambio de pH de las muestras utilizando gel filtración.

El cambio de pH se lleva a cabo utilizando el método de cromatografía de exclusión molecular, en una columna PD-10 (*Sephadex G-25*) en *buffer* fosfato de sodio 0,1 M a pH 8. Para ello se utiliza el protocolo sugerido por el proveedor en el que se aplica 1 mL de la muestra, se separa con 1,5 mL de *buffer* y se recolecta en 2 mL. Al terminar de recoger los 2 mL de la muestra con el *buffer* deseado y diluida al medio, se procede a limpiar la columna con 5 mL de *buffer*, recolectando el eluido para evaluar la posible pérdida de parte de la muestra.

3.2.9 Nanopartículas de sílica

3.2.9.1 Síntesis de nanopartículas de sílica con núcleo de BSA

Se procede a preparar una solución de BSA de 1 mg/mL de concentración final en *buffer* fosfato de sodio 0,1 M pH 8. A dicha solución se le agrega 2,5 mL de PEI al 10 % (P/V) en *buffer* fosfato de sodio 0,1 M pH 8. Por otra parte se prepara una solución mezclando 462 μ L de TMOS en 3 mL de HCl 1 mM, la cual se agrega a la primera y se coloca en agitación suave a 25 °C por 20 minutos para que la síntesis de nanopartículas sea uniforme. La muestra se centrifuga 5 minutos a 3500 rpm para coleccionar las nanopartículas sintetizadas. Se realizan tres lavados, el primero con 10 mL de cloruro de sodio 0,5 M y los dos que le siguen con 10 mL de *buffer* fosfato de sodio 0,1 M pH 8. Luego de quitar el sobrenadante del segundo lavado se agrega 10 mL de *buffer* fosfato de sodio 0,1 M pH 8 y se procede a guardarlo a 4 °C.

3.2.9.2 Activación de las nanopartículas de sílica con Glutaraldehído

Se le agregan 400 μ L de Glutaraldehído 2% a 0,2 gramos de sílica en *buffer* fosfato de sodio 200 mM pH 7. La mezcla se deja en agitación suave durante 16 horas a 25 °C. Luego, se centrifuga por un minuto a 1350 rpm, se descarta el sobrenadante, se proceden a realizar dos lavados agregando 400 μ L de *buffer* fosfato de sodio 25 mM pH 5, resuspendiendo y volviendo a centrifugar, y se deja el sílica pronto para la posterior unión.

3.2.9.3 Determinación de la relación mg seco/ mg húmedo para las nanopartículas de sílica.

Se procede a centrifugar a 13500 rpm por 3 minutos las nanopartículas de sílica con el fin de extraer la mayor cantidad de *buffer* posible y se descarta el sobrenadante. Se pesan 2 g de nanopartículas de sílica. Se dejan secar las nanopartículas de sílica en la estufa a 60 °C y cada 24 horas se pesa el tubo para observar como varía el peso a medida que va secando, hasta que no se observe variación en el peso.

3.2.10 Estrategias de unión de nanopartículas de sílica a VLP de Norovirus

3.2.10.1 Unión covalente en nanopartículas de sílica con Glutaraldehído

Se procede a tomar 0,2 gramos de sílica húmeda activada con glutaraldehído y se agregan 400 µL de *buffer* fosfato de sodio 25 mM pH 5 y 100 µL de la proteína a unir, cuya concentración es determinada previamente a la unión. Se incuba en agitación suave por una hora a 25 °C, posteriormente se centrifuga por un minuto a 1350 rpm. Se retira el sobrenadante y se almacena para evaluar por SDS-PAGE si hay VLP en el mismo. Luego se procede a realizar tres lavados con *buffer* fosfato de sodio 25 mM pH 5, agregando 500 µL del mismo, resuspendiendo y centrifugando por un minuto a 1350 rpm. Al realizar el último lavado se descarta el sobrenadante y se guarda a 4 °C.

3.2.10.2 Unión por atrapamiento en nanopartículas de sílica

Para realizar la unión por atrapamiento es necesario sintetizar las nanopartículas de sílica en la suspensión de las nanopartículas de VLP, permitiendo la formación de las nanopartículas de sílica alrededor de las VLP. Para ello se procede a mezclar 500 µL de muestra, cuya concentración se determina previamente a llevarse a cabo la unión, con 125 µL de PEI al 10 % (P/V) en *buffer* fosfato de sodio 0,1 M pH 8. Por separado se realiza una mezcla de 77 µL de TMOS con 500 µL de ácido clorhídrico 1 mM, se mezcla hasta que quede una solución transparente y se toman 125 µL de la misma para agregar a la mezcla de muestra con PEI. El tubo *ependorff* con la mezcla se invierte suavemente para homogeneizar la muestra logrando una formación de nanopartículas de sílica más uniforme. Se deja en agitación suave por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifuga la solución durante un minuto a 13500 rpm para separar el sílica. El sobrenadante se conserva para evaluar por SDS-PAGE la presencia de muestra en el mismo. Posteriormente, se procede a realizar un lavado agregándole 500 µL de *buffer* fosfato de sodio 25 mM pH 5, se resuspende y se vuelve a centrifugar en las mismas. Este paso se repite tres veces, en el último lavado se descarta el sobrenadante y se procede a guardar el híbrido a 4 °C.

3.2.10.3 Unión por adsorción en nanopartículas de sílica

Para la unión utilizando la técnica de adsorción se pesan 0,2 g de nanopartículas de sílica húmeda y se agregan 400 μL de *buffer* fosfato de sodio 25 mM pH 5 y 100 μL de la proteína a unir. Se deja incubando por una hora a 25 °C con agitación suave y pasado este tiempo se centrifuga un minuto a 10000 rpm para decantar el híbrido. El sobrenadante se retira y se guarda a 4 °C. Se realiza un lavado agregando 500 μL de *buffer* fosfato de sodio 25 mM pH 5, resuspendiendo y volviendo a centrifugar en las mismas condiciones, el sobrenadante se descarta y se guarda el híbrido a 4 °C.

3.2.10.4 Entrecruzamiento del híbrido por adsorción con Glutaraldehído

Se toman 0,2 g de híbrido por adsorción y se le agregan 800 μL de Glutaraldehído al 2 % (v/v), se homogeniza bien y se incuba durante una hora a 25 °C con agitación suave. Transcurrido este tiempo se procede a centrifugar por 30 segundos a 10000 rpm para que decante el híbrido y descartar el sobrenadante. Se procede a realizar tres lavados agregando 400 μL de *buffer* fosfato de sodio 25 mM pH 5, resuspendiendo y centrifugando en las mismas condiciones establecidas previamente. Al realizar el último lavado se descarta el sobrenadante y se deja el *sedimento* 16 horas a 25 °C. Posteriormente se guarda a 4 °C.

3.2.10.5 Capacidad de carga de las nanopartículas de sílica

Se procede a preparar los híbridos por adsorción y por unión covalente a partir de 0,2 g de nanopartículas de sílica húmeda, no activadas y activadas, respectivamente, según se detalló en puntos anteriores. La concentración de VLP se determina previamente al ensayo. Se retiran muestras de sobrenadante a los 15, 30, 60 y 120 minutos de la reacción. Dichas muestras se preparan para su determinación proteica por el método de BCA, para calcular el porcentaje de unión a partir de la proteína medida en el sobrenadante.

3.2.11 DSF

3.2.11.1 Concentración de saturación de las nanopartículas de sílica con SO

Para determinar la concentración de saturación se procede a preparar soluciones de SO de diferentes concentraciones: 25X, 50X, 100X y 250X, a partir de una concentración inicial de 5000X. Se pesan 20 mg de las nanopartículas de sílica húmeda, se le agregan 250 μL de *buffer* fosfato de sodio 25 mM pH 5 y se homogeniza bien la solución. Se toman 25 μL de las nanopartículas de sílica en suspensión a las cuales se le agregan 2,5 μL de SO. Se realiza un blanco colocando 2,5 μL de *buffer* fosfato de sodio 25 mM pH 5 con 25 μL de las nanopartículas de sílica en suspensión. Todas las muestras son preparadas por duplicado. Las muestras en el Rotorgene son analizadas bajo las siguientes condiciones experimentales: la temperatura varía

de 25 °C a 95 °C aumentando 1 °C cada un minuto y se mide fluorescencia para cada condición. Debido a que se utiliza SO el espectro de absorción es en los 470 nm y el espectro de emisión es en los 570 nm.

3.2.11.2 Determinación de la estabilidad de los híbridos

Para ensayar la estabilidad se realizan ensayos de fluorimetría diferencial de barrido en las mismas condiciones en las que se realiza la determinación de la concentración de saturación de las nanopartículas de sílica. Todas las muestras se preparan para que tengan una concentración proteica final de 32 ng. En la **Tabla 1** se observa la preparación de muestras para Norovirus GII-12. Se mezclan 8,75 µL de muestra de los híbridos con 1,25 µL de SO 50X. Cada experimento se realiza por duplicado en la misma corrida y se repite tres veces.

Tabla 1. Preparación de las muestras para realizar la estabilidad de los híbridos para Norovirus GII-12.

Nombre del Híbrido	Masa de Híbrido (mg)	Volumen del <i>buffer</i> fosfato de sodio 25 mM pH 5 (µL)
Adsorción	50	100
Entrecruzado con Glutaraldehído	24	100
Unión covalente	18	62
Sílica sola	50	100

3.2.12 DLS y potencial zeta de los híbridos

Ambos experimentos fueron solicitados como un servicio al Polo Tecnológico de Pando, a cargo de la Dra. Helena Pardo. Las muestras se analizaron a 25 °C en agua destilada a pH 7 durante 60 segundos.

3.2.13 Ensayo de citotoxicidad

3.2.13.1 Mantenimiento y preparación de los sustratos celulares

Para el ensayo de citotoxicidad se utilizan dos líneas celulares: NIH 3T3, que son fibroblastos embrionarios murinos y HaCaT, que son queratinocitos humanos. Ambas líneas fueron cultivadas en DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de solución *stock* de Penicilina-Estreptomicina, a 37 °C con atmósfera de 5% de CO₂. Se monitorean regularmente bajo microscopio invertido (Unico IV951T). Dado que dichas líneas celulares son adherentes, es necesario separar las células del sustrato por medios enzimáticos. Para ello se realiza la tripsinización de las mismas, donde en primer lugar se retira y descarta el medio de cultivo. Posteriormente se hace un lavado con 3 mL de PBS a la botella T-75 cm² y se le agrega una solución de tripsina-EDTA, compuesta por tripsina 0,05 % (P/V) y Na₂EDTA 0,02 % (P/V) en

PBS, respetando la relación de 20 μL de solución tripsina-EDTA por cada cm^2 de superficie. Se tapa la botella y se incuba a 37 °C durante aproximadamente 5 minutos. Pasado este tiempo se observaron las células al microscopio, si las mismas presentan bordes redondeados y se encuentran dispersas se procede a agregar el mismo volumen de medio completo. Se homogeneiza la suspensión celular, pipeteando suavemente varias veces hasta que se disgregan totalmente las células. Se toma una alícuota de 50 μL para realizar el recuento celular.

Para la línea celular HaCaT se agregan 10 mL de PBS a la botella T-75 cm^2 para lavar y 2,5 mL de tripsina incubando 10 minutos. Luego se neutraliza con 2,5 mL de medio como mínimo de acuerdo a lo especificado por el proveedor. El recuento celular se detalla en el **Anexo 3**.

Se retira el medio de una botella T-75 cm^2 en fase de crecimiento exponencial, y se hace un lavado con 3 mL de PBS. Posteriormente, se lleva a cabo la tripsinización como se detalla en el punto anterior, teniendo en cuenta una buena homogenización para obtener una suspensión monodispersa. Luego, se realiza un recuento celular y se ajusta la concentración celular para tener 4×10^5 células/mL en medio de cultivo completo. Una vez pronto el ajuste de concentración, se continúa con el sembrado de una placa de 96 pocillos, con el cuidado de resuspender bien para obtener en cada pocillo 4×10^4 células aproximadamente. En cada pocillo se siembran 100 μL de la suspensión celular según el diseño de placa establecido en la **Figura 20**. Posteriormente se agrega 100 μL de medio completo en los pocillos de los bordes, se incuba a 37 °C con atmósfera de 5% CO_2 durante 24 horas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio
B	medio	células	células	células	células	células	células	células	células	medio	medio	medio
C	medio	células	células	células	células	células	células	células	células	medio	medio	medio
D	medio	células	células	células	células	células	células	células	células	medio	medio	medio
E	medio	células	células	células	células	células	medio	células	células	medio	células	medio
F	medio	células	células	células	células	células	medio	células	células	medio	células	medio
G	medio	células	células	células	células	células	medio	células	células	medio	células	medio
H	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio

Figura 20. Esquema de siembra de las células.

3.2.13.2 Preparación de las muestras

Se centrifuga a 13500 rpm por 5 minutos los híbridos a ser evaluados, los mismos son: unión covalente, adsorción iónica con entrecruzamiento y atrapamiento. Se pesa 0,1 g de muestra y se resuspende en 1000 μL de *buffer* fosfato de sodio 25 mM pH 5, para obtener una concentración de 100 mg/mL. Luego, se toman 30 μL de muestra y se colocan en 2,970 mL de medio de cultivo completo e inmediatamente se realizan las diluciones correspondientes. Las mismas son diluciones seriadas al medio, de los híbridos en medio de cultivo completo a partir

de la dilución 1/100, anteriormente mencionada. Una vez que se tienen preparadas las diluciones se preparan los controles:

- Control de interferencia (**Ci**): es medio de cultivo con la dilución 1/100 (11B-11D) y 1/200 (7E-7G), por separado en pocillos sin células, con el fin de determinar si el híbrido junto con el medio generan interferencia que pudiera afectar los resultados.
- Control de medio (**Cm**): medio de cultivo en pocillos sin células, para determinar si los ensayos de revelado interfieren con el medio haciendo que el mismo presente absorbancia a pesar de carecer de células.
- Control de células (**Cc**): medio de cultivo y va en pocillos con células, permite observar el 100% de viabilidad, para comparar con la viabilidad de las células expuestas a los híbridos. Además, de como control de que se esta trabajando adecuadamente, dado que si el control de células muere significa que se procedió mal.
- Control de muerte (**Cm**): dilución de Tritón X-100 al 0,5 % en medio de cultivo, en pocillos con células, cuya finalidad es observar como se observan las células muertas mediante los ensayos de revelado seleccionados.

Posteriormente se monitorea el estado de las células bajo el microscopio, se retira el medio de cultivo de los pocillos de la placa y se agregan 100 µL de las diluciones de los híbridos y los controles en los pocillos correspondientes de acuerdo al diseño de placa establecido en la **Figura 21**. Se incuba durante 4 horas a 37 °C y CO₂ al 5 %.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio
B	medio	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	Cc	Cc	Cm	Ci	medio
C	medio	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	Cc	Cc	Cm	Ci	medio
D	medio	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	Cc	Cc	Cm	Ci	medio
E	medio	1/6400	1/12800	1/25600			Ci	Cc	Cc	Cm	Cmuerte	medio
F	medio	1/6400	1/12800	1/25600			Ci	Cc	Cc	Cm	Cmuerte	medio
G	medio	1/6400	1/12800	1/25600			Ci	Cc	Cc	Cm	Cmuerte	medio
H	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio	medio

Figura 21. Diseño de placa para el desarrollo del ensayo de citotoxicidad.

A fin de evaluar el efecto de los híbridos se ensaya la citotoxicidad a las nanopartículas de sílica, utilizando las mismas diluciones que se muestran en la **Figura 21**.

Se realizan dos placas por muestra analizada con el fin de realizar dos técnicas de revelado diferentes. Las mismas son descritas a continuación.

3.2.13.3 Detección de la viabilidad celular

Para el método con cristal violeta, se observa el estado de las células bajo el microscopio al cumplirse las 4 horas de incubación, luego se descarta el medio de cultivo de los pocillos de la placa. Se realiza un lavado con 100 μ L de PBS, se descarta y se agregan 50 μ L de cristal violeta 0,75% en MeOH 40% por pocillo y se procede a incubar durante 20 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo, se descarta el colorante y se realizan lavados hasta que el agua salga limpia. Se seca la placa y se deja escurrir por algunos minutos. Posteriormente, se agregan 250 μ L de ácido acético al 20% por pocillo y se homogeniza suavemente hasta que se observe una coloración uniforme en cada uno. Se determina la absorbancia a 590 nm, se realizan los gráficos correspondientes.

Mientras que para el método de MTT, se procede a remover el medio de todos los pocillos para posteriormente agregar 100 μ L de medio completo fresco. Luego, se añaden 20 μ L de MTT 2,5 g/L a cada pocillo, incluidos aquellos que presentan solo medio. Se incuba 3 horas a 37 °C con atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente, se agregan 100 μ L de SDS-HCL a cada pocillo y se incuba 16 horas protegiéndolo de la luz a 25 °C. Una vez que se cumple este tiempo, se homogeniza y se mide absorbancia a 570 nm.

La solución de MTT se prepara disolviendo 0,025 g en 10 mL de PBS estéril, se puede almacenar a 4 °C protegido de la luz durante cuatro semanas. La solución de SDS-HCl se prepara disolviendo 1 g de SDS en 10 mL de HCl 0,01 M.

3.2.13.4 Análisis de los resultados de citotoxicidad

Para el análisis de los ensayos de citotoxicidad lo primero que se realiza es observar si el control de medio y los controles de interferencia tuvieron una absorbancia considerable. Si ocurre esto con el control de medio, se debe restar dicho valor a los datos de los pocillos donde se fueron agregadas las diferentes diluciones de las muestras, a los controles de células y de muerte. Por otro lado, si los controles de interferencia 1/100 y 1/200 dan absorbancia, se deberán de restar a los datos de los pocillos donde se agregaron dichas diluciones. En el caso de que estos controles no presenten absorbancia no es necesario restar dichos valores. Una vez tomado en cuenta este punto, se procede a analizar los datos obtenidos en el *software* GraphPad Prism 6. A partir de este programa se logra obtener gráficos del porcentaje de viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración de híbrido usado. Para poder llegar a obtener dichos gráficos se siguieron varios pasos para el procesamiento de datos los cuales están especificados en el **Anexo 4**.

4. RESULTADOS OBTENIDOS

4.1. Síntesis de GNP de un diámetro aproximado de 12 nm.

Se lograron obtener GNP con un diámetro promedio de 11,53 nm aproximadamente, lo cual corresponde a un tamaño similar al esperado (201) y nos permite poder continuar con la encapsulación de las mismas. Además, se obtuvo una muestra homogénea (**Figura 22 (a)**) ya que se determinó un desvío estándar del 10,5% (**Figura 22 (b)**). Esto último se realizó tomando en cuenta todos los diámetros de las nanopartículas capturadas en las imágenes de TEM.

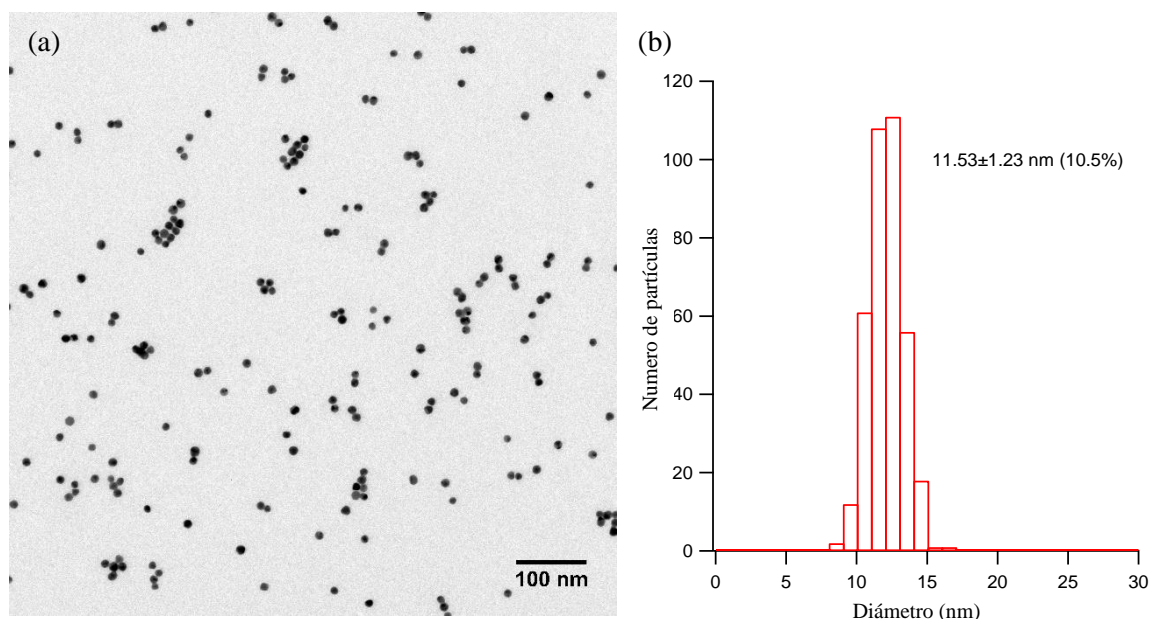


Figura 22. GNP de 11,53 nm de diámetro. (a) Imagen de TEM de las nanopartículas, esta es una de las imágenes a partir de las cuales se determinó el diámetro. (b) Histograma del diámetro de las nanopartículas medidas, donde se muestra el promedio de diámetro de toda la muestra y su desvío estándar.

4.2 Formación de VLP *single core*

Una vez caracterizadas las GNP de 11,53 nm se procede a la encapsulación de las mismas con las proteínas de la cápside viral de BMV, que fueron previamente purificadas y concentradas. De esta forma, se busca obtener VLP que sean *single core*, es decir, que contengan solamente una nanopartícula encapsulada.

Se analizaron las VLP obtenidas a través de imágenes de TEM para poder verificar la correcta formación de las mismas y su tamaño (**Figura 23 (a)**). A la vez, se tomaron imágenes en el TEM del virus BMV como control del tamaño para poder compararlo con la muestra de VLP *single core* (**Figura 23 (b)**).

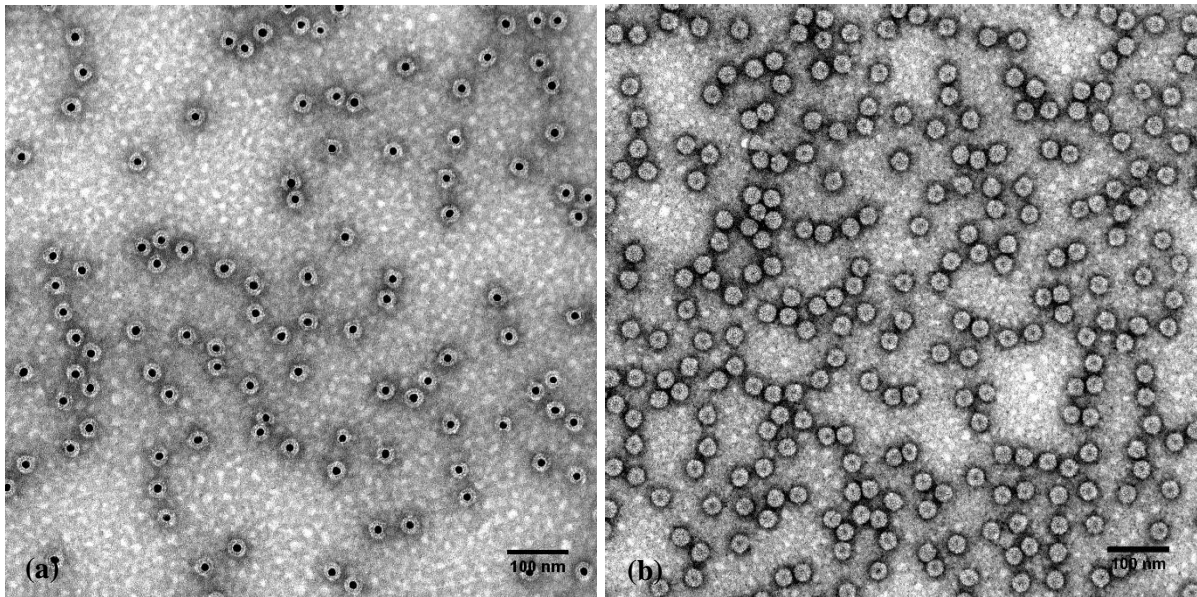


Figura 23. Imágenes de TEM. Se observan las muestras de las VLP *single core* (a) y el virus BMV (b).

En la **Figura 23 (a)** se observa la formación de las VLP encapsulando una GNP. Se logró obtener una muestra con un tamaño de diámetro de aproximadamente 29,79 nm y un exitoso rendimiento de encapsulación del 99%. El mismo se calcula al determinar el número total de partículas formadas y el número de VLP que lograron incorporar una GNP. Además, se obtuvo un tamaño de VLP muy homogéneo con un desvío estándar menor al 10%. En la **Figura 23 (b)** se muestra una imagen del virus BMV en el TEM, que fue utilizada para determinar su diámetro y así compararlo con el diámetro de las VLP formadas. La **Figura 24** permite observar que los tamaños de diámetros entre las VLP y el virus BMV fueron muy similares. Esta conclusión se confirmó a través de un test estadístico, que dio como resultado que la diferencia entre los diámetros medidos, para BMV y para las VLP, no es estadísticamente significativa ($p= 0,2408$).

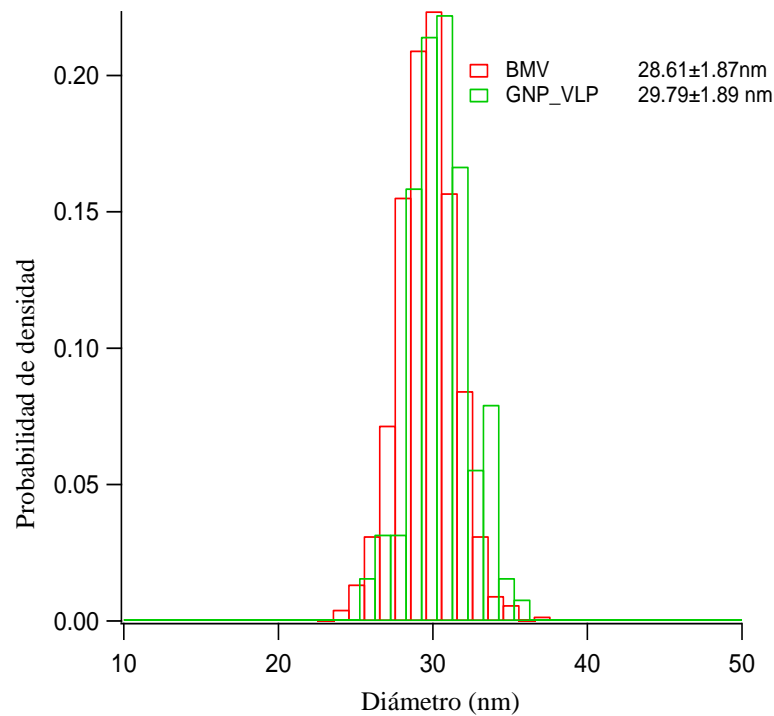


Figura 24. Superposición de histogramas. Se realiza la comparación entre el diámetro de las VLP (verde) y el diámetro del virus BMV (rojo). También se muestra el promedio de diámetro para cada muestra y su desvío estándar correspondiente.

Siguiendo con la caracterización de las VLP *single core* obtenidas, se analizó el tamaño de diámetro de la nanopartícula encapsulada dentro de cada VLP formada para compararla con el diámetro inicial de las GNP. Esto se realizó para estudiar la posible existencia de una selección de nanopartículas dentro de las VLP. Se logró determinar que no hay diferencia entre los diámetros promedios de las nanopartículas encapsuladas y las nanopartículas de la muestra inicial (**Figura 25**), dado a que la diferencia entre estas dos muestras no resultó ser estadísticamente significativa ($p= 0,1076$). Por lo que se concluye que no parece estar ocurriendo dicha selección de partículas durante el proceso de encapsulación.

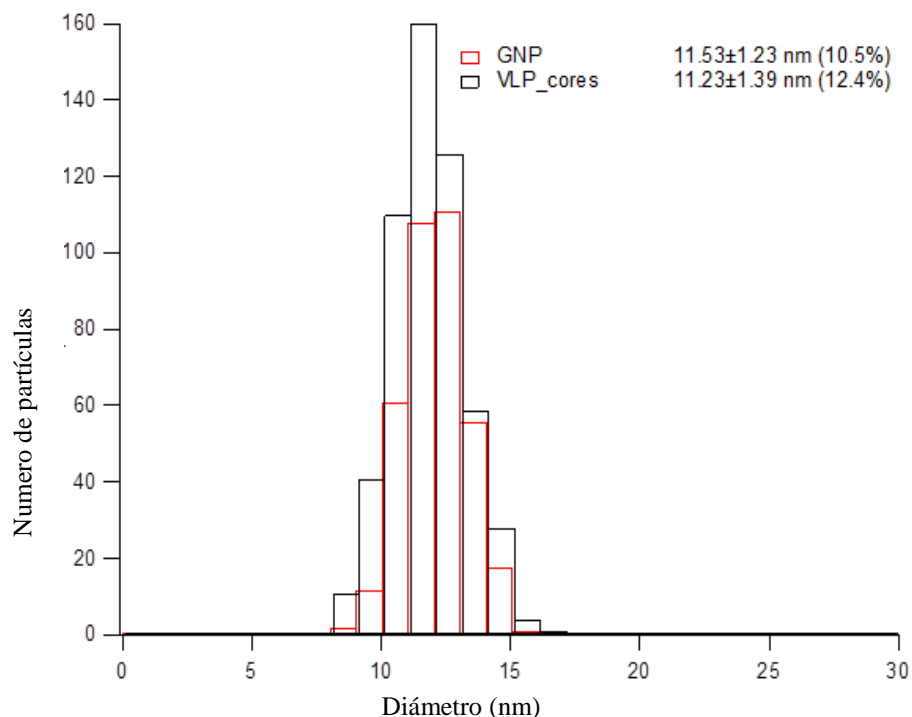


Figura 25. Superposición de histogramas. Comparación del diámetro de las GNP de la muestra inicial (rojo) y del diámetro de las nanopartículas que forman el núcleo de las VLP (negro). Además, se muestra el promedio del total de cada muestra y su desvío estándar correspondiente.

4.3 Síntesis de GNP de un diámetro aproximado de 3-5 nm

Se lograron sintetizar GNP de menor tamaño, ya que se obtuvieron partículas con un diámetro aproximadamente de 3,18 nm. Las nanopartículas en dicha muestra son de tamaño y forma uniforme (**Figura 26 (a)**). El desvío estándar calculado no fue similar al obtenido en los casos anteriores (**Figura 26 (b)**), esto se debe a que al ser GNP de menor tamaño son más inestables y no se espera ver la misma homogeneidad como la observada para las GNP de 12 nm de diámetro. De todas formas, un desvío estándar del 18% es aceptable para estas nanopartículas.

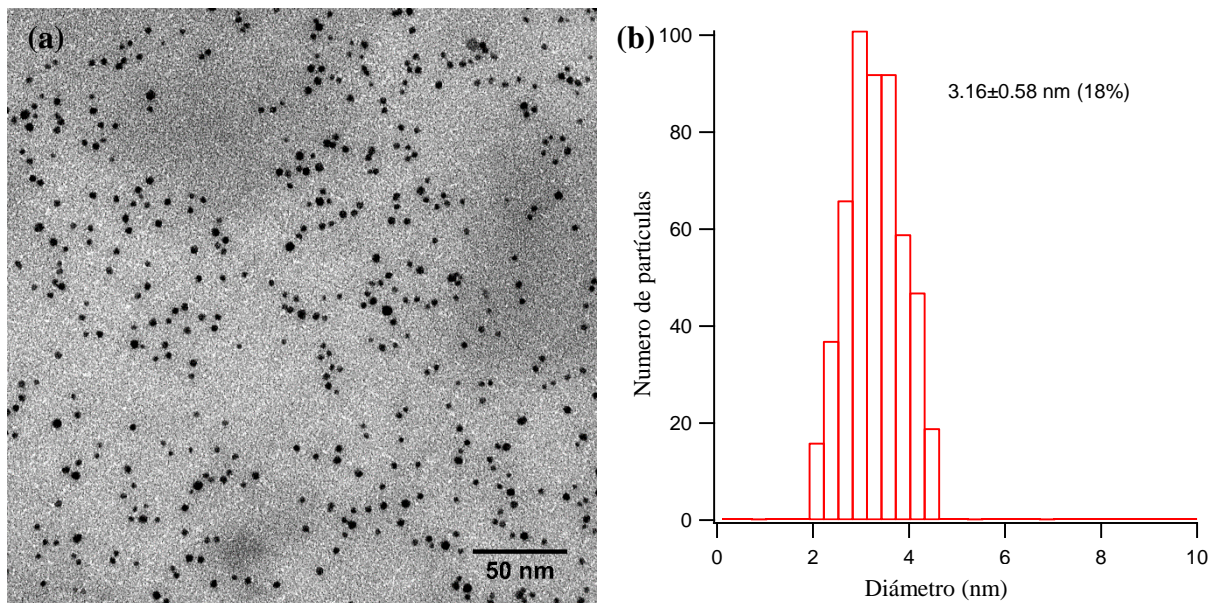


Figura 26. GNP de 3,18 nm de diámetro. (a) Imagen tomada en TEM de nanopartículas a partir de la cual se hizo la medición de diámetro. (b) Histograma de la medida de los diámetros de las nanopartículas, donde se muestra el promedio del total de la muestra y su desvío estándar.

4.4 Formación de VLP *multi core* con GNP

Una vez caracterizada la muestra de GNP de 3-4 nm, se procedió a su funcionalización y a la producción de VLP. Se buscó generar VLP *multi core*, es decir, que encapsulen más de una GNP. Para obtener sistemas con múltiples nanopartículas en su interior para su posible aplicación como *delivery* de drogas. Por esa razón se utilizan nanopartículas con un tamaño de diámetro menor al que se usó inicialmente.

En la **Figura 27** se observa una de las muestras que se obtuvieron, donde solamente hay VLP con una sola nanopartícula encapsulada pero ninguna *multi core* como se esperaba. Se realizó una medición del diámetro de las nanopartículas que estaban dentro de las VLP y se observó un cambio de tamaño en las mismas. Estas pasaron de tener un diámetro de aproximadamente 3,18 nm a 9 nm, por lo que es de esperar que no se hayan formado VLP *multi core* teniendo en cuenta que con nanopartículas de aproximadamente 12 nm se generan únicamente VLP *single core*. Además, se tuvo un rendimiento mucho menor comparadas a las VLP *single core* con nanopartículas de 12 nm, este fue menor al 15%. El mismo se calcula determinando el número total de partículas presentes y el número de VLP formadas que incorporaron una GNP.

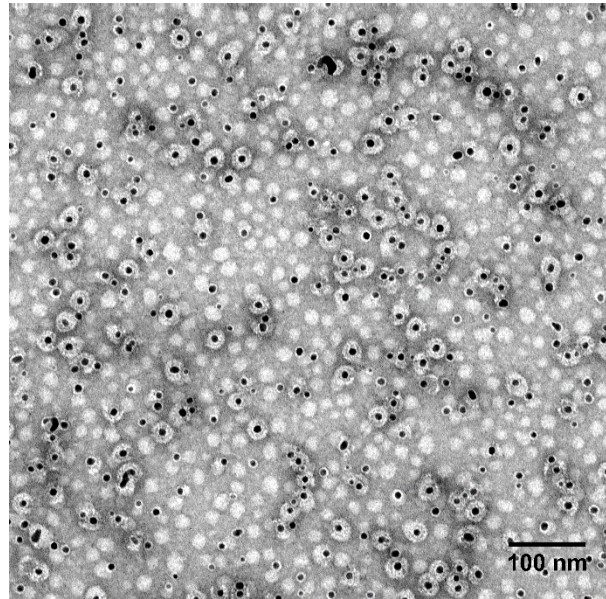


Figura 27. Imagen tomada en TEM de la formación de VLP *multi core*. Se observa que las VLP que lograron formarse son *single core*. Además se visualiza que las GNP aumentaron su diámetro.

4.5 Síntesis de SNP de un diámetro aproximado de 17 nm

Una vez que se sintetizan las SNP como indica protocolo se procede a analizar las muestras con TEM para determinar el diámetro de las mismas. En la **Figura 28** se muestran las nanopartículas sintetizadas, por lo que se puede observar que la muestra presenta una gran dispersión de tamaño. Al medir los diámetros de la muestra, se determina que el tamaño de las nanopartículas varía dentro del rango de 1 nm a 24 nm, siendo 5,71 nm el tamaño que se encuentra en mayor proporción, según el resultado obtenido en el histograma realizado (**Figura 29**). En el mismo no aparece el valor en los 24 nm dado que se encontró únicamente una partícula de dicho diámetro. Por otra parte, se observa que la forma de las nanopartículas no es uniforme, pudiéndose identificar partículas esféricas, romboides y amorfas. Las nanopartículas sintetizadas no fueron utilizadas para la formación de híbridos de VLP debido a que presentaron una gran distribución de tamaño, no resultaron ser uniformes como se esperaba y carecían de estabilidad, dado que al cabo de 24 horas se agregaron.

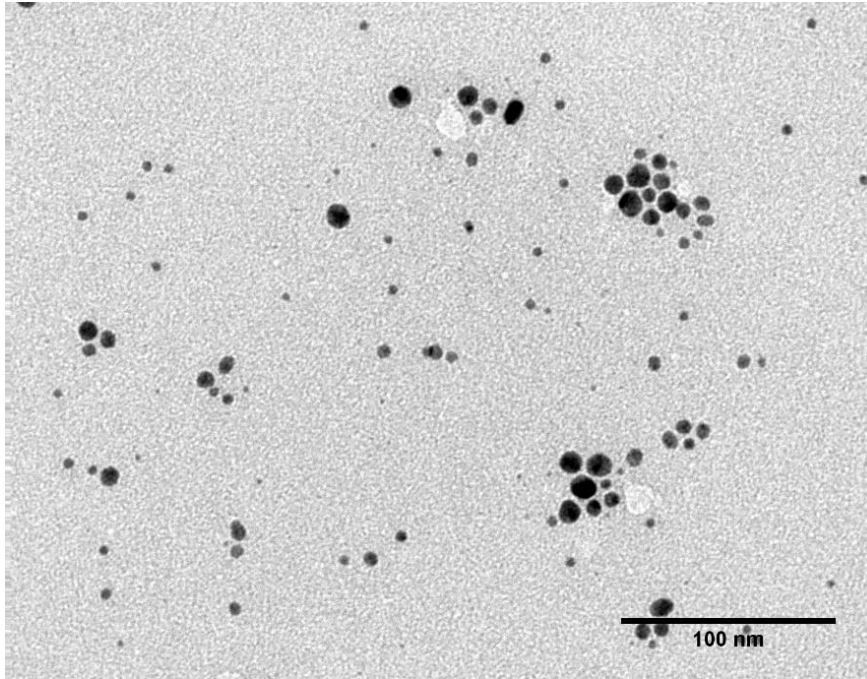


Figura 28. Síntesis de SNP para obtener un diámetro promedio de 17 nm. Se observa como la muestra carece de uniformidad en cuanto al tamaño y a la forma de las nanopartículas.

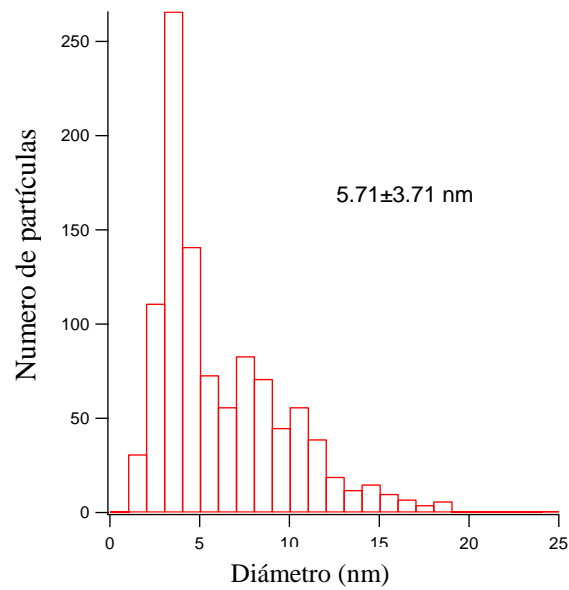


Figura 29. Histograma de la distribución de tamaño en la muestra de SNP. La síntesis permitió obtener un diámetro promedio de 4,1 nm en vez de 17 nm como era de esperarse.

4.6 Síntesis de SNP de un diámetro dentro de los 3-5 nm

Dados los resultados obtenidos para la síntesis de SNP de 17 nm se buscó sintetizar nanopartículas de 3 a 5 nm. Las mismas fueron sintetizadas con éxito determinándose que presentan tamaño de 4,1 nm, según se observa en el **Figura 30**, tamaño que estaba dentro del rango esperado con el protocolo utilizado. En la **Figura 31** se aprecia que las nanopartículas presentan una baja dispersión de tamaño y son uniformes. A su vez las partículas resultaron ser más estables que las previamente sintetizadas para un mayor diámetro, esto se observa debido a que pasadas las 24 horas se sacan muestras para analizar en TEM y se determina que el diámetro de las nanopartículas se mantiene.

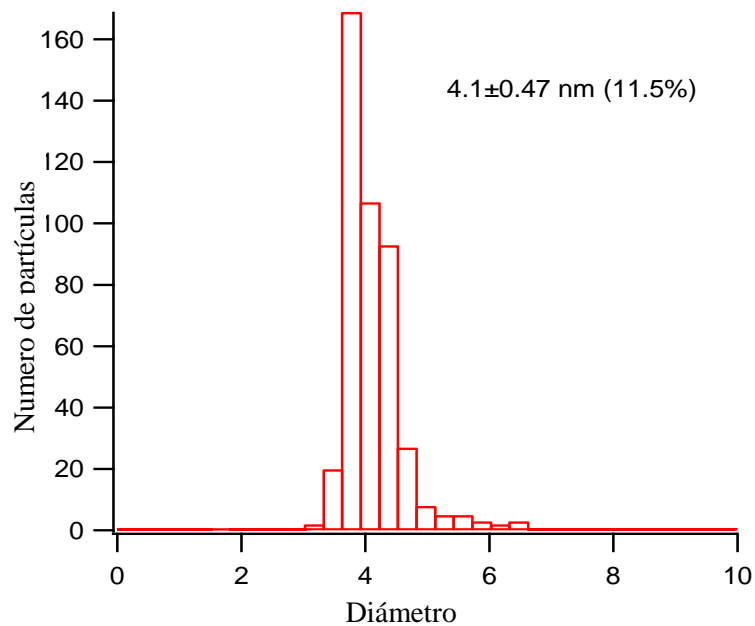


Figura 30. Histograma de distribución del tamaño de las SNP sintetizadas. Se observa que el diámetro que presentan la mayor proporción de las nanopartículas es de 4,1 nm con su respectiva desviación estándar.

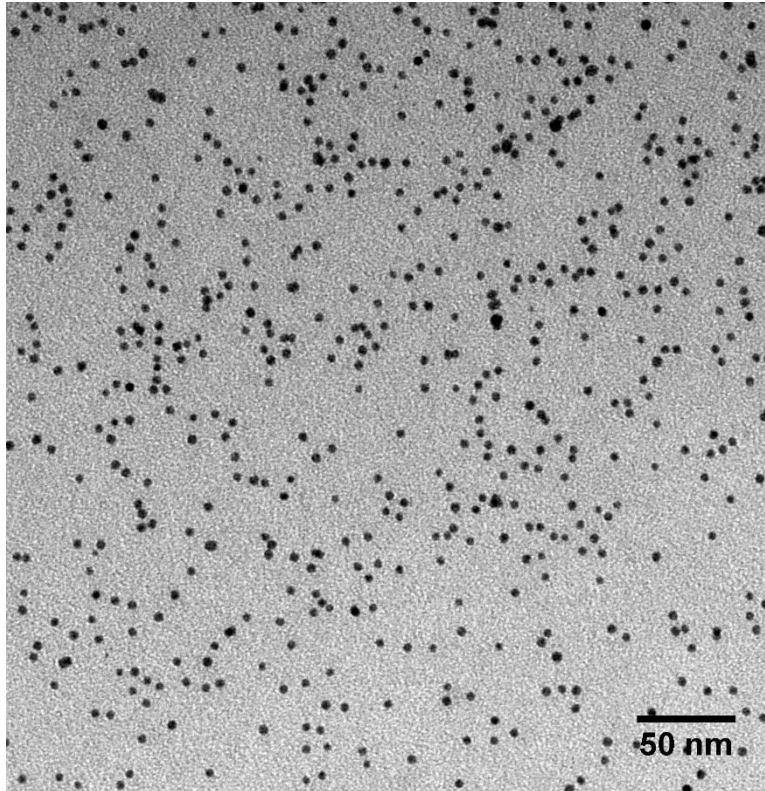


Figura 31. Imagen de TEM de las SNP de 4,1 nm. Se observa que la muestra presenta una distribución de tamaño uniforme.

4.7 Formación de VLP *multi core* con SNP

Una vez culminada la caracterización de las SNP de 3-4 nm sintetizadas, se procede a la funcionalización de las mismas para la posterior producción de VLP. Al igual que lo realizado para las GNP de 3-4 nm, se desea obtener tanto VLP *multi core* como VLP *single core*. Para ello, se utilizan las relaciones: 1:1, 1:5 y 1:20 lo cual refiere que por cada VLP que se forme vamos a tener 1, 5 y 20 nanopartículas en su interior, respectivamente. Por otra parte, se procede a evaluar la utilización de dos ligandos para la funcionalización de las nanopartículas: PEG3 y PEG4, permitiendo así determinar cual conlleva a mejores resultados. La funcionalización es necesaria para simular el cargo original, es decir el material genético, donde el ligando le confiere cargas negativas a las nanopartículas permitiendo su interacción con las proteínas de la cápside viral, originando así las VLP.

En la **Figura 32** se observan las muestras obtenidas utilizando el ligando PEG3 en las diferentes relaciones VLP:SNP evaluadas. En la **Figura 32 (a)** se observa la condición 1:1 donde se esperan VLP que presenten una nanopartícula encapsulada, en cambio se obtuvo una agregación de nanopartículas y proteínas, las pocas VLP formadas están rotas. En la **Figura 32 (b)** se observa la condición 1:5, donde se obtuvo agregación de proteínas y nanopartículas, mientras que las VLP formadas presentan *multi core*, no de 5 nanopartículas necesariamente pero su forma es esférica. En la **Figura 32 (c)** correspondiente a la condición 1:20 no se logra la formación de VLP, solo se pueden observar las nanopartículas sin ninguna proteína unida.

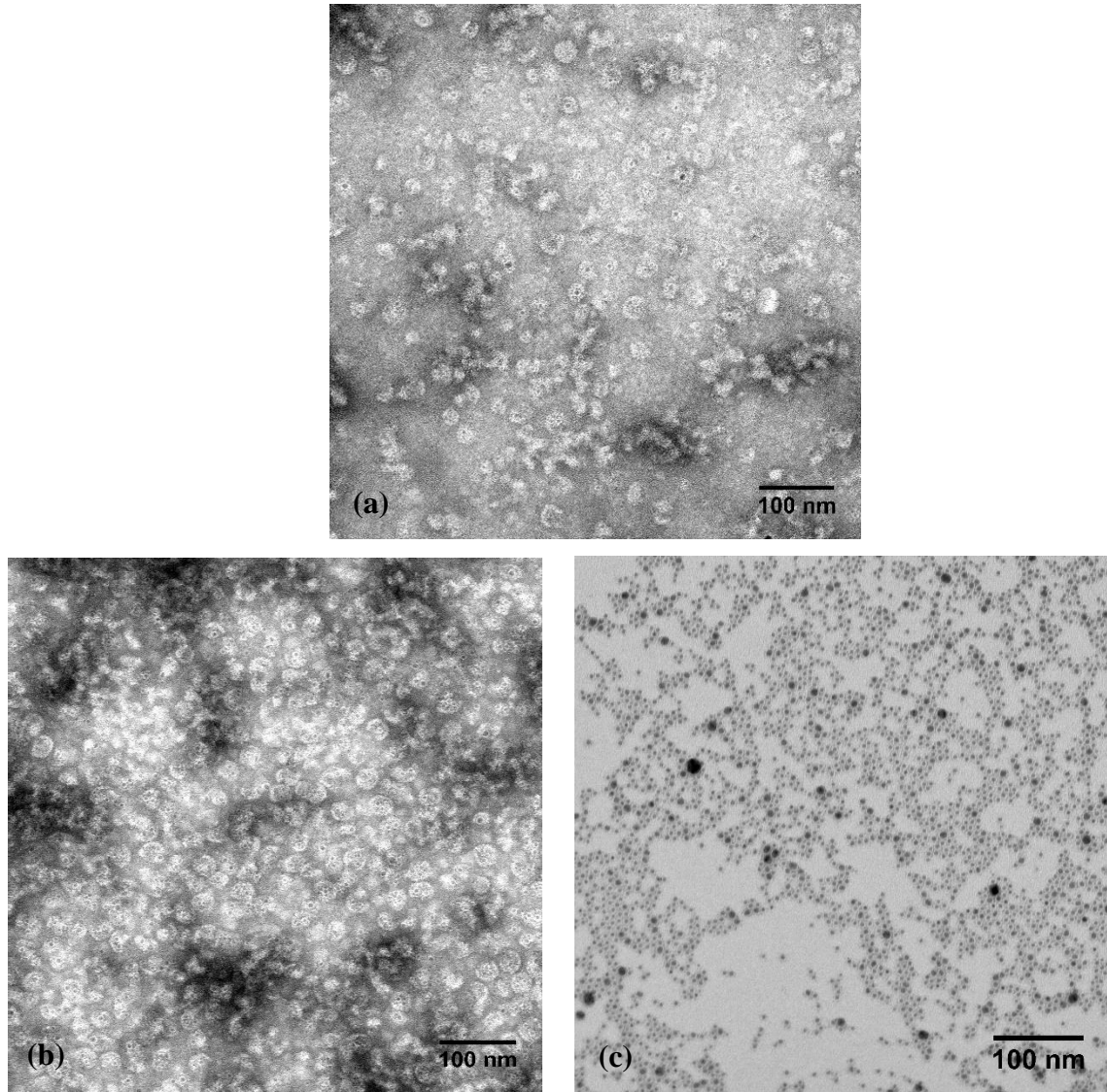


Figura 32. Formación de VLP *multi* y *single core* utilizando PEG3. Se observan las VLP obtenidas en TEM para las diferentes condiciones ensayadas: 1:1 (a), 1:5 (b) y 1:20 (c). En la condición 1:1 y 1:5 se observa la agregación de las nanopartículas y las proteínas además de VLP rotas y VLP *multi cores*, respectivamente. En la condición 1:20 se observan solo las nanopartículas de plata.

En la **Figura 33** se observan las muestras obtenidas utilizando el ligando PEG4 en las diferentes relaciones VLP:SNP evaluadas. En la **Figura 33 (a)** se observa la condición 1:1 donde no ocurrió lo esperado, en cambio se puede ver la agregación de proteínas y nanopartículas, además de VLP rotas. En la **Figura 33 (b)** se observa la condición 1:5 donde se obtuvo formación de VLP pero la mayoría estaban rotas y no tenían 5 nanopartículas por VLP como se esperaba. En la **Figura 33 (c)** correspondiente a la condición 1:20 se observa una muy buena formación de VLP conteniendo varias nanopartículas en su interior y a su vez presentan una forma bastante esférica, resultados que son coherentes a los esperados.

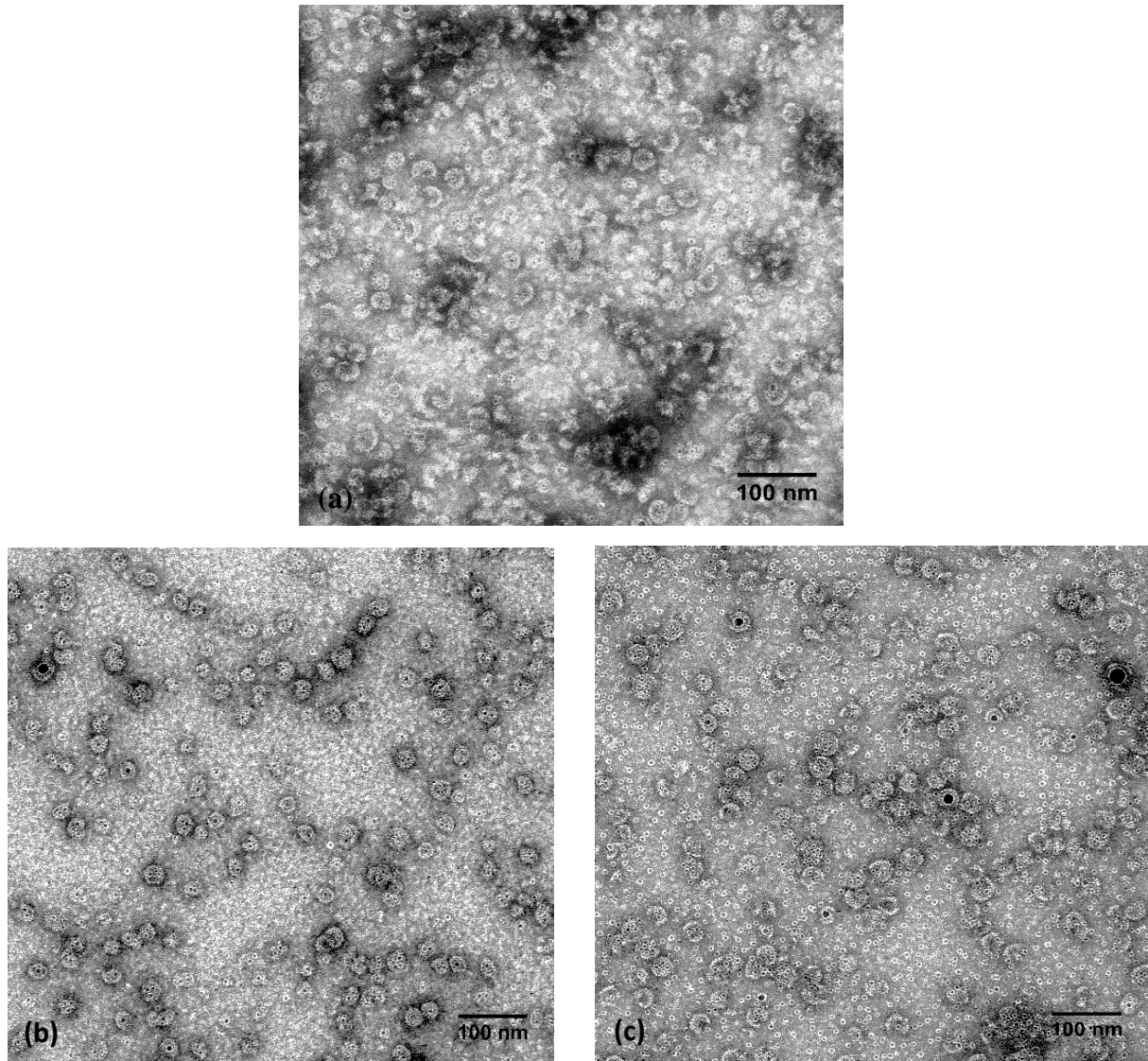


Figura 33. Formación de VLP *multi* y *single core* utilizando PEG4. Se observan las VLP obtenidas en TEM para las diferentes condiciones ensayadas: 1:1 (a), 1:5 (b) y 1:20 (c). En la condición 1:1 se observa la agregación de proteínas y nanopartículas, las pocas VLP que lograron formarse están rotas. En la condición 1:5 se observan VLP pero la mayoría están rotas y no presentan 5 nanopartículas. Para la condición 1:20 se observan VLP esféricas con varias nanopartículas en su interior.

A partir de los resultados obtenidos se pudo determinar que PEG3 no fue un buen ligando, mientras que con PEG4, el cual contiene un etilenglicol más que PEG3, se obtuvieron mejores resultados. A su vez, dentro de los resultados con PEG4 la condición que presentó resultados similares a los esperados fue la condición 1:20, de la cual se trataron dos muestras de forma distinta para poder visualizar diferentes componentes de las VLP obtenidas a través de TEM. En la **Figura 34 (a)** se observa la muestra sin teñir, donde se puede identificar las nanopartículas dentro de las VLP, mientras que en la **Figura 34 (c)** se observa la muestra teñida que permite visualizar la forma esférica de las VLP. En la imagen sin teñir se puede observar un halo gris esfumado rodeando las nanopartículas en el interior de las VLP, dado que la muestra está sin teñir sabemos que dicho halo no puede estar formado por proteínas ni por el ligando. En la **Figura 34 (b)** y (c) se observan los histogramas correspondientes a la muestra sin teñir y la muestra teñida, respectivamente. Al comparar ambos histogramas se observa un cambio notorio

del diámetro debido a que en las muestras teñidas, al medir el diámetro, se considera la cápside proteica que forma la VLP mientras que en la muestra sin teñir esta cobertura proteica no está contemplada. Se puede determinar que el mayor porcentaje de las VLP formadas presentan *multi core*, pero existe una pequeña proporción de VLP que presentan entre 1 a 3 nanopartículas en su interior. Aquellas que presentan una nanopartícula se deben a que esas nanopartículas no estaban dentro del tamaño promedio medido.

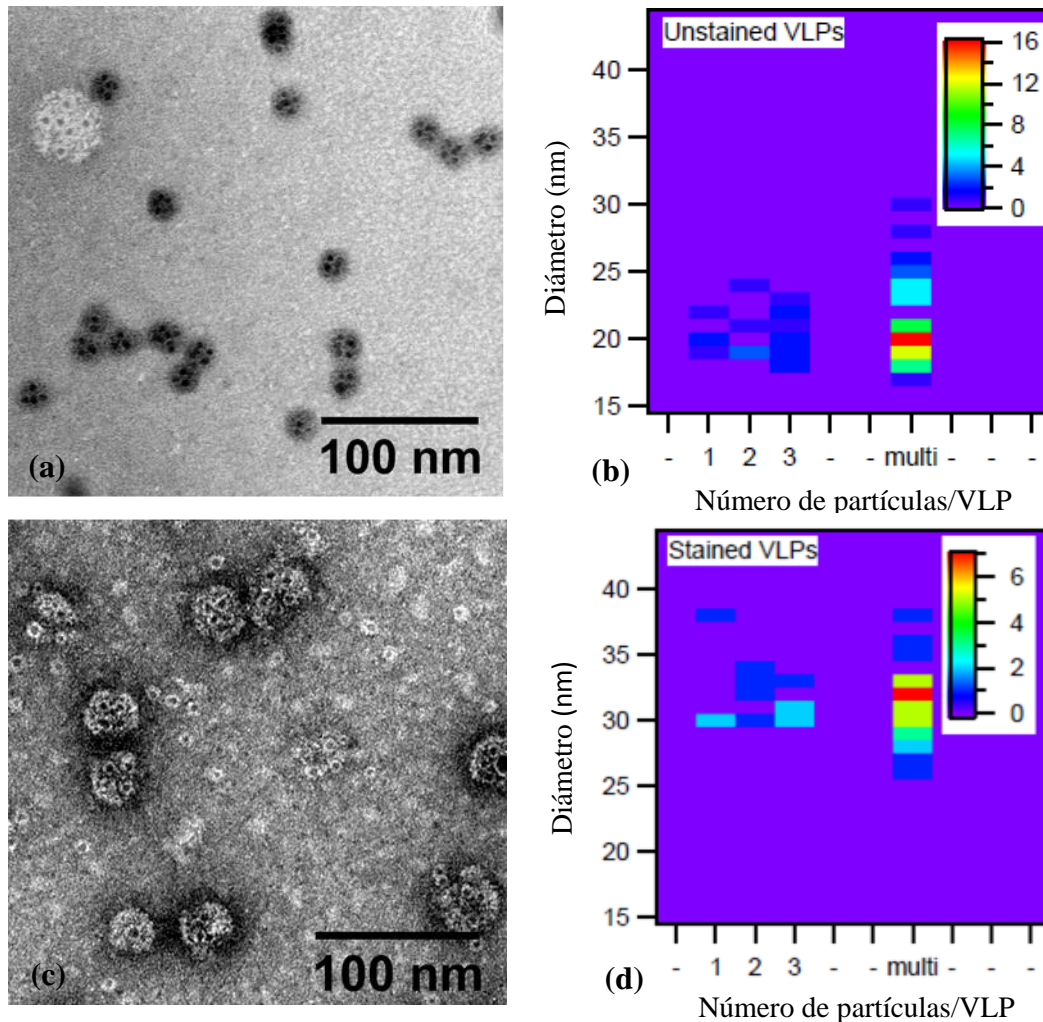


Figura 34. Condición PEG4 1:20. Se observa la muestra sin teñir (a), donde se identifican las nanopartículas en el interior de las VLP y la muestra teñida (c), que permite visualizar la envoltura proteica de las VLP. Mientras que en los histogramas se tienen los datos de la muestra sin teñir (b) y la muestra teñida (d) donde se analiza el diámetro de las VLP de acuerdo al número de nanopartículas

La síntesis de nanopartículas tanto de Au como de Ag, como también la formación de VLP *single core* y *multi core*, se realizó seis veces en las mismas condiciones obteniéndose los mismos resultados. A modo de resumen se mostraron estos resultados que son representativos de lo que obtuvimos con otras muestras.

4.8 Proceso de desensamblado del virus BMV

El proceso de desensamblado resulta interesante para la incorporación de drogas en el momento que la cápside viral se “hincha”, debido a cambios de pH, generando poros por donde podría ingresar la droga. Primero se trabajó con el fluoróforo SO, donde se logró construir una curva de las RFU, que es la forma de cuantificar la fluorescencia por parte del fluorímetro, en función del pH de la muestra de BMV con el fluoróforo (**Figura 35 (a)**). Se observó una tendencia de aumento de fluorescencia a medida que aumenta el pH, tal como se esperaba, dado que al aumentar el pH el virus se va “hinchando” permitiendo al SO acceder a las zonas hidrofóbicas (213). A un pH 5 la cápside se encuentra en su conformación estable, lo que concuerda con una baja intensidad de fluorescencia. A medida que se aumenta de pH 5 a 6 se observa un aumento de fluorescencia que es esperado porque se sabe que el virus comienza a presentar cambios estructurales a dichos pH, en los cuales parecen exponer una mayor cantidad de residuos hidrofóbicos. Luego a pH más altos entre 6 y 7, es cuando está reportado el proceso de desensamblaje de la cápside viral. Parece haber un aumento de fluorescencia lineal en este tramo de la curva, que sería esperable porque a pH 6,5 aproximadamente, ocurre el primer paso de dicho proceso que puede ser reversible, mientras que a pH 7 ya debería de estar toda la cápside desensamblada. Por lo que, a este último pH tendría que haber una mayor cantidad de residuos hidrofóbicos expuestos para interactuar con el SO. En la **Figura 35 (b)** se observa la medida realizada para el pH 7, donde se muestra la gran intensidad del pico de fluorescencia correspondiente al virus en presencia del SO. También se puede ver la fluorescencia intrínseca que presenta el virus sin SO, a modo de comparación con la primera muestra y la curva del SO como blanco.

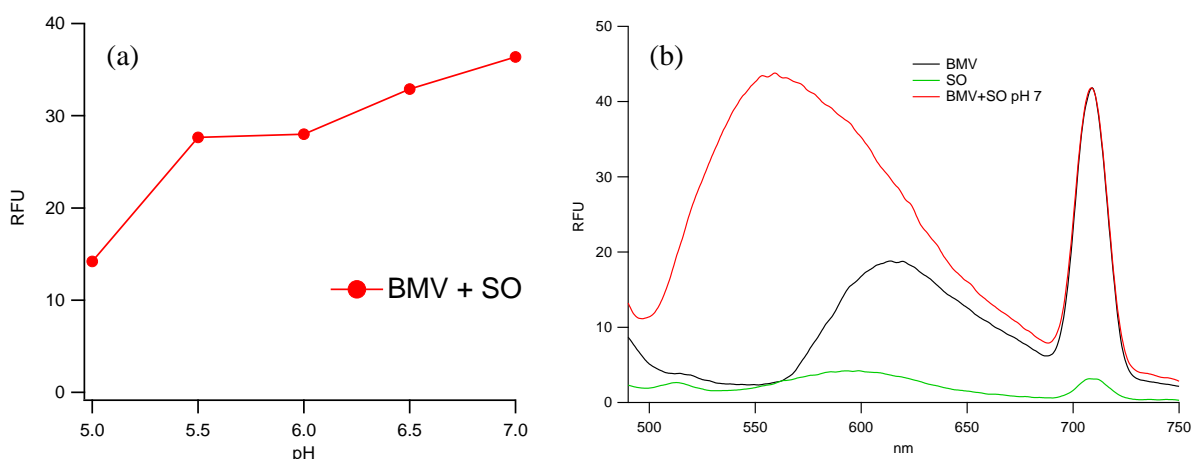


Figura 35. Proceso de desensamblaje de BMV analizado con SO. (a) Grafico de las RFU en función del pH de la muestra con BMV y el fluoróforo. Se observa un aumento de fluorescencia a medida que el pH aumenta como era de esperar. (b) Grafico de las RFU en función de la longitud de onda con las curvas de las muestras BMV (negro), SO (verde) y BMV con SO (rojo) a pH 7.

Se trabajó también con el fluoróforo SR de forma de poder determinar si tiene mayor o la misma sensibilidad en comparación al SO, dado a que este último presenta mucho *background*. Para el caso del SR se realizaron, varias veces, medidas a distintos pH pero no se logró obtener la reproducibilidad esperada. Es por esta razón, que no se realizó un gráfico de las RFU en función del pH para la muestra de BMV con el fluoróforo como se hizo en el caso anterior. De todas formas, en la **Figura 36 (a)** se muestra un gráfico de las RFU en función de la longitud de onda para las muestras de BMV con fluoróforo a pH 4 y pH 7. Se busca observar una diferencia en la intensidad fluorescencia a los diferentes pH, ya que sería lo esperable si se pasa de una conformación de la cápside estable a desensamblada. Se logra ver que a pH 7 existe una intensidad de fluorescencia mayor que a pH 4, junto a las curvas de los blancos del fluoróforo a cada pH los cuales tienen una curva muy parecida entre sí. En la **Figura 36 (b)** está el mismo gráfico pero con las curvas de fluorescencia para BMV con SR corregidas, ya que se les restó el blanco de SR para cada pH. Por lo que, teniendo en cuenta las curvas corregidas, se logra verificar lo ocurrido en la **Figura 36 (a)** con el virus en presencia del SR.

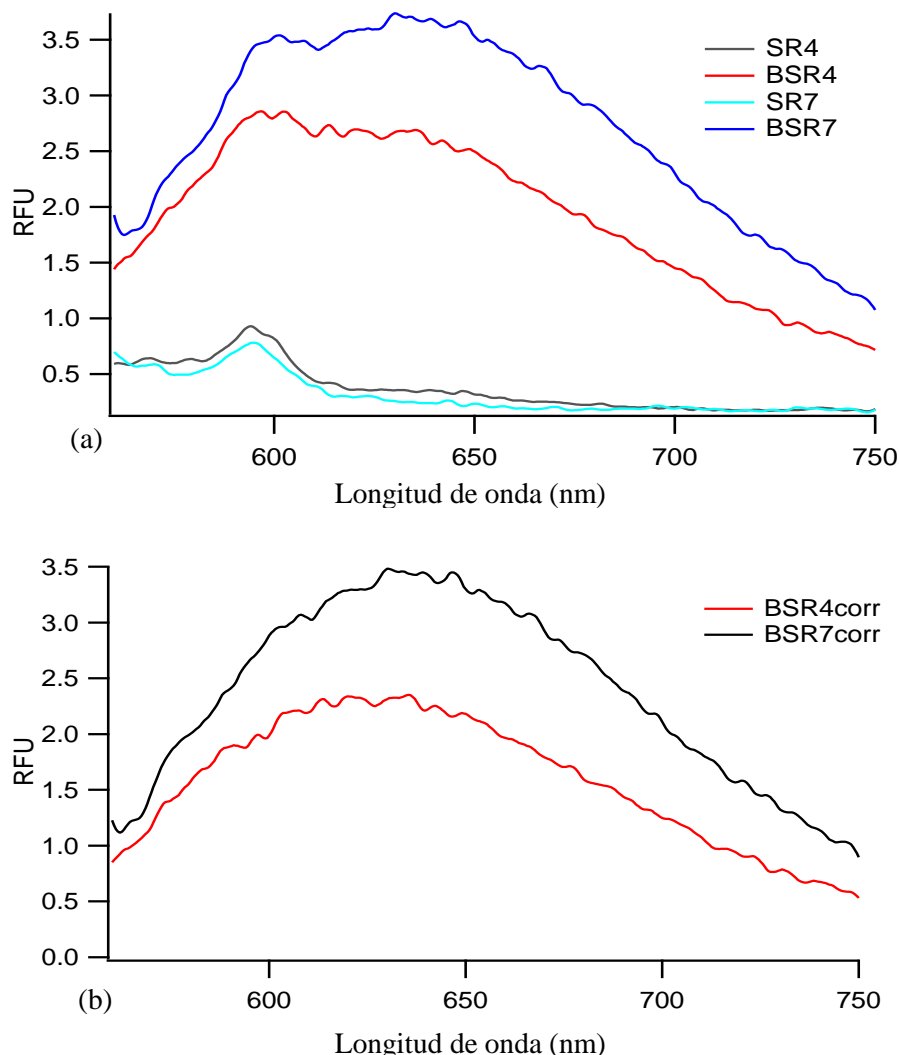


Figura 36. Proceso de desensamblaje de BMV analizado con SR en gráficos de RFU en función de la longitud de onda. (a) Curvas a pH 4 de las muestras BMV con SR (rojo), SR (negro) y curvas a pH 7 de las muestras BMV con SR (azul) y SR (celeste). (b) Las curvas corregidas de las muestras de BMV con SR a pH 4 (rojo) y a pH 7 (negro).

4.9 Caracterización de muestras de VLP de las cepas GII-4 y GII-12 de Norovirus.

En primer lugar se realizó la caracterización de las muestras de VLP de GII-12 y GII-4, determinando la concentración y la pureza de las mismas.

La concentración inicial de dichas muestras fue de $3,46 \pm 0,49$ mg/mL para GII-12 y $4,89 \pm 0,65$ mg/mL para GII-4. Se intentó una estrategia para mejorar la concentración de las muestras, sin éxito. Para el caso de la cepa GII-12, la concentración se mantuvo igual, mientras que la concentración de GII-4 disminuyó a más de la mitad (**Tabla 2**). En ambos casos el volumen fue reducido a la mitad. Esto puede deberse a que parte de la proteína se adhirió a la membrana de los concentradores, perdiendo parte de la muestra en el caso de GII-4. En cambio, para GII-12 puede haber ocurrido que la membrana estuviese perforada por eso no se observa ningún cambio en la concentración. Para mejorar estos resultados, se utilizaron concentradores nuevos cuyas membranas fueron neutralizadas con PVP antes de realizar posteriores concentraciones, evitando así que las proteínas se unan a la membrana y que no se pierda la muestra.

Tabla 2. Valores de la concentración de proteínas de GII 12 y GII 4 antes y después de la estrategia de concentración por concentrador.

	Inicial (mg/mL)	Final (mg/mL)
GII-12	3,46	4,02
GII-4	4,89	2,17

Además de calcular la concentración de las muestras por la técnica de determinación de proteínas, se hizo una electroforesis SDS-PAGE. En el gel de poliacrilamida se sembraron las muestras antes y después de la estrategia de concentración (**Figura 37**) de forma de poder observar la pureza de las mismas. Por otra parte, se sembró como muestra control de peso molecular una solución de albumina de suero bovino (BSA) 0,25 mg/mL, dado que por bibliografía dicha proteína tiene un peso molecular de 66,5 kDa (214).

En el carril 1 el marcador de peso molecular no corrió correctamente ya que no se logran ver bandas definidas como se esperaba. De todas formas, es posible identificar a las proteínas VP1 de la cápside de Norovirus tanto para la cepa GII-12 como para la cepa GII-4, gracias a la muestra control de BSA que se sembró en el último carril del gel. Si tomamos como referencia este peso molecular, se puede deducir qué bandas corresponden a la proteína VP1 en GII-12 y GII-4, dado que esta proteína es de aproximadamente 58-60 kDa (105). En los carriles 3 y 5 se sembraron las muestras inicial y final de la estrategia de concentración de GII-12, respectivamente. Para ambos carriles se observaron dos bandas, una que se encuentra a la misma altura que la BSA y otra de un peso molecular menor. Las muestras de VLP podrían estar contaminadas con BSA debido a la metodología de purificación que se utilizó para prepararla. Luego, la segunda banda con un menor peso molecular corresponde a la proteína VP1 de la cápside de GII-12 ya que aparece apenas un poco más abajo que la BSA, siendo lo esperable dado su peso molecular cercano a 60 kDa. Además, se puede observar que entre la

intensidad de las bandas de GII-12 inicial y final no hay diferencia, lo cual es coherente con lo observado en la determinación proteica (**Tabla 2**).

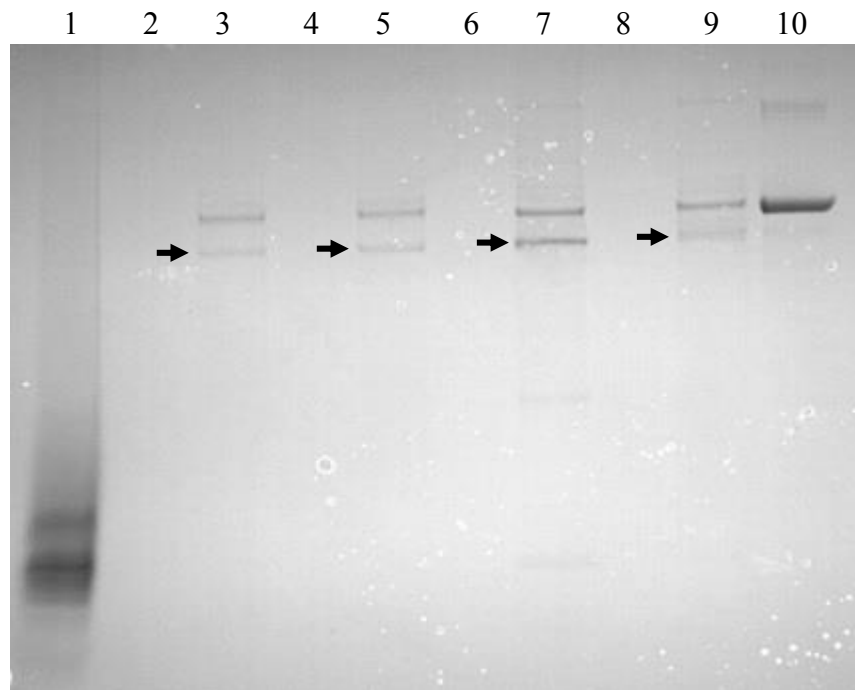


Figura 37. Caracterización de muestras de VLP de cepas GII-12 y GII-4 por electroforesis (15%). En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular AccuRuler RGB Prestained protein ladder de Maestrogen, el cual no corrió de forma correcta. En los carriles 3 y 5 se observa la muestra inicial y final de la concentración de GII-12, respectivamente. Mientras que en el carril 7 se corrió la muestra inicial de GII-4 y en el 9 la muestra final de la concentración de dicha cepa. Por último, en el carril 10, se sembró una muestra de BSA a una concentración de 0,25mg/mL como control. Las flechas indican las bandas correspondientes a las VLP de ambas cepas.

Por otro lado, en los carriles 7 y 9 se corrieron las muestras inicial y final de la concentración de GII-4, respectivamente. Al igual que en el caso de las muestras de GII-12, se observan dos bandas. Una corresponde a la proteína BSA, ya que se encuentra a la misma altura que la banda control en el último carril cuyo peso es de 66,5 kDa y la otra banda de menor peso molecular, la identificamos como VP1 de GII-4 que se encuentra entre los 58-60 kDa. Si se comparan las bandas en el gel de la muestra inicial con la final de GII-4 se puede observar que, la correspondiente a la muestra inicial tiene una intensidad mayor a las de la muestra final. Esto es esperable por lo visto en la determinación de proteínas, dado que luego de la estrategia de concentración se vio una disminución de la concentración en vez de un aumento como era lo esperado (**Tabla 2**).

Por último, comparando los resultados obtenidos en el gel de las diferentes cepas se observa que la banda correspondiente a VP1 de GII-4 está un poco más arriba que la de GII-12. Esto podría deberse a que la proteína VP1 varía su tamaño según la cepa, ya que como se mencionó anteriormente en la introducción, esta proteína contiene un dominio variable que genera una diferencia en su largo aminoacídico y por ende en su peso molecular. De todas formas, ambas proteínas se encuentran dentro del rango esperado.

4.10 Relación (peso seco/peso húmedo) de nanopartículas de sílica

Para poder establecer con exactitud la cantidad de proteína unida por peso de sílica, se procede a realizar la relación de sílica húmeda y sílica seca. De dicho ensayo se obtiene como resultado que la relación es de 0,21 g de sílica seca por gramo de sílica húmeda. El mismo consistió en dejar secar 1 g de sílica a 60 °C, y determinar su peso hasta que este quedara invariable.

4.11 Unión de VLP de cepa GII-4 a nanopartículas de sílica.

Se buscó unir la muestra de VLP a sílica a través de adsorción iónica sabiendo que las nanopartículas presentan su superficie cargada con grupos amino (Si4). Además, se funcionalizó la superficie de las nanopartículas de sílica para unir covalentemente las VLP (SiG4). Parte de la muestra Si4 se entrecruzó con glutaraldehído (Si4G) con el fin de obtener tres híbridos diferentes. Para llevar a cabo las uniones se utilizó la muestra inicial de VLP GII-4, la cual estaba a una concentración de 4,88 mg/mL.

Se obtuvo un porcentaje de 49% para el híbrido SiG4, mientras que para Si4 se obtuvo un 27% (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados obtenidos por adsorción iónica, entrecruzamiento y por unión covalente.

	mg aplicados	mg no unidos	mg unidos	Porcentaje de unión (%)	mg VLP/ g de sílica
Adsorción iónica	4,88	3,56	1,32	27 ± 1	6,60 ± 0,11
Entrecruzado	4,88	3,56	1,32	27 ± 1	6,60 ± 0,11
Unión covalente	4,88	2,49	2,39	49 ± 1	11,95 ± 0,19

Habiendo obtenido los diferentes híbridos se realizó una electroforesis SDS-PAGE de dichas muestras y con sus correspondientes sobrenadantes. De esta forma se puede corroborar que las VLP se hayan unido a las nanopartículas de sílica y también permite observar si ocurre la desorción de las VLP, dado que se trabaja a condiciones desnaturizantes. En la **Figura 38** se observa de forma esquemática lo que se espera que ocurra con los distintos híbridos generados en presencia de SDS.

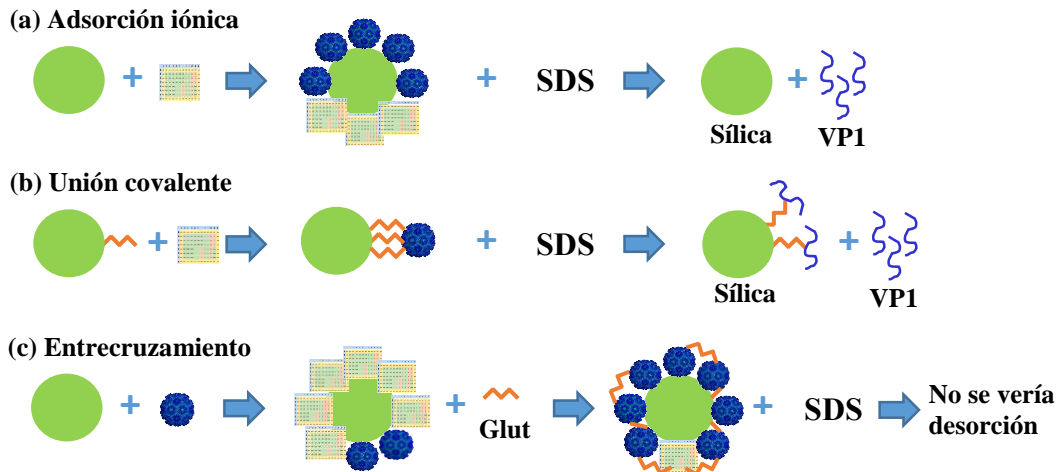


Figura 38. Esquema de lo esperado en la SDS-PAGE. Se intenta mostrar qué ocurre con los híbridos en presencia de SDS. En la adsorción iónica (a) la unión es lábil, mientras que en la unión covalente (b) se tiene una unión covalente fuerte. El entrecruzado (c) al tener una red de glutaraldehído impediría que desorbieran la proteína VP1 responsable de formar la cápside viral.

A continuación, en la **Figura 39** está el gel resultante de la SDS-PAGE para observar si hubo desorción proteica de los híbridos generados.

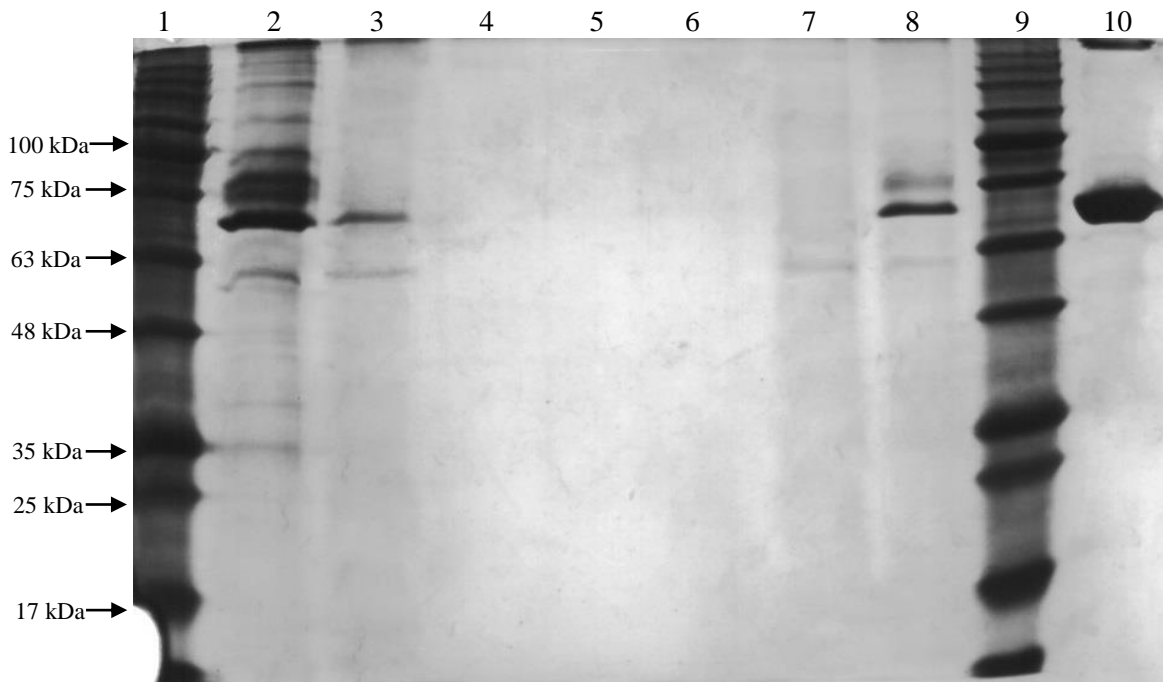


Figura 39. Electroforesis (15%) de los híbridos sílica-VLP y sus respectivos sobrenadantes de GII-4. En los carriles 1 y 9 se sembró el marcador de peso molecular molecular AccuRuler RGB prestained protein ladder de Maestrogen. Por otro lado, en los carriles 2 y 8 se sembró la muestra de GII-4 utilizada para unir a la sílica, la misma está a una concentración de 1,25 mg/mL. El sobrenadante de Si4 (carril 3), los híbridos Si4 (carril 4), Si4G (carril 5) y SiG4 (carril 6) y el sobrenadante de SiG4 (carril 7). Los dos sobrenadantes se sembraron diluidos ½. Por último, en el carril 10 se sembró la muestra de control BSA a una concentración de 0,5 mg/mL.

En primer lugar, en el gel de poliacrilamida (**Figura 39**) se puede observar la muestra de GII-4 con una concentración de 1,25 mg/mL en los carriles 2 y 8, la misma fue utilizada para generar los híbridos. En estos carriles se logró identificar la banda correspondiente a la BSA y VP1 entre el rango de 63-75 kDa y 48-63 kDa, respectivamente, que es esperable por los pesos moleculares de dichas proteínas. Se utilizó la muestra de BSA, la cual está sembrada en el carril 10, como control además del marcador de peso molecular para poder identificar a la proteína de la cápside viral. En la muestra del aplicado parece haber más proteínas que las identificadas cuando se hizo la caracterización de las muestras. En el carril 2 aparecen bandas de poco peso molecular y de 75 kDa para arriba, mientras que para el carril 8 solo se observa una banda intensa a 75 kDa. Suponemos que la presencia de dichas bandas se debe a contaminación con el marcador de peso molecular por la altura en la que aparecen las bandas en el gel, ya que concuerdan con las bandas del marcador. También podría deberse a la presencia de dímeros de VP1 para las bandas con peso molecular mayor a 100 kDa y degradación de la proteína para el caso de las bandas de 35-40 kDa (carril 2).

Luego, en los carriles 3 y 7 se sembraron los sobrenadantes de los híbridos Si4 y SiG4, respectivamente. En el primero de los sobrenadantes se observan dos bandas tenues de 66 kDa y 60 kDa, aproximadamente, que corresponden a la BSA y a la proteína de interés VP1, respectivamente. Mientras que en el otro carril, solo se logra visualizar en dicho rango una sola banda correspondiente a VP1. Las bandas de interés que aparecen en los carriles 3 y 7 son más tenues que las bandas obtenidas para la muestra del aplicado, a pesar de que los sobrenadantes estuvieran diluidos a la mitad. Estos resultados son los esperados, dado que el hecho de que las bandas en el sobrenadante sean más tenues que en el aplicado permite saber que se logró unir parte de la muestra inicial en las nanopartículas de sílica. Sin embargo, en el caso de la unión covalente parece haber una unión preferentemente de la BSA, ya que aparece la banda correspondiente a VP1 en el carril 7. Por más que haya ocurrido esto no se puede descartar que una pequeña porción de VLP se haya unido. Además, otra observación que se realizó haciendo la comparación de las intensidades de banda de estos carriles fue que las correspondientes a Si4 son más fuertes, lo cual es esperable porque hubo un menor porcentaje de unión (**Tabla 3**).

En los carriles 4 y 6 se sembraron los híbridos por adsorción iónica y por unión covalente, respectivamente. En ambos casos se logró una banda muy tenue entre el rango de peso molecular 63-75 kDa. Dichas bandas en 4 y 6 corresponden a la proteína BSA. Para mejorar la visualización de las bandas fue necesario utilizar una herramienta del *software* para analizar geles que permitió detectar la existencia o no de bandas en dichos carriles con mayor sensibilidad. El programa corta el carril de interés, lo coloca en sentido horizontal y arriba genera un histograma donde aparecen en verde los picos de bandas detectadas. Se logró identificar una banda para Si4 y SiG4 que estaba dentro del rango de peso 63-75 kDa que es lo esperable para BSA como se mencionó anteriormente (**Figura 40 (a), (c)**).

De forma de poder observar mejor las bandas en los carriles 4 y 6, situadas en el rango de 63-75 kDa, se utilizó el *software* para analizar geles que nos permitió hacer un gel 3D (**Figura 41**). En ambos carriles se puede observar con mayor facilidad una banda blanca en dicha zona que

la identificamos como BSA, teniendo en cuenta la banda control de esta proteína en el último carril y en los carriles del aplicado. Sin embargo, por más que no se pueda ver una banda de VP1 no se puede descartar que se haya unido VLP, dado a que podrían estar muy diluidas y no verse en el gel o que las mismas no se hayan podido ser desorbidas de las nanopartículas de sílica.

Por último, en el carril 5 se sembró el híbrido Si4G. En el gel no se observó la aparición de bandas, entonces para verificar esto se utilizó el *software* para analizar el carril. A partir del análisis se confirmó que no había ninguna banda (**Figura 40 (b)**), por lo que se puede concluir que el entrecruzamiento permite que la proteína quede atrapada y no se desprenda de la sílica, lo cual era lo esperado como se indicaba en la **Figura 38**.

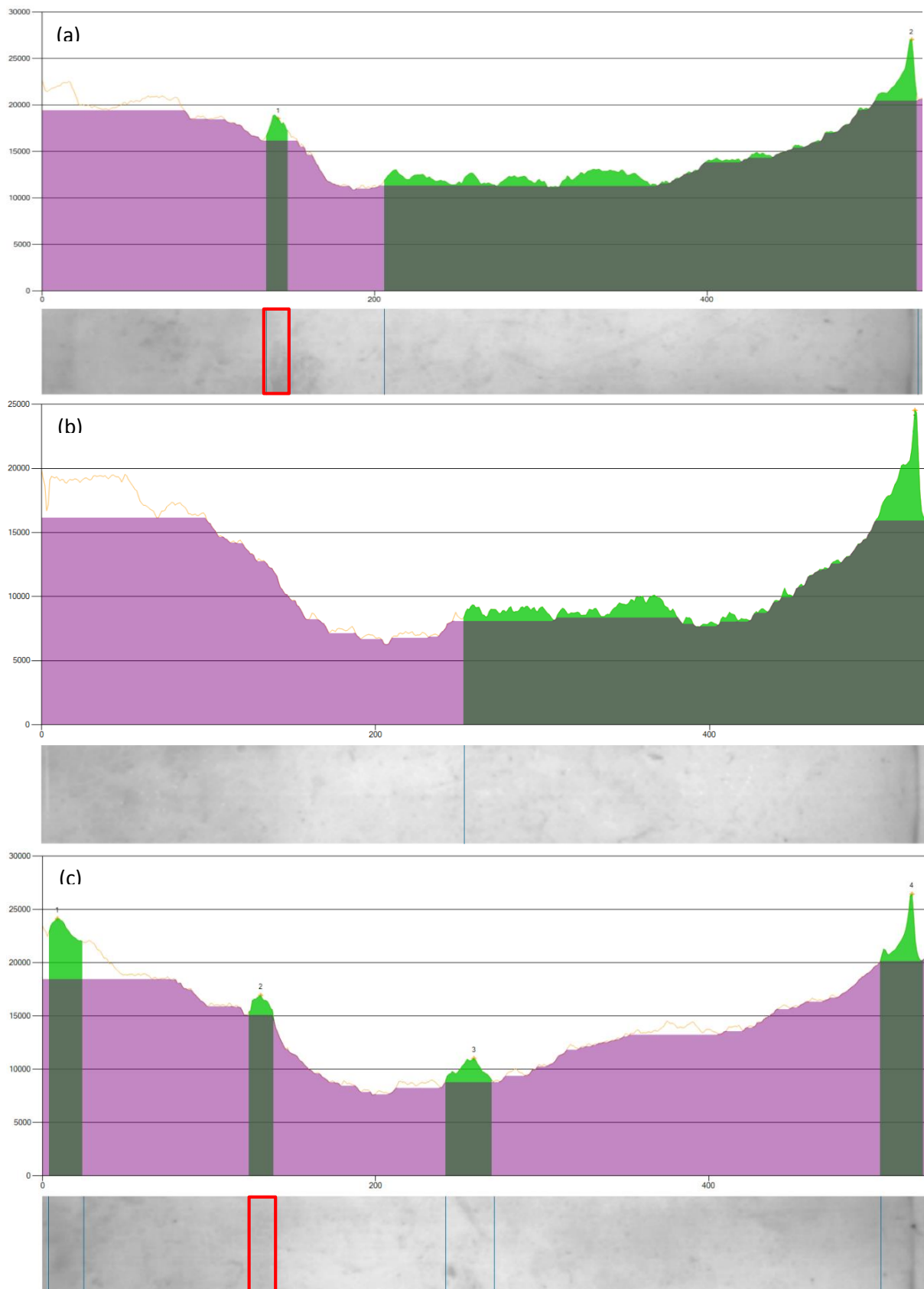


Figura 40. Análisis de los carriles 4,5 y 6 del gel de poliacrilamida que evalúa los híbridos Si4, Si4G y SiG4 respectivamente. (a) Carril (Si4), se logra detectar una banda de peso molecular entre 63-75kDa (encuadrada en rojo). (b) Carril 5 (Si4G). En este carril no se detectó ninguna banda. (c) Carril 6 con la muestra del híbrido SiG4. El software detectó tres bandas, una de las cuales se cree que es la banda de interés por su peso molecular (encuadrada en rojo).

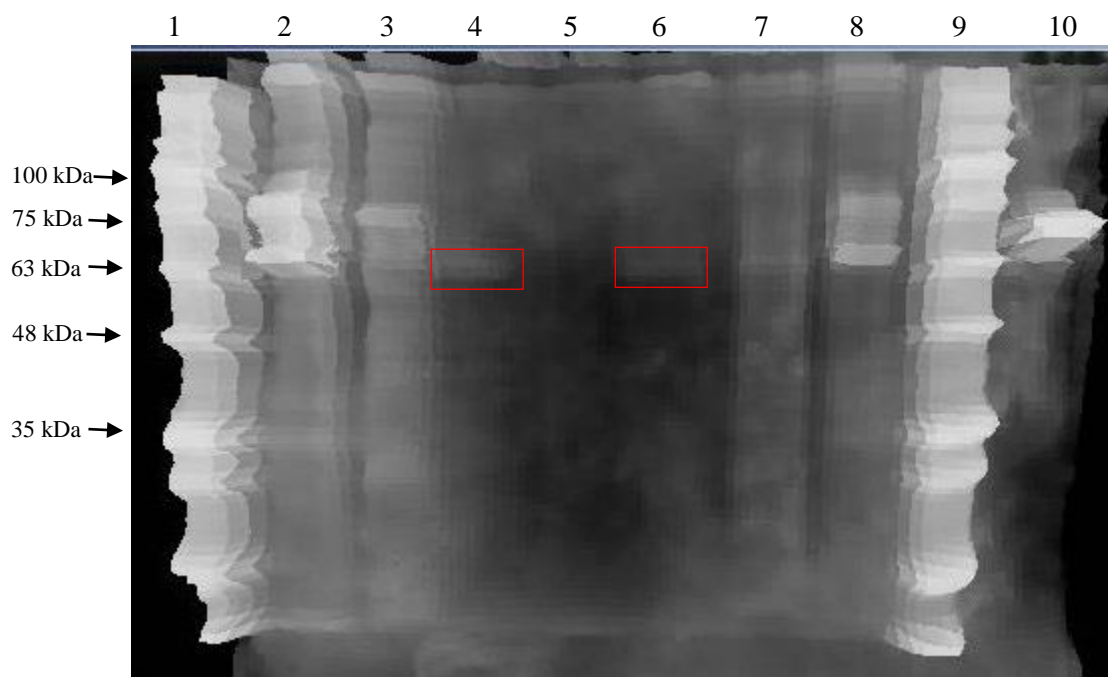


Figura 41. Histograma 3D de la electroforesis con los híbridos y sus respectivos sobrenadantes de GII-4. En los carriles 1 y 9 se sembró el marcador de peso molecular. Por otro lado, en los carriles 2 y 8 se sembró el aplicado (1,25mg/m). El sobrenadante de Si4 (carril 3), los híbridos Si4 (carril 4), Si4G (carril 5) y SiG4 (carril 6) y el sobrenadante de SiG4 (carril 7). Los dos sobrenadantes se sembraron diluidos a la mitad. Por último, en el carril 10 se sembró la muestra de control BSA a una concentración de 0,5 mg/mL. Las bandas correspondientes a la proteína BSA se encuadraron en rojo.

4.12 Capacidad de carga de nanopartículas de sílica con la cepa GII-12 de Norovirus

Se realizó la capacidad de carga para cada estrategia utilizada para generar los híbridos, es decir, para adsorción (Si12) y unión covalente (SiG12), dado que el híbrido entrecruzado (Si12G) utiliza la misma técnica de unión por adsorción y posteriormente se entrecruza. Para el caso de la unión por adsorción se utilizó una muestra de VLP GII-12 de 2,78 mg/mL de concentración. Se observa en la **Tabla 4** los valores obtenidos para cada tiempo en que se extrajo muestra, además se calculó el porcentaje de unión y la cantidad de mg de proteína por gramo de sílica.

Tabla 4. Resultados obtenidos para la capacidad de carga para el híbrido por adsorción.

Tiempo (minutos)	mg Aplicado	mg No Unido	mg Unido	Porcentaje de unión (%)	mg GII-12 / g sílica
15	2,782	1,865	0,917	33 ± 1	4,58 ± 0,23
30	2,782	0,825	1,957	70 ± 1	9,79 ± 0,25
60	2,782	1,009	1,773	64 ± 2	8,88 ± 0,15
120	2,782	1,321	1,460	52 ± 1	7,30 ± 0,20

En el caso de la unión covalente se utilizó una muestra de VLP GII-12 con una concentración de 3,69 mg/mL. En la **Tabla 5** se observan los resultados obtenidos para el estudio de la capacidad de carga en cada tiempo establecido, y se calcularon los mismos parámetros mencionados en la estrategia de unión anterior.

Tabla 5. Resultados obtenidos para la capacidad de carga para la unión covalente.

Tiempo (minutos)	mg Aplicado	mg No Unido	mg Unido	Porcentaje de unión (%)	mg GII-12 / g sílica
15	3,69	1,41	2,29	62 ± 1	11,44 ± 0,06
30	3,69	1,14	2,56	69 ± 2	12,78 ± 0,13
60	3,69	1,26	2,43	66 ± 1	12,16 ± 0,01
120	3,69	1,26	2,43	66 ± 3	12,16 ± 0,25

Se observó una unión rápida con máximos de carga de entre 9,7 a 12 mg de GII-12 por gramo de sílica.

Una vez que se obtuvieron los híbridos de la capacidad de carga se realizó una electroforesis de los mismos y sus correspondientes sobrenadantes, para determinar si se observa desorción de proteínas por las condiciones desnaturizantes utilizadas para llevar a cabo al gel, y si parte de la muestra no pudo unirse, respectivamente (**Figura 42**). Teniendo en cuenta los resultados esperados según se muestran en el esquema de la **Figura 38**.

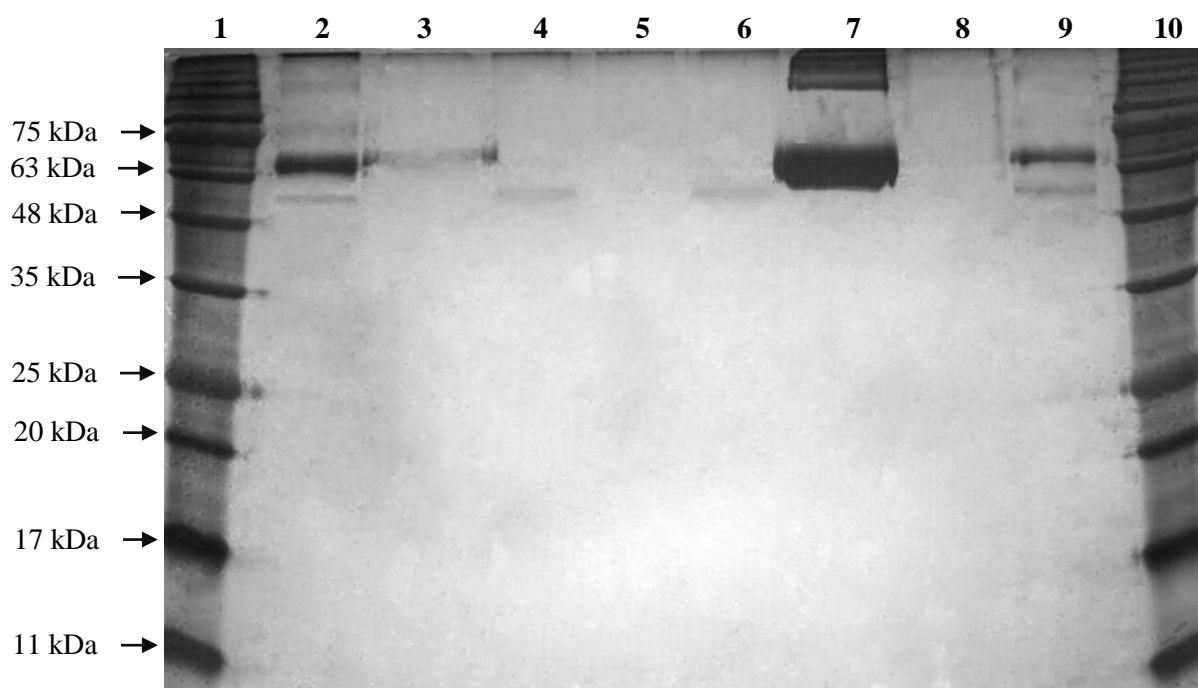


Figure 42. Electroforesis (15%) de los híbridos con GII-12. En los carriles 1 y 10 se sembró el marcador de peso molecular AccuRuler RGB prestained protein ladder de Maestrogen. Por otra parte en los carriles 2 y 9 se sembró la muestra de GII-12 aplicada. El sobrenadante de Si12 (carril 3), desorción de Si12 (carril 4) y desorción de Si12G (carril 5). Al lado de este último se sembró la desorción SiG12 (carril 6) y su correspondiente sobrenadante (carril 8). Mientras que en el carril 7 se sembró una muestra de BSA en una concentración de 0,25 mg/mL como control.

En el gel de poliacrilamida (**Figura 42**) se observaron dos bandas presentes en los carriles 2 y 9, donde se sembró la muestra aplicada de GII-12, las cuales están a una altura correspondiente al rango de 58- 60 kDa y 63- 75 kDa del marcador de peso molecular. Siendo lo esperado dado que VP1, la proteína que compone la VLP, presenta un peso molecular de 58-60 kDa, y la BSA comercial tiene un peso de 66,5 kDa, tal como se observa en el carril 7 donde se sembró la muestra control de dicha proteína. En el carril 2 aparecen bandas que no corresponden a VP1 y están a la misma altura que las bandas del marcador de peso molecular, indicando que la muestra se contaminó con dicho reactivo. Por otra parte, en el híbrido Si12 (carril 4) se puede observar una banda tenue, a la misma altura que la banda del aplicado, correspondiente a la proteína VP1 que se desorbió de las nanopartículas de sílica por las abrasivas condiciones utilizadas para la realización del gel. Pero cuando dicho híbrido está entrecruzado con glutaraldehído, Si12G (carril 5), esta banda no aparece, mostrando una unión más fuerte del híbrido. En el caso de SiG12 (carril 6) se observa una banda, a la misma altura que el aplicado, correspondiente a la proteína VP1. En el sobrenadante de la muestra SiG12 (carril 8) no se observa banda alguna, mostrando que se unió la mayor cantidad de proteína posible, aunque no se puede descartar que haya proteína que no logró unirse, pero la misma está muy diluida como para aparecer en el gel. En cambio en el sobrenadante del híbrido Si12 (carril 3) se observa una banda tenue alrededor de los 66 kDa que se identifica como BSA, correspondiente a que hubo parte de la muestra que no logró unirse. En el marcador de peso molecular (carril 1) se observa una banda entre las bandas correspondientes a 75 kDa y 63 kDa, dicha banda al observarse el gel con tinción de *Coomassie Brilliant Blue* no aparece.

4.13 Saturación superficial de sílica con *Sypro Orange*.

Se realizó por duplicado la corrida de cada muestra y se repitió tres veces el mismo experimento para poder obtener datos reproducibles. Solo se muestra uno de los resultados obtenidos sin los duplicados, dado que en todos los experimentos se observó el mismo patrón por lo que se consideró innecesario mostrar todos. En la **Figura 43** se puede observar que la curva rosada, correspondiente a la concentración de 25X comienza con fluorescencia, indicando que el SO se unió a las zonas hidrofóbicas de las nanopartículas de sílica. Dicha fluorescencia desaparece a los 50 °C. En el caso de la concentración de 50X, curva azul, comienza también con fluorescencia que sigue hasta los 72 °C. Esta fluorescencia es mayor en comparación a la de 25X, lo cual es lo esperado ya que a mayor concentración del fluoróforo más va a interaccionar con las zonas hidrofóbicas de las proteínas. Para la curva violeta, correspondiente a la concentración de 100X, comienza con una fluorescencia poco significativa la cual aumenta hasta los 78 °C. La fluorescencia, tanto para el de 100X como para el de 50X, alcanza un máximo de -0,2 indicando que la fluorescencia se mantiene constante a pesar que la concentración aumenta. Mientras que para el caso de 250X, curva verde agua, se observan dos picos de fluorescencia a los 38-40 °C y a los 58 °C desapareciendo a los 64 °C. A partir de estos resultados podemos determinar que la mejor concentración es la de 50X, dado que es la menor concentración de SO donde se obtiene la mayor fluorescencia posible, indicando que las zonas hidrofóbicas de las nanopartículas de sílica fueron totalmente saturadas con SO.

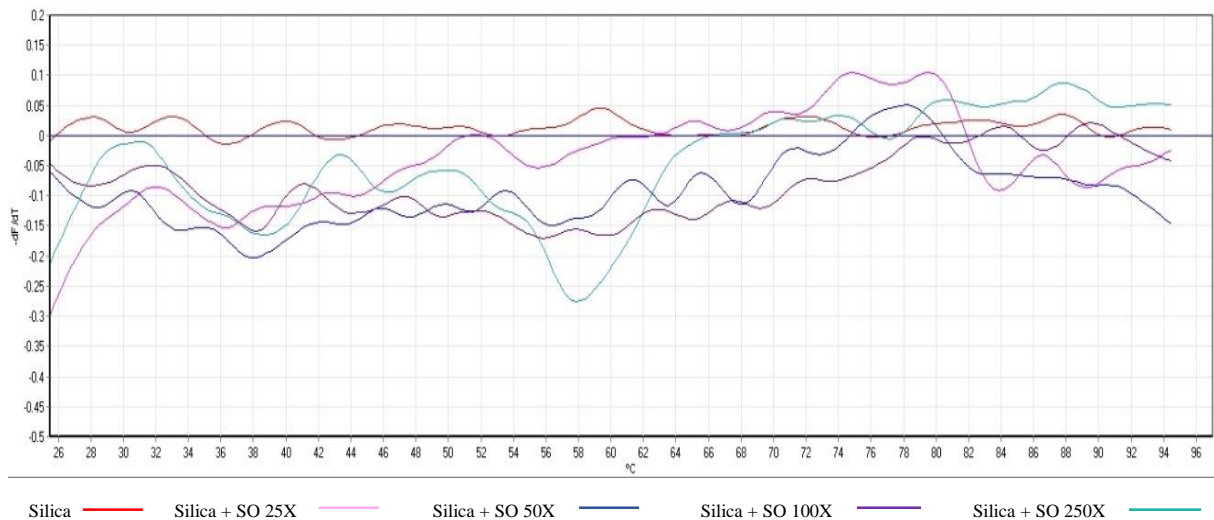


Figura 43. Curvas de fluorescencia de *Sypro Orange* a diferentes concentraciones. Se ensayaron las concentraciones 25X (curva rosada), 50X (curva azul), 100X (curva violeta) y 250X (curva verde agua) para determinar a qué concentración ocurre la saturación de las nanopartículas de sílica. No se muestran duplicados a modo de facilitar la observación de resultados, dado a que se obtuvo el mismo patrón en dichas curvas.

4.14 Estudios de estabilidad de los híbridos con VLP GII-4

Se llevaron a cabo experimentos de estabilidad térmica con los híbridos en comparación con la muestra soluble GII-4. En donde se espera poder observar una mejora en la estabilidad de las VLP cuando se encuentran unidas a la sílica.

La falta de muestra de VLP de la cepa GII-4 no nos permitió llevar a cabo experimentos como para poder obtener resultados concluyentes acerca de la estabilidad del híbrido. Por lo que con la poca muestra que se tenía se buscó poner a punto la técnica de forma de tener en cuenta una variedad de parámetros para las pruebas de estabilidad de los híbridos sílica – VLP GII-12. Para ello se estudio la variación de los siguientes parámetros: volumen final de muestra, concentración de SO teniendo en cuenta lo obtenido por la saturación superficial de la sílica por dicho fluoróforo, la importancia de optimizar la unión entre sílica- VLP y de normalizar la cantidad de proteínas para todas las muestras, y la variación del tiempo y la temperatura.

4.15 Estudios de estabilidad de los híbridos con VLP GII-12

Para los estudios de estabilidad se hicieron las medidas de cada muestra por duplicado y en tres experimentos independientes.

En la **Figura 44** se observan las curvas de fluorescencia de todas las muestras testeadas. La muestra soluble de VLP GII-12, representada en la curva de color rojo, fue utilizada como control para comparar con las curvas de los híbridos. No se logró tener una muy buena reproducibilidad entre los tres experimentos independientes, sin embargo, el primer y segundo ensayo tienen curvas muy parecidas entre sí para la muestra soluble. Se observa que hay una tendencia de aumento de fluorescencia entre los 30-50 °C, aproximadamente, en los tres ensayos. También, se observa solamente para el primer y segundo ensayo (**Figura 44 (a) y (b)**) que la fluorescencia aumenta alrededor de los 54-60 °C, 68 °C y por último a los 82 °C, aproximadamente. Mientras que en el tercer ensayo (**Figura 44 (c)**) se observa un aumento significativo de fluorescencia a los 64-66 °C y un pequeño aumento a temperaturas más altas. Según la bibliografía encontrada la cápside viral de Norovirus presenta cambios conformacionales en el rango de temperaturas de 55 a 60 °C (215), por lo que uno de los picos observados en el primer y segundo ensayo podrían corresponder a este proceso. Por otro lado, como la muestra de VLP de GII-12 estaba contaminada con la proteína BSA en una gran proporción, es importante tener en cuenta la temperatura de desnaturalización de esta proteína. Se ha reportado que dicha proteína sufre cambios conformacionales a los 65 °C (214), por lo que los picos observados en el primer y segundo ensayo a 64-66 °C podrían corresponder a la desnaturalización de la BSA.

Los resultados obtenidos para los tres experimentos de los híbridos Si12, Si12G y el control de sílica no mostraron tener picos de fluorescencia a lo largo de los ensayos, a excepción de un

duplicado de la muestra Si12G en el tercer experimento (**Figura 44 (c)**). Dicho duplicado presenta fluorescencia entre los 30-50 °C y a los 56 °C en adelante. No parece ser muy confiable este resultado dado a que la otra curva de Si12G en ese ensayo no presenta fluorescencia al igual que en el primer y segundo experimento para esa muestra. Por último, la muestra SiG12 mostró tener un aumento de fluorescencia al comienzo de todos los experimentos entre los 30-50 °C. Este resultado podría corresponder a la desnaturalización de las mismas proteínas que en la muestra de VLP GII-12 mostraban fluorescencia para dicho rango de temperatura, pero con una intensidad de fluorescencia mucho menor.

Dado a que no sabemos si las condiciones de trabajo son las mejores, por ejemplo en cuestión de agregación de las VLP, no se puede tomar en cuenta únicamente el proceso de desnaturalización de la proteína VP1 de Norovirus. Para la discusión de estos resultados se deberá de tener en cuenta que la posible agregación o presencia de contaminantes de los híbridos o proteínas solubles puedan conllevar a curvas distintas a las esperadas. De todas formas, el hecho de no haber obtenido picos de fluorescencia significativos de los híbridos con respecto a la muestra soluble es un resultado favorable, pero se requieren de más experimentos rigurosos para llegar a una conclusión.

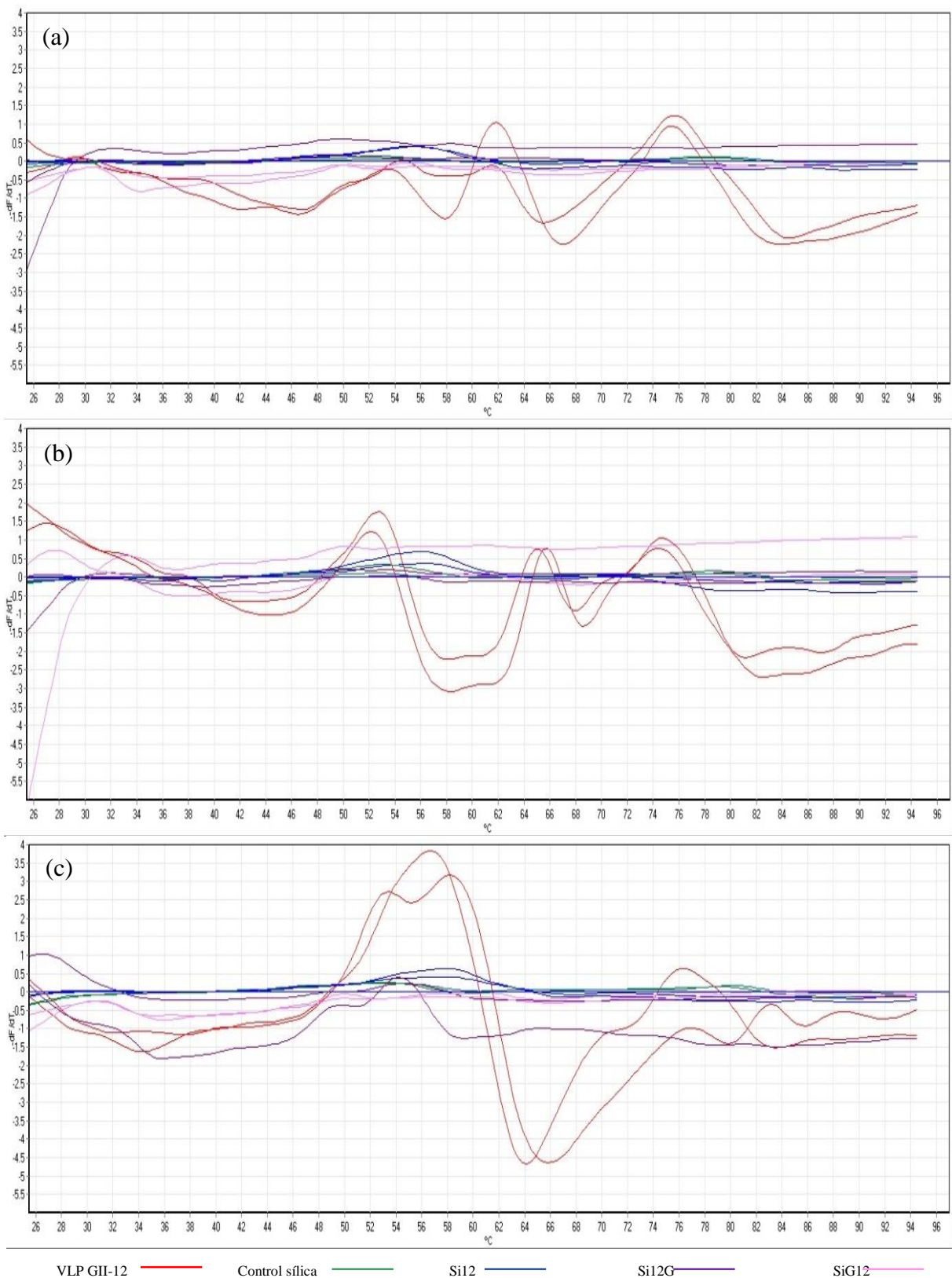


Figura 44. Estudio de estabilidad de los híbridos sílica-VLP GII-12. En los gráficos se observa la derivada de la fluorescencia negativa con respecto a la temperatura en función de la temperatura (°C) de los tres híbridos, el control de sílica y de la muestra GII-12 soluble, todo por duplicado para tres experimentos independientes. Curva roja: VLP GII-12, curva verde: control de sílica, curva azul: Si12, curva violeta: Si12G y curva rosada: SiG12. Los gráficos (a), (b) y (c) muestran los tres experimentos independientes. Los gráficos (a), (b) y (c) muestran los tres experimentos independientes.

4.16 Preparación de híbridos con VLP GII-12 para DLS

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de capacidad de carga, se procedió a realizar los híbridos utilizando las condiciones óptimas para que se dé la mayor unión entre la sílica y las VLP de GII-12. Por lo que en la **Tabla 6** se observan los resultados obtenidos para cada híbrido, al utilizar una muestra de VLP GII-12 con una concentración de 3,50 mg/mL. Los mismos fueron preparados con el fin de estudiarlos mediante DLS.

Tabla 6. Resultados obtenidos de las uniones de sílica- VLP GII-12.

Híbridos	mg Aplicado	mg No Unido	mg Unido	Porcentaje de unión (%)	mg GII-12 / g sílica
Adsorción	3,50	0,66	2,84	81,0 ± 0,2	28,40 ± 0,08
Entrecruzado	3,50	0,66	2,84	81,0 ± 0,2	28,40 ± 0,08
Unión covalente	3,50	0,64	2,86	81,7 ± 0,9	28,60 ± 0,32

Además, se decidió realizar una preparación de nanohíbridos por atrapamiento, permitiendo ver la diferencia con los híbridos previamente realizados, para ello la muestra de VLP fue concentrada. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (**Figura 45**) y otra determinación de proteínas (**Tabla 7**) con las muestras previo a la concentración y concentradas. Dicho procedimiento se realizó tanto con VLP de la cepa GII-12 como con la cepa GII-4.

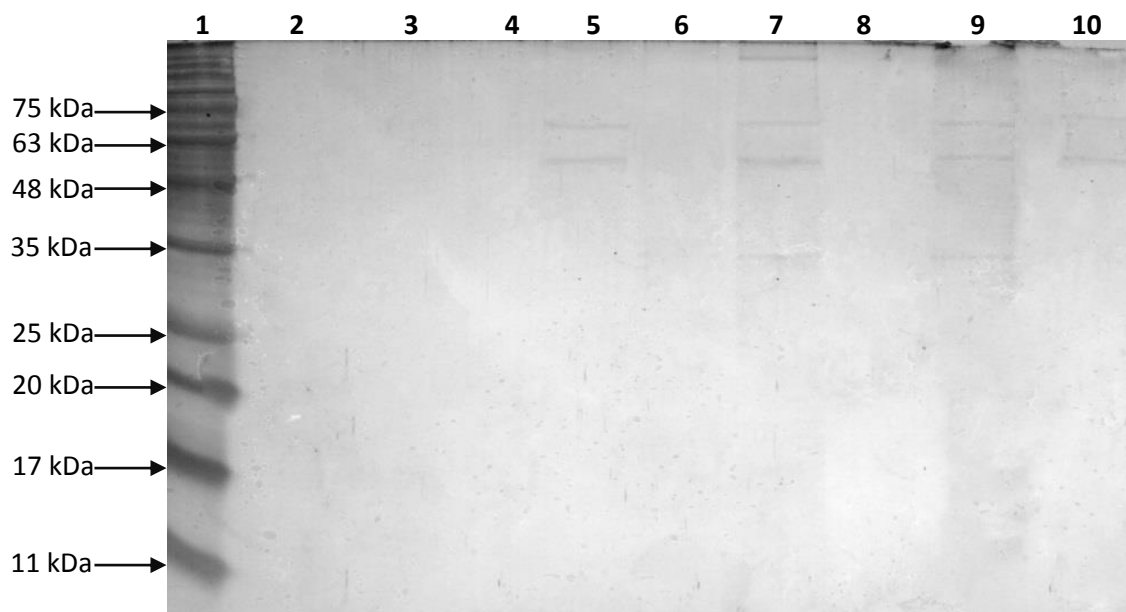


Figura 45. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las muestras concentradas. Se sembró la muestra GII-4 antes de concentrar (carril 3), y después se sembró la muestra concentrada (carril 9) y el sobrenadante del concentrador (carril 10). Se realizó lo mismo para la muestra GII-12 soluble antes de concentrar (carril 5), la muestra después de la concentración (carril 7) y el sobrenadante del concentrador (carril 8). En el carril 1 se sembró el marcador de peso molecular AccuRuler RGB prestained protein ladder de Maestrogen.

El gel de poliacrilamida (**Figura 45**) permitió determinar en qué fracciones estaban las muestras de interés. Para el caso de la muestra GII-4, la muestra antes de concentrar (carril 3) no presentó banda alguna, indicando que la muestra puede estar muy diluída como para verse en el gel. En cambio la muestra de GII-4 que fue concentrada (carril 9) presenta dos bandas, la que está por debajo de los 63 kDa corresponde a VP1, y la otra, por encima de ésta, corresponde a la proteína BSA situada en el rango de los 63- 75 kDa. En la muestra sobrenadante del concentrador (carril 10) se observan las mismas bandas que la muestra concentrada, pero más tenues, indicando que algo de muestra se perdió en la estrategia de concentración. Pero en ambas muestras se observan bandas que aparecen a los 35 kDa que podría ser VP1 degradada. En el caso de la muestra GII-12 antes de concentrar, se observan bandas (carril 5). Dichas bandas corresponden a la proteína VP1, en el caso de la banda por debajo de los 63 kDa, y a la proteína BSA en el caso de la banda que aparece entre los 63- 75 kDa. En la muestra concentrada (carril 7) se observan las bandas correspondientes a VP1 y BSA, a los 60 kDa y 66 kDa, respectivamente y se observa la banda a los 35 kDa que podría ser nuevamente degradación. A diferencia de GII-4, en el sobrenadante del concentrador de GII-12 (carril 8) no se observan bandas, indicando que no se perdió parte de la muestra al realizar la estrategia de concentración.

Una vez determinada la fracción conteniendo las VLP, se procedió a realizar la unión por atrapamiento utilizando una muestra de GII-12 con una concentración de 0,0136 mg/mL. Para ello se sintetizaron las nanopartículas de sílica con la muestra de VLP para generar el atrapamiento. El orden de los reactivos fue modificado para evaluar si las VLP tenían la capacidad de catalizar la formación de nanopartículas de sílica. Se realizaron cuatro híbridos por atrapamiento y en ninguno se vio formación de sílica cuando se mezcló la muestra de VLP con TMOS, por lo que fue necesario agregar PEI al 10 % como indica el protocolo de síntesis.

Se midió concentración de los sobrenadantes luego de realizar los atrapamientos (**Tabla 7**), pero los resultados no se tomaron en cuenta dado que las muestras presentaban una coloración celeste atípica (**Figura 46**). Dado que el híbrido por atrapamiento se realizó para ser evaluado por DLS, se utilizó solamente la muestra de GII-12 para generarlo, ya que los híbridos que se tenían para dicho ensayo eran sólo de esta cepa.

Tabla 7. Concentraciones de los sobrenadantes de los atrapamientos con GII-12.

Híbridos	Concentración (mg/mL)
SBN Atrapamiento 1	0,086 ± 0,010
SBN Atrapamiento 2	0,110 ± 0,021
SBN Atrapamiento 3	0,093 ± 0,028
SBN Atrapamiento 4	0,120 ± 0,012

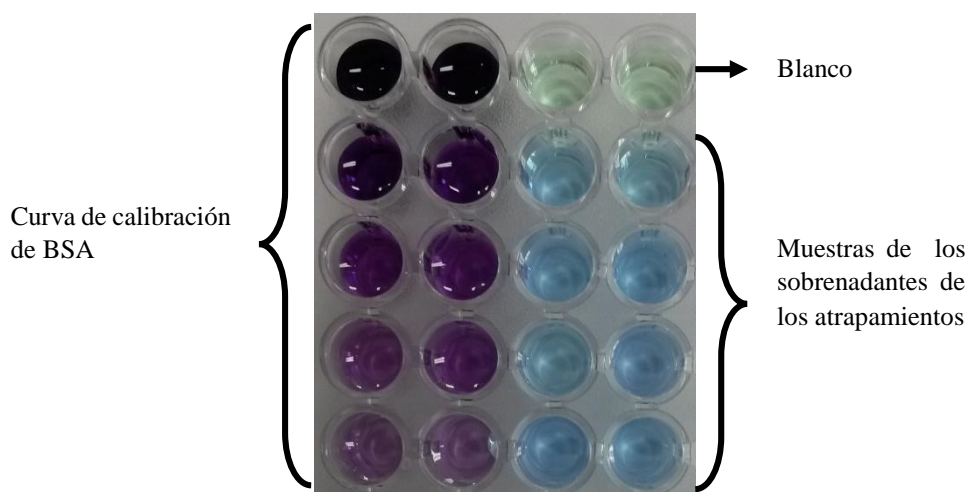


Figura 46. Determinación de concentración de proteínas. Diferencia de color entre la curva de calibración (violeta) y el blanco (verde claro) en comparación con las muestras de los sobrenadantes de los atrapamientos (celeste).

Debido a que los resultados de la determinación proteica no permitieron determinar si en el sobrenadante había proteínas, se procedió a realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida (**Figura 47**). En el mismo se observan dos bandas en la muestra GII-12 concentrado, que fue la muestra utilizada para los atrapamientos (carril 3). Las cuales una corresponde a la proteína VP1, siendo la banda por debajo a los 63 kDa, mientras que la banda por encima de VP1 es la proteína BSA. En los sobrenadantes de los atrapamientos 1, 2 y 3, carriles 5, 6 y 7 respectivamente, no se observa banda alguna por lo que se puede creer que se atrapó gran parte de la muestra aplicada y lo restante está demasiado diluído para ser observado en el gel. En cambio, en el sobrenadante del atrapamiento 4 (carril 8) aparece una banda por encima a los 63 kDa correspondiente a BSA, dado que se encuentra a la misma altura que la banda control de dicha proteína en el carril 9. La presencia de BSA y la ausencia de la banda correspondiente a VP1 nos indican que se puede haber unido a las nanopartículas de sílica un porcentaje de VLP de la muestra inicial. De todas formas, no se descarta que haya quedado proteína sin unir pero demasiado diluída como para visualizarla en el gel.

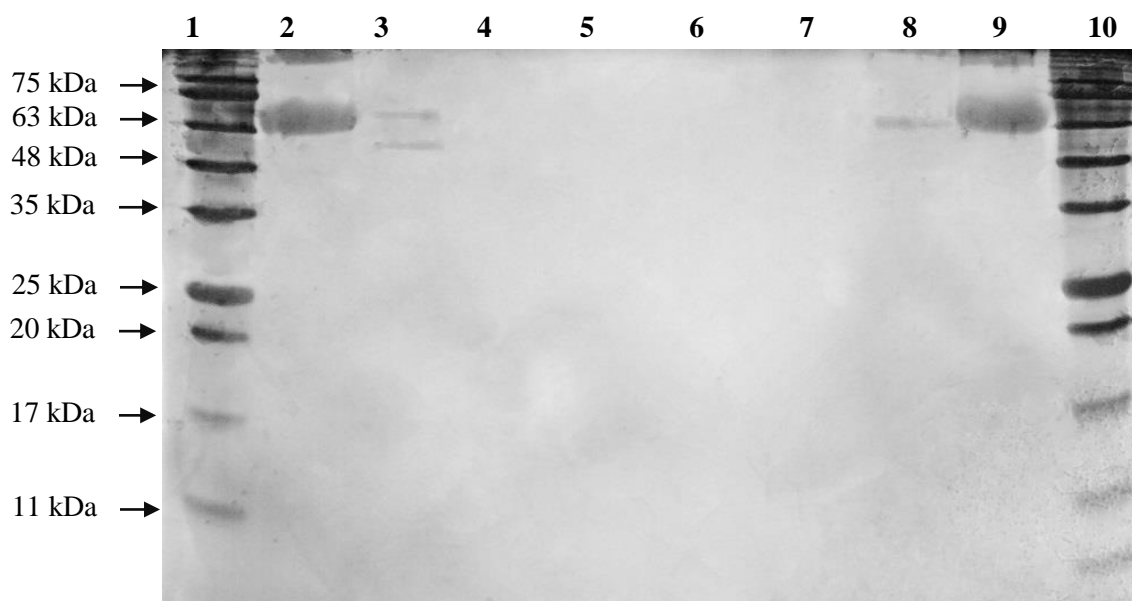


Figura 47. Electroforesis de los sobrenadantes de los atrapamientos. En los carriles 1 y 10 se sembró el marcador de peso molecular AccuRuler RGB prestained protein ladder de Maestrogen. En los carriles 2 y 9 se sembró BSA en una concentración de 0,125 mg/mL como control. Para observar si la unión por atrapamiento fue exitosa se sembró el GII-12 concentrado aplicado (carril 3) y los sobrenadantes de atrapamiento 1 (carril 5), atrapamiento 2 (carril 6) atrapamiento 3 (carril 7) y atrapamiento 4 (carril 8).

4.17 Ensayo de DLS y potencial zeta

Los resultados obtenidos en dicho ensayo se muestran en la **Tabla 8**, donde se observan los valores correspondientes al índice de polidispersidad (PdI por su nombre en inglés *Polydispersity Index*), los diámetros hidrodinámicos y al potencial zeta.

Tabla 8. Resultados obtenidos por DLS y análisis de carga superficial (potencial zeta) en los híbridos realizados.

Muestras	DLS		Potencial zeta (mV)
	Diámetro (nm)	PdI	
VLP GII-12	1739 ± 1004	0,187	29,50 ± 4,39
Sílica	838 ± 239	0,275	-5,63 ± 5,26
Si12	1609 ± 519	0,197	34,80 ± 3,77
Si12G	1087 ± 483	0,110	48,90 ± 4,09
SiG12	1514 ± 1129	0,276	56,10 ± 5,41
Atrapamiento	1677 ± 381	0,296	32,50 ± 3,89

A partir de los resultados obtenidos se observa que respecto a los valores de PdI, todos son más cercanos a 0 que a 1, por ende todas las muestras presentan una distribución homogénea de partículas. Por otra parte en los híbridos, el potencial zeta es mayor a los 30 mV por lo que las partículas estarían en suspensión y no agregadas (216), siendo la carga superficial positiva. En cambio, a diferencia de lo reportado las nanopartículas de sílica presentan un potencial zeta negativo indicando que la carga superficial es negativa y además que las nanopartículas están precipitadas; pero el diámetro hidrodinámico obtenido es muy similar al observado por Jackson

et al (161). En el caso de la muestra de VLP GII-12, se observa que el diámetro es mucho mayor al encontrado en la bibliografía (217-219) y que el valor de potencial zeta es cercano a los 30 mV indicando que la muestra estaría en suspensión pero no se descarta la posibilidad de que se encuentre agregada.

En la **Figura 48** se observan los gráficos correspondientes a aquellas muestras que obtuvieron más de una población de diámetros hidrodinámicos. En la **Figura 48 (a)**, muestra de Si12, se observan dos picos, uno a los 1595 nm y otro aproximadamente a los 5351 nm, los cuales representan el 97,2% y 2,8 %, respectivamente mostrando dos poblaciones distintas. Dicha muestra corresponde al híbrido por adsorción iónica donde el diámetro es mayor a la muestra de las nanopartículas de sílica (**Tabla 8**). Por otra parte la muestra SiG12 (**Figura 48 (b)**) se observan dos picos a los 2783 nm y 870 nm que representan el 66 % y 34 % respectivamente, esto muestra la presencia de dos poblaciones distribuidas de forma similar, que puede deberse a la acción del glutaraldehído para efectuar la unión covalente. En la muestra por atrapamiento, los picos que se observan están a los 1390 nm y 5470 nm, en una proporción del 97,1 % y 2,9 %, respectivamente. Esto indica que la mayor población corresponde al diámetro hidrodinámico menor, pudiendo deberse a que al llevarse a cabo, la concentración de VLP en la muestra era demasiado baja y no pudo ocurrir un atrapamiento adecuado.

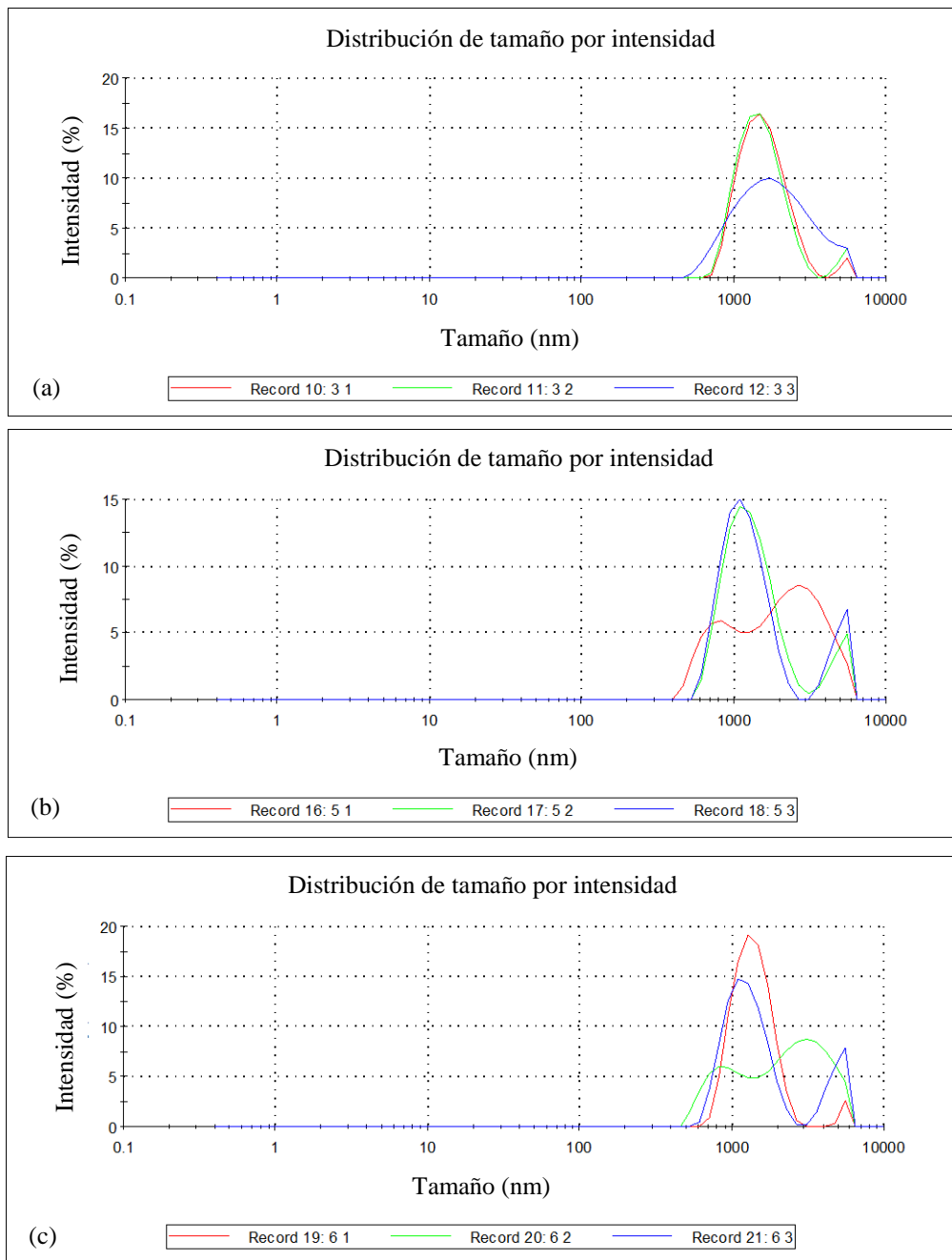


Figura 48. Gráficos resultantes de DLS. Los mismos corresponden a: (a) Si12, (b) SiG12 y (c) atrapamiento.

4.18 Imágenes de TEM de nanopartículas de sílica

Se tomaron varias imágenes de las nanopartículas de sílica sintetizadas (**Figura 49 (a) y (b)**), para todo el trabajo, con el fin de medir sus diámetros utilizando el ImageJ a modo de comparar los datos obtenidos con la técnica de DLS. A partir de los datos de diámetros medidos se realizó un histograma (**Figura 49 (c)**) para observar la distribución de tamaño.

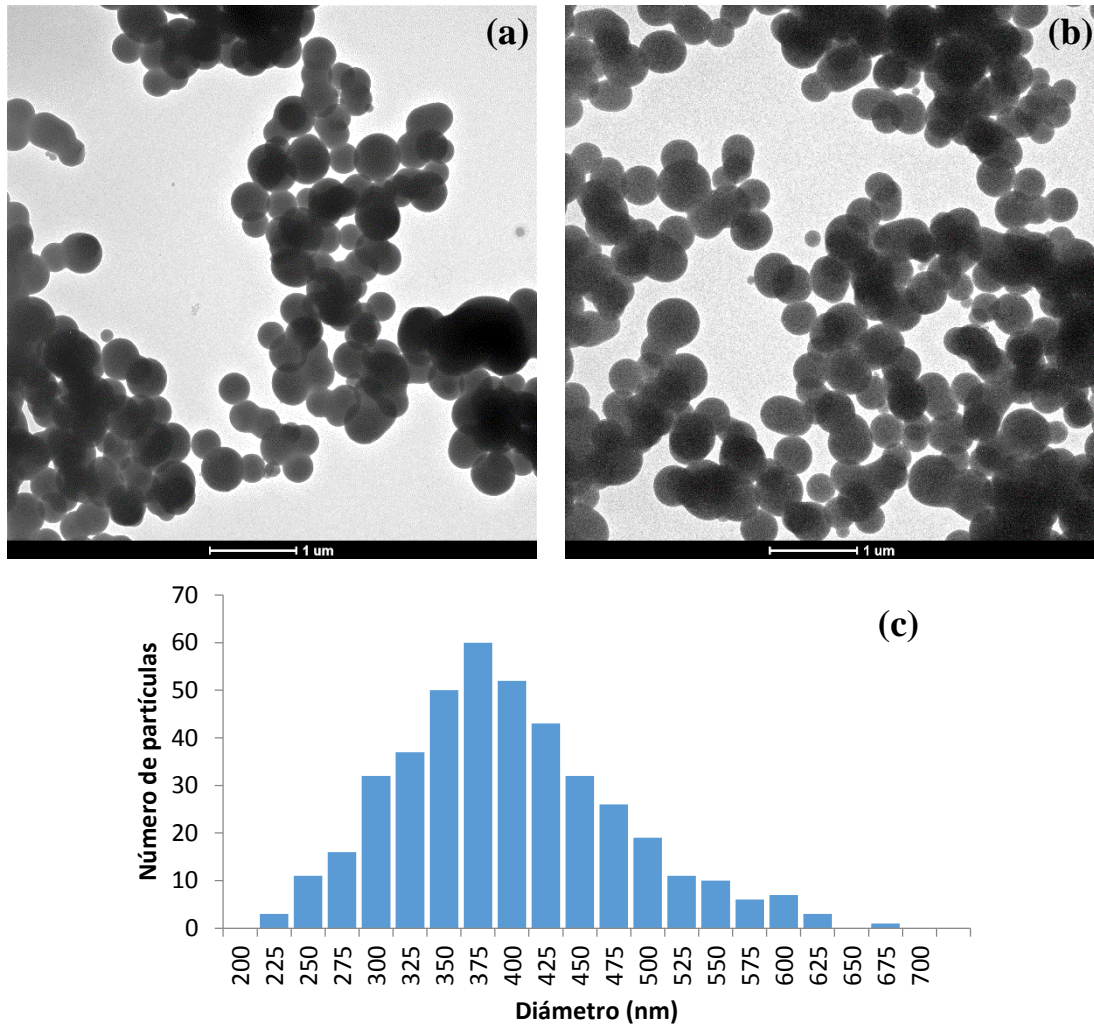


Figura 49. Resultados de TEM. Imágenes del microscopio de las nanopartículas de sílica utilizada para la preparación de nanohíbridos (a – b) con el histograma de los diámetros obtenidos en el ImageJ (c).

A partir de los resultados obtenidos en el histograma (**Figura 49 (c)**) se observa que el tamaño de las nanopartículas de sílica varía entre 225 nm a 625 nm, encontrándose una pequeña población de 675 nm. La mayor cantidad de partículas presentan un diámetro de entre 350 nm a 370 nm, siendo un poco menor al diámetro obtenido mediante la técnica de DLS. Esta variación puede deberse a que en la técnica de DLS, dependiendo del medio en que se realizan las medidas, ocurre la hidratación de las partículas por lo que se obtiene un diámetro hidrodinámico mayor al que se puede obtener mediante microscopía electrónica. Estos datos coinciden con lo observado en la bibliografía (164).

También se tomaron imágenes de TEM de los híbridos generados pero dado a que no se tiñieron las muestras, no se logró observar las proteínas de las VLP unidas a la sílica. De todas formas se pudo verificar que la forma esférica de las nanopartículas de sílica no es afectada cuando se generan los híbridos, tal como se puede observar en la **Figura 50**.

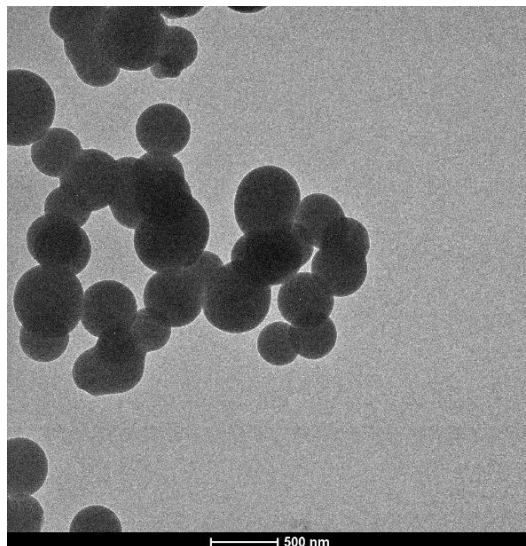


Figura 50. Imagen de TEM de unión sílica-VLP GII-12.
Nanohíbrido preparado por unión covalente, muestra sin teñir.

4.19 Ensayos de citotoxicidad

Se llevaron a cabo experimentos de citotoxicidad, evaluando cada híbrido de la cepa GII-12 por dos métodos diferentes, MTT y cristal violeta, utilizando dos líneas celulares distintas NIH 3T3 y HaCaT. Las concentraciones de muestra utilizadas están comprendidas en el rango van de 1000 μg húmedos/mL hasta 3,90625 μg húmedos/mL, en diluciones seriadas al medio realizadas en medio de cultivo completo.

4.19.1 Línea celular NIH 3T3

En la **Figura 51** se presentan los resultados obtenidos del híbrido por atrapamiento, a través del método de cristal violeta (**Figura 51 (a)**) y MTT (**Figura 51 (b)**). En el caso del cristal violeta, la muestra con mayor concentración de híbrido presentó una viabilidad cercana al 100%. Por ende, se espera que a concentraciones menores la viabilidad no varíe significativamente, que fue lo observado en este caso. Los puntos cercanos a 10 que obtienen por encima del 100% de viabilidad celular, corresponden a 15,625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 7,8125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dando mayor al resto de las concentraciones. En la mayoría de los casos estas variaciones se deben a pequeñas diferencias en la cantidad de células sembradas en cada pocillo, producto de una disgregación parcial de

las células al momento de la tripsinización o a una homogeneización insuficiente al momento de la siembra. Teniendo en cuenta que para el análisis de resultados todos los valores se relativizaron respecto al control de células, estas variaciones son frecuentes en este tipo de ensayos y en general se aceptan, salvo que exista una tendencia al aumento de la viabilidad o que la diferencia supere ampliamente el 100%. Los resultados obtenidos en ambos ensayos indican que dicho híbrido no resultaría tóxico en las concentraciones evaluadas para esta línea celular.

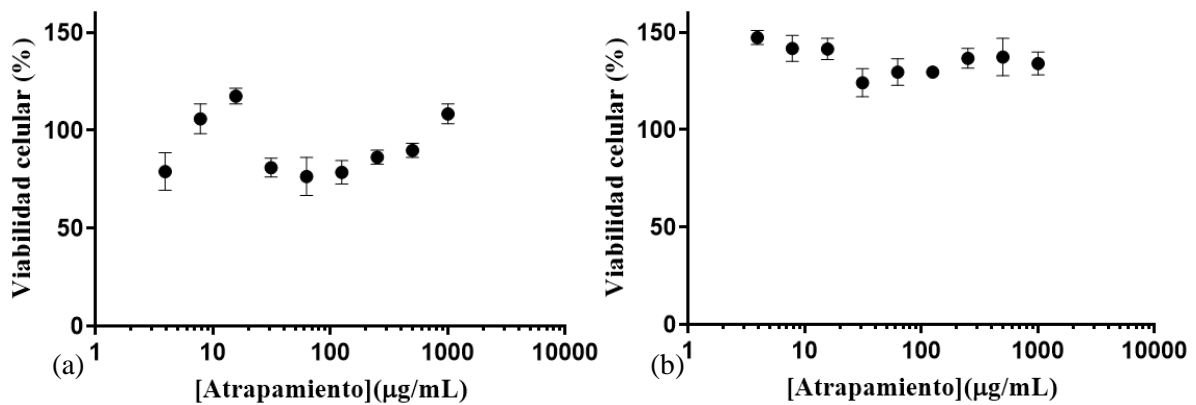


Figura 51. Estudio de la citotoxicidad del híbrido por atrapamiento. En los gráficos se representa el porcentaje de viabilidad en función de la concentración de híbrido expresado en escala logarítmica. Se realizaron dos ensayos: cristal violeta (a) y MTT (b).

Por otra parte, para el híbrido Si12G se observan los resultados obtenidos para el ensayo de cristal violeta (**Figura 52 (a)**) y para el ensayo de MTT (**Figura 52 (b)**). En ambos casos se observa que la mayor concentración del híbrido presenta una viabilidad celular de aproximadamente 100%. En aquellos puntos donde no se observan las barras de error corresponde a que la incertidumbre es muy pequeña y no se aprecia en el gráfico. Ambos resultados obtenidos indican que este híbrido no sería tóxico para esta la línea celular en las concentraciones evaluadas.

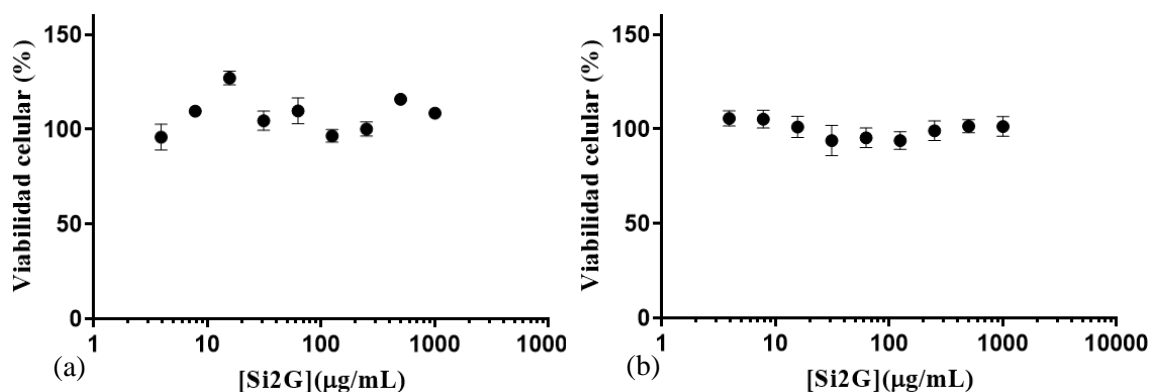


Figura 52. Estudio de la citotoxicidad del híbrido entrecruzado. En los gráficos se representa el porcentaje de viabilidad en función de la concentración de híbrido expresado en escala logarítmica. Se realizaron dos ensayos: cristal violeta (a) y MTT (b).

Los resultados del híbrido SiG12 para el ensayo de cristal violeta (**Figura 53 (a)**), muestran que en todas las concentraciones la viabilidad se mantiene cercana al 100%, exceptuando el valor de viabilidad correspondiente a una concentración de 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que se observa en la cercanía del 50%. Este resultado no es coherente, dado que para la concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la viabilidad es aproximadamente 100 %, lo cual significa que a concentraciones menores la viabilidad debería mantenerse invariable. Este valor, podría deberse a que la concentración de células sembrada en esos pocillos pudo haber sido menor. En cambio, para el ensayo de MTT (**Figura 53 (b)**) se observa que la viabilidad celular en todas las concentraciones testeadas se encuentra alrededor del 100 %. De los resultados obtenidos se desprende que el híbrido por unión covalente no afectaría la viabilidad de la línea celular NIH 3T3, en las concentraciones evaluadas.

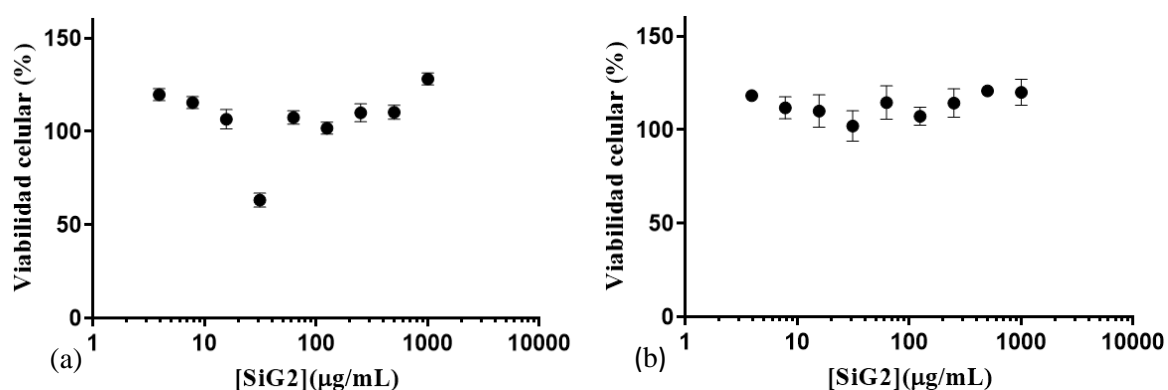


Figura 53. Estudio de la citotoxicidad del híbrido por unión covalente. En los gráficos se representa el porcentaje de viabilidad en función de la concentración de híbrido expresado en escala logarítmica. Se realizaron dos ensayos: cristal violeta (a) y MTT (b).

Además, se realizaron los mismos ensayos para la muestra de nanopartículas de sílica, a fin de determinar si las mismas presentaban toxicidad por sí solas (**Figura 54**). Para el caso del ensayo con cristal violeta (**Figura 54 (a)**) se puede observar como la viabilidad celular se mantiene cercana al 100%. Lo mismo ocurre para el caso del ensayo de MTT (**Figura 54 (b)**), Por lo que, se infiere que las nanopartículas de sílica no presentarían ningún efecto citotóxico intrínseco en las concentraciones evaluadas para la línea celular NIH 3T3.

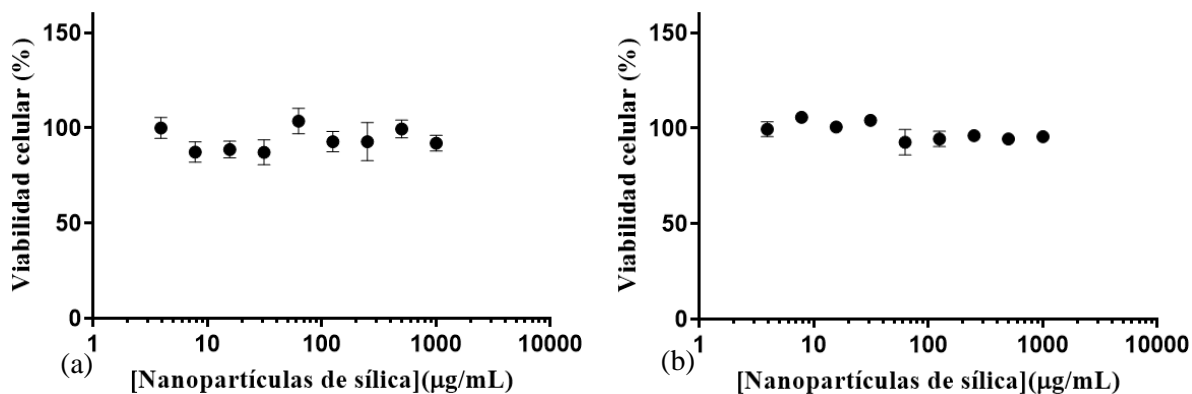


Figura 54. Estudio de la citotoxicidad de las nanopartículas de sílica. En los gráficos se representa el porcentaje de viabilidad en función de la concentración de sílica expresado en escala logarítmica. Se realizaron dos ensayos: cristal violeta (a) y MTT (b).

4.19.2 Línea celular HaCaT

Los resultados de citotoxicidad obtenidos para el híbrido por atrapamiento en la línea celular HaCaT se muestran en la **Figura 55**. Se observa que a través del método de cristal violeta (**Figura 55 (a)**) la viabilidad celular se mantiene alrededor del 100%, aproximadamente, para todas las concentraciones testeadas de dicho híbrido. Mientras que en los resultados obtenidos por el método de MTT (**Figura 55 (b)**) dieron aproximadamente un 100% de viabilidad celular considerando los desvíos correspondientes. Teniendo en cuenta los resultados de ambos métodos se podría concluir que el híbrido por atrapamiento para las concentraciones testeadas no sería citotóxico.

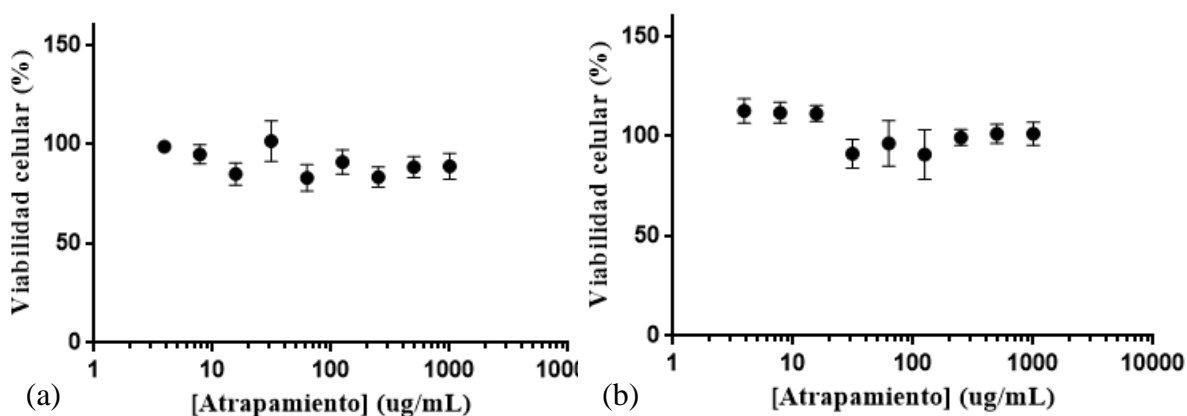


Figura 55. Estudio de la citotoxicidad del híbrido por atrapamiento. En los gráficos se representa el porcentaje de viabilidad en función de la concentración de híbrido expresado en escala logarítmica. Se realizaron dos ensayos: cristal violeta (a) y MTT (b).

En el caso del híbrido Si12G se observó que la viabilidad celular se mantuvo cercana al 100% por ambos métodos (**Figura 56**). A través del método de cristal violeta se observó que a todas las concentraciones evaluadas se obtuvo una viabilidad alrededor del 100%, por lo que el

híbrido Si12G a dichas concentraciones no genera citotoxicidad (**Figura 56 (a)**). Por otro lado, usando el método de MTT se observa que la viabilidad celular da por encima del 100% a casi todas las concentraciones del híbrido, a excepción de la concentración de 31,25 μg de Si12G por mL de *buffer* (**Figura 56 (b)**). La viabilidad celular en dicho punto dio de aproximadamente 75%, pero no resulta coherente teniendo en cuenta lo ocurrido a las diferentes concentraciones testeadas. Dado a que si se obtuvo más del 100% de viabilidad a concentraciones mayores de híbrido no debería de observarse muerte celular a menor concentración. Esto puede deberse a una mala manipulación al momento de sembrado de la placa, como se mencionó anteriormente. De todas formas, los resultados sugieren que por ambos métodos de revelado el híbrido Si12G no parece ser citotóxico a las concentraciones que se utilizaron.

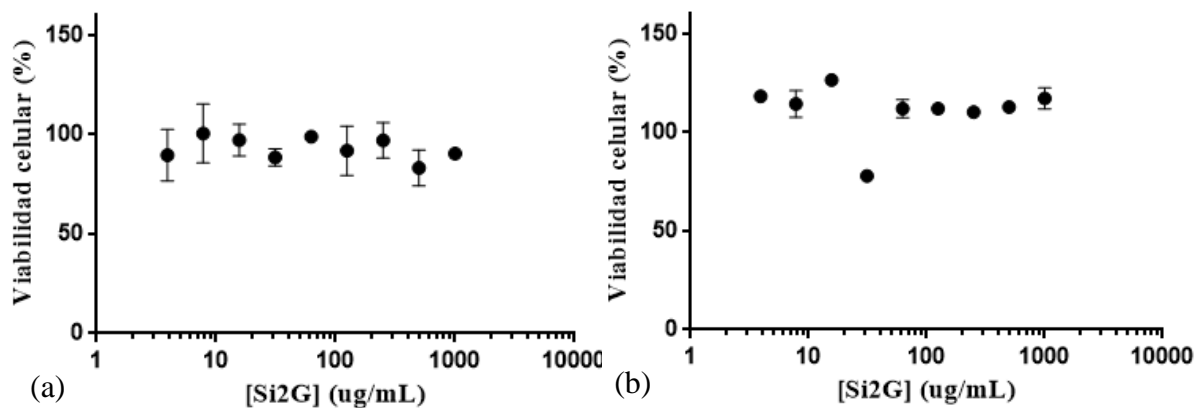


Figura 56. Estudio de la citotoxicidad del híbrido entrecruzado. En los gráficos se representa el porcentaje de viabilidad en función de la concentración de híbrido expresado en escala logarítmica. Se realizaron dos ensayos: cristal violeta (a) y MTT (b).

Para el caso del híbrido SiG12, los resultados de los ensayos de citotoxicidad se muestran en la **Figura 57**. Tanto para el revelado por el método de cristal violeta como por el método de MTT, se obtuvo una viabilidad celular cercana al 100% para todas las concentraciones testeadas de SiG12 con un porcentaje de error muy bajo. Por lo que estos resultados sugieren que dicho híbrido no sería citotóxico para la línea celular HaCaT.

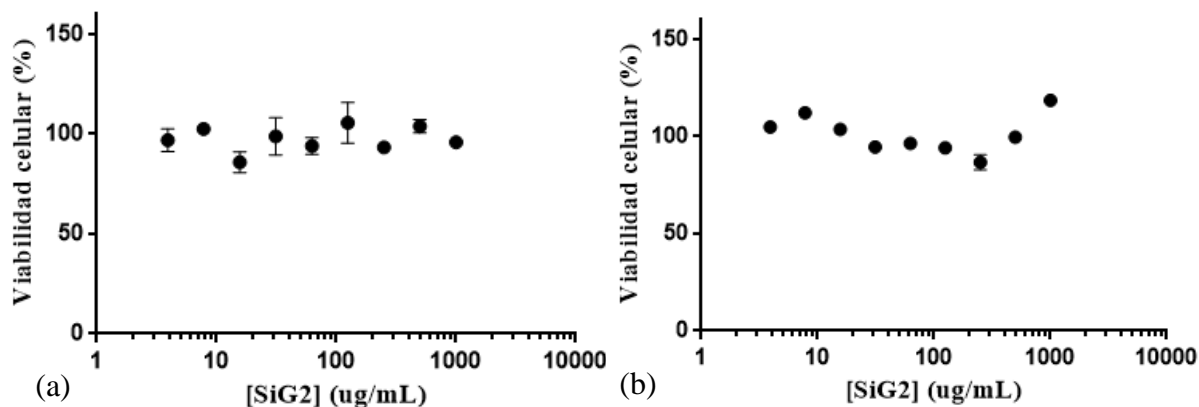


Figura 57. Estudio de la citotoxicidad del híbrido por unión covalente. En los gráficos se representa el porcentaje de viabilidad en función de la concentración de híbrido expresado en escala logarítmica. Se realizaron dos ensayos: cristal violeta (a) y MTT (b).

Por último, se evaluó si las nanopartículas de sílica generaban una respuesta tóxica en las células (**Figura 58**). Se obtuvo una viabilidad celular aproximadamente del 100% para todas las concentraciones de nanopartículas de sílica testeadas por ambos métodos. Esto sugiere que este material no sería citotóxico para la línea celular HaCaT.

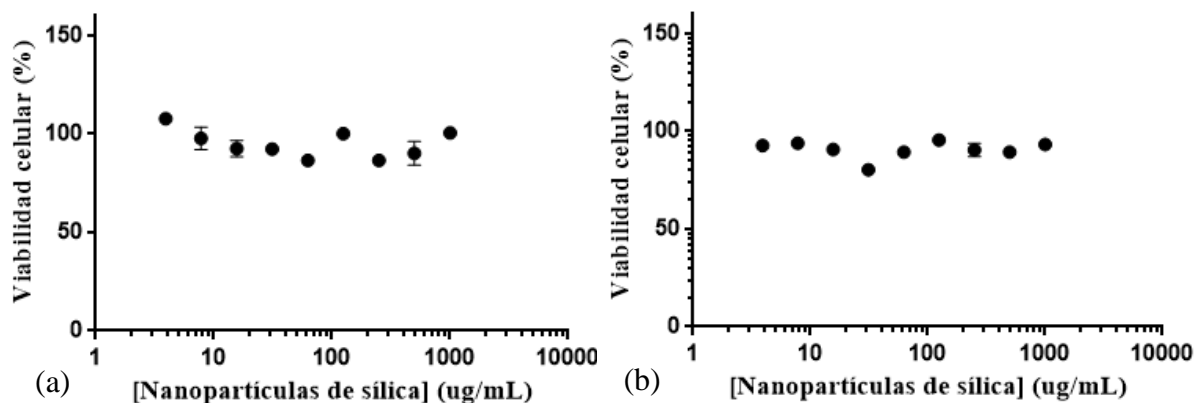


Figura 58. Estudio de la citotoxicidad de las nanopartículas de sílica. En los gráficos se representa el porcentaje de viabilidad en función de la concentración de sílica expresado en escala logarítmica. Se realizaron dos ensayos: cristal violeta (a) y MTT (b).

Los materiales nanohíbridos consisten en la fusión de distintos materiales que permiten obtener nuevas propiedades beneficiosas para aplicaciones biomédicas, tales como *delivery* de drogas. Debido a que es un campo de investigación en auge, se buscó generar nanohíbridos basados en VLP combinados con materiales inorgánicos. En la primera parte del trabajo se utilizaron los metales oro y plata como *cores* de las VLP del virus BMV con el objetivo de comprender el mecanismo de encapsulación para en un futuro adicionar fármacos con distintos fines. Mientras que, en la segunda parte del trabajo, se utilizaron nanopartículas de sílica biomimética y VLP de distintas cepas de Norovirus para generar nanohíbridos, analizando las propiedades que dicha combinación puede conferir.

5.1 Formación de VLP con *core* de oro.

En una primera instancia se estudió la encapsulación de GNP de 12 nm, mediante la utilización de proteínas de cápside viral de BMV, logrando una exitosa formación de VLP *single core*. Al obtener dichas VLP se procedió a comparar su tamaño con el virus BMV, para determinar si el *core* afectaba la conformación tridimensional de la cápside viral. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre dichas muestras, por lo que podemos concluir que el oro no estaría interfiriendo en el proceso de autoensamblaje natural que ocurre con la proteína que constituye a la VLP de BMV. Posteriormente, se procedió a la formación de VLP *multi core* con GNP de 3,18 nm, la cual no tuvo éxito debido a que las GNP aumentaron su tamaño a 9 nm. Dado que con GNP de 12 nm se obtienen VLP *single core*, no es esperable que con las GNP que aumentaron de tamaño se logre formar VLP *multi core*, ya que no hay suficiente espacio interno en la VLP para que esto ocurra. Las GNP podrían haber sufrido un cambio en su tamaño durante el procedimiento de su síntesis, dado que fueron necesarias varias etapas de centrifugación para concentrarlas, tal vez como sólo se realizó un único lavado no pudo extraerse completamente la sal de oro sobrante después de la síntesis. Por lo que, esa pequeña concentración de sales pudo haber generado el crecimiento de las GNP. Para solucionar este inconveniente se podría realizar una etapa de diálisis para remover la sal de oro de la solución, dado que se observó pérdida de muestra al realizar más etapas de lavado. Otra razón por la que pudo deberse este aumento de tamaño es el fenómeno de maduración Ostwald que se observa en soluciones coloidales, el cual describe el crecimiento de las partículas de mayor tamaño a través de las partículas de menor tamaño. Estas últimas son inestables, por lo que para alcanzar un estado termodinámicamente estable se disuelven y se unen a la superficie de las partículas de mayor tamaño (**Figura 59**).

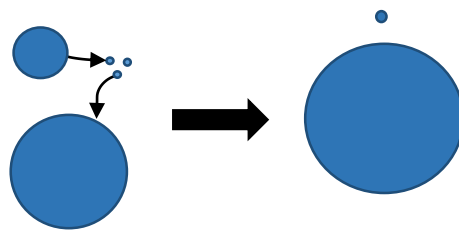


Figura 59. Fenómeno de maduración de Ostwald. Partículas de menor estabilidad se disocian originando partículas pequeñas que generan el crecimiento de partículas de mayor tamaño.

5.2 Formación de VLP con *core* de plata.

En principio se procedió a sintetizar SNP de un diámetro de 17 nm, aproximadamente, lo cual no fue posible debido a que se obtuvo un rango de tamaños que van de 1 nm a 24 nm. La muestra no fue homogénea, obteniéndose en mayor proporción SNP con un diámetro de 5,71 nm. La producción de VLP no se pudo llevar a cabo dado que las nanopartículas sintetizadas presentaron una distribución de tamaño heterogénea, no uniformes y de poca estabilidad, ya que las mismas se agregaron a las 24 horas aumentando aún más su tamaño. Para este caso sería necesario encontrar otro procedimiento de síntesis de SNP que nos permita la obtención de una muestra homogénea y estable. Posteriormente, se procedió a la generación de VLP *multi core* con SNP de 4,1 nm de diámetro, la cual fue realizada utilizando dos ligandos distintos: PEG3 y PEG4, los cuales presentan un grupo etilenglicol de diferencia. Los resultados muestran que la encapsulación de varias SNP dentro de una VLP fue exitosa solo para PEG4 condición 1:20. Al observarse las VLP *multi core* por TEM sin teñir (**Figura 39 (a)**) se pudo contemplar un halo gris esfumado rodeando las SNP en el interior de las VLP. Debido que la muestra no fue teñida sabemos que dicho halo no puede estar formado por proteínas ni por ligando, por ende, suponemos que ese halo estaría compuesto por pequeños átomos de plata. Los mismos podrían ser puntos de nucleación para la posterior formación de nanopartículas o como estabilizadores para la formación de VLP neutralizando las cargas de cada SNP dentro de la VLP. Para determinar si esto es posible serían necesarios más estudios, como por ejemplo la espectrofotometría UV donde se esperaría observar un pico diferente al pico de las SNP de 4,1 nm. Estudios posteriores fueron realizados por la Dra. Irina Tsvetkova que confirmaron la presencia de pequeños *clusters* de iones de plata. El interés del hallazgo tiene importancia para el estudio del mecanismo de formación de las VLP *multi core* para su uso como sistema de *delivery* de drogas. Por ejemplo, más específicamente se podría usar el cisplatino, que es una droga utilizada para quimioterapia que se entrecruza con el ADN *in vivo* desencadenando la apoptosis. El problema con esta droga es que no es selectiva, afectando a todas las células del organismo y no específicamente a las cancerígenas. Por lo que, si la formación de VLP *multi core* puede ocurrir solamente con los *clusters* de átomos se podría utilizar el cisplatino para simular la acción de estos *clusters* formando así las VLP. Además, se podría combinar la propiedad de tropismo tisular de los virus para generar un sistema de *delivery* de drogas selectivo basado en VLP para atacar específicamente células tumorales.

5.3 Proceso de desensamblado del virus BMV

La cápside de BMV es muy estable a *buffer* con fuerza iónica baja o media y a pH menor a 5, pero experimenta una profunda transición estructural cuando el pH se eleva de 5 a 7. El proceso de desensamblaje del virus comienza con este “hinchándose” entre un pH de 6 a 7, donde pasa de tener un diámetro de 32 nm a un diámetro máximo de casi 35 nm. Dicho proceso ocurre en dos etapas, el primer paso es una transición pH-inducida que es reversible, el cual se lleva a cabo aproximadamente a un pH 6,5. Se cree que en dichas condiciones ocurre la desprotonación de grupos carboxilos de subunidades adyacentes, probablemente los glutamatos 84 y 131, los cuales median el proceso. El segundo paso es una expansión térmica irreversible acompañada por cambios en la conformación del ARN que pueden ser detectados ópticamente a través de sondas fluorescentes. En presencia de Mg^{2+} , el cual ayuda a la cápside a pH cercanos a la neutralidad, la expansión reversible ocurre sin disociación. Sin embargo, si el Mg^{2+} estabiliza la estructura del ARN, la estructura de la cápside o la interacción entre estas dos, no está claro. Los cambios conformacionales del ARN también podrían ser consecuencia de que se “hincha” la cápside. Luego, a un pH de 7,5 o mayor y a una fuerza iónica mayor a 0,5 M, la cápside se disocia y el ARN viral precipita. Al restablecerse las condiciones de baja fuerza iónica y pH, la re-asociación de la cápside ocurre (213). Por lo que BMV puede ser desensamblado y re-ensamblado *in vitro* a través de la variación del pH y la fuerza iónica.

Teniendo en cuenta estos datos reportados por bibliografía, los resultados obtenidos fueron los esperados, dado a que la fluorescencia iba aumentando a medida que el pH aumenta por el desensamblado paulatino del virus. Este ensayo fue realizado con el fin de utilizar un fluoróforo distinto al SO, que pudiera tener la misma o mejor sensibilidad pero con el beneficio de presentar menos *background*, dado que el SO presenta un *background* significativo pudiendo afectar las medidas. El ensayo de SO es potencialmente sensible a cambios conformacionales de la cápside de BMV por “hinchamiento” del virus. Mientras que, en los resultados con SR se logra observar un pequeño cambio en la fluorescencia a diferentes pH, pero hay un desplazamiento de la posición del pico de fluorescencia que necesita mayor estudio. Para los resultados de SO se observa un pico en el rango de 700 nm a 750 nm, que no corresponde al proceso de “hinchamiento” del virus, ya que el pico de fluorescencia de desnaturalización de la proteína se observa a los 600 nm aproximadamente. Por lo que, este último pico se cree que pudiera deberse al *scattering*, dado que aparece en todas las muestras. Además, esta reportado que a los 250 nm existe un pico de *scattering* que en este resultado no puede observarse (220), dado que se grafica a partir de los 400 nm. Los resultados obtenidos son muy preliminares, por lo que se requiere la repetición del experimento para lograr su reproducibilidad. En un futuro se podrían realizar experimentos con un cambio de pH gradual permitiendo demostrar la heterogeneidad en la población de virus y testear las muestras de nanohíbridos basados en VLP.

5.4 Unión de VLP cepa GII-4 a nanopartículas de sílica

La unión de VLP GII-4 a nanopartículas de sílica fue del 50% para el nanohíbrido por unión covalente SiG4, mientras que se obtuvo un 27% para los híbridos generados por adsorción y

entrecruzamiento, Si4 y Si4G, respectivamente. La diferencia observada pudo deberse a que el glutaraldehído unido a la sílica favorece la unión a los amino terminales de las VLP. Además, como se genera una unión covalente permite que no ocurra desorción de las proteínas tan fácilmente porque es un enlace mucho más fuerte que la adsorción.

Luego, se realizó una electroforesis SDS-PAGE para verificar que las VLP se hayan unido a la sílica como también para poder observar si ocurre la desorción de dicha unión. Una de las observaciones más destacadas fue que en el carril que se sembró el sobrenadante de SiG4 se obtuvo una banda correspondiente a VP1 solamente, por lo que se puede suponer que se unió gran parte de la BSA a la sílica. Estos resultados fueron coherentes con los obtenidos para la desorción de dicho híbrido, ya que se observó una banda correspondiente a la BSA pero no a VP1. Por lo que sugiere que una baja proporción de VP1 se unió a la sílica. Sin embargo, no se puede descartar que una pequeña porción de dicha proteína se haya unido también y no se haya desorbido, o que se encuentre tan diluída que no es posible observarla en el gel. Por otro lado, también se observó que la desorción de Si4G no muestra banda alguna, por lo que se puede concluir que el entrecruzamiento con glutaraldehído permite que la proteína quede atrapada y no se desprenda de la sílica.

5.5 Estudios de estabilidad de híbridos sílica - VLP cepa GII-4.

Las pruebas de estabilidad para los híbridos con VLP GII-4 se realizaron a modo de familiarizarse con la técnica DSF, dado que en el laboratorio no se tenía experiencia con dicha técnica. Los resultados obtenidos no fueron claros, ya que dieron muy poco reproducibles. Sin embargo, a partir de las pruebas que se realizaron con los híbridos de VLP GII-4 se decidió tener en cuenta diferentes parámetros para las siguientes evaluaciones de DSF con VLP GII-12. Por ejemplo, normalizar la cantidad de proteína tanto en los híbridos como en la muestra soluble cuando se realizan los experimentos. Además, se tuvo en cuenta el tratar de optimizar la unión de las VLP a la sílica para minimizar la posible exposición de espacios libres de sílica al fluoróforo SO. De esta forma se evita que este último no se una a la sílica y no interfiera con el estudio.

5.6 Capacidad de carga de la cepa GII-12 de Norovirus

A partir de los resultados obtenidos para el caso de SiG12, unido covalentemente, se observa que a los treinta minutos se da el mayor porcentaje de unión. Para el caso de Si12, el híbrido por adsorción, el mayor porcentaje de unión también se da a la media hora y luego disminuye. Esta disminución se debe a que ocurre un equilibrio de unión - desorción, por ende varía a cada momento la concentración de proteína unida a la sílica. Se concluyó de dichos experimentos que ocurre una unión rápida con máximos de carga de entre 9,7 a 12 mg de GII-12 por gramo de sílica, valores obtenidos a partir de los porcentajes de unión determinados y las muestras aplicadas de VLP y de nanopartículas de sílica.

En los resultados obtenidos de la electroforesis se observa que para Si12 hay una banda en el sobrenadante indicando que parte de la proteína no se unió a la sílica, la misma corresponde a la proteína BSA. Sin embargo, en la muestra de desorción de Si12G no se observa ninguna banda, por lo que parecería que la malla de glutaraldehído favorece esta unión y no permite la liberación de proteínas. Mientras que donde se sembró el híbrido Si12 se observó una tenue banda correspondiente a VP1, indicando que una parte de las VLP unidas se desorbieron. Para el caso de SiG12 no se observa banda en el sobrenadante, pero aparecen bandas en la muestra de desorción al igual que para Si12, siendo esta última bastante intensa pero en menor proporción a la banda del aplicado. Esto podría darnos indicios de que el híbrido por adsorción y posteriormente entrecruzado (Si12G) le podría brindar una unión más fuerte entre la sílica y las VLP en comparación al resto de los híbridos evaluados en dicho ensayo.

En todos los geles realizados se produjo la aparición de una banda entre los 63 kDa y 75 kDa del marcador de peso molecular que no debería aparecer. La misma se logra visualizar sólo cuando se lleva a cabo la tinción de plata, dado que con la tinción de *Coomassie Brilliant Blue* la misma no se observa.

5.7 Estudios de estabilidad de híbridos sílica-VLP cepa GII-12.

Para los estudios de estabilidad se tuvo en cuenta que la concentración de proteína fuera igual tanto para las VLP de GII-12 solubles como para los híbridos, permitiendo así tener resultados comparables entre sí. Dado que el fluoróforo se une a la sílica, se tomó la precaución de optimizar la unión de las VLP para minimizar aquellos espacios de las nanopartículas que pudieran quedar libres. En el caso de las muestras con VLP se observan varios picos de fluorescencia a las temperaturas de: 46-47 °C, 58 °C, 65-67 °C y 82 °C. Esta reportado que la proteína que conforma la cápside viral, VP1, presenta un número considerable de residuos aromáticos, de aproximadamente 44 aminoácidos entre fenilalanina, tirosina y triptófano. Por ende, las pequeñas variaciones en el microambiente de dichos residuos inducen cambios en sus características espectrales, permitiendo monitorear la estabilidad de la estructura terciaria. Más específicamente, los cambios de temperatura inducen alteraciones en los residuos aromáticos mostrando una transición térmica entre los 55 a 60 °C (215). Por lo que, el pico de fluorescencia a los 58 °C cae dentro del rango reportado donde ocurre la desnaturalización de las VLP. Para el análisis del resto de los picos, es necesario tener en cuenta que la muestra de VLP estaba contaminada con BSA. Esto significa que, en el proceso de desnaturalización al que fue sometida la muestra, ambas proteínas se desnaturalizaron. Está reportado que la temperatura de desnaturalización de la BSA es a los 65 °C (214), por lo que el pico observado en el rango de 65-67 °C correspondería a dicha proteína. Además, fue reportado que VP1 presenta dos dominios, el S y el P, donde el S se encarga del ensamblado de la cápside viral y el dominio P se encarga de la formación de dímeros (221). Es por esto que el pico entre los 46-47 °C, al estar cercano a la temperatura de desnaturalización, podría ser de dímeros de VP1 que se están desnaturalizando, siendo la razón por la cual el pico no es tan pronunciado como el que aparece a los 58 °C. Por otra parte, esta reportado que a pH 4-6 aumentando la temperatura se obtiene que los residuos aromáticos están menos expuestos al solvente, variación correlacionada a la agregación de VLP de Norovirus observada en dichas condiciones (215). En este experimento se trabajó a pH 5, por lo que el pico que se observa a los 82 °C podría ser de VLP agregadas,

en donde se corre la temperatura de desnaturalización, por lo que dicho fenómeno va ocurriendo paulatinamente porque están mínimamente agregadas. Dichos pequeños agregados desnaturalizados, al aumentar la temperatura se podrían ir agregando haciendo que la fluorescencia se vaya perdiendo y por eso vemos que disminuye.

Para el caso de los híbridos no se puede apreciar una fluorescencia significativa como en el caso de las VLP. Esto podría deberse a que el fluoróforo no puede acceder a las zonas hidrofóbicas de las proteínas por la unión, como ser en el caso del entrecruzamiento con glutaraldehído donde las proteínas están recubiertas por una red de dicho reactivo. En el híbrido por unión covalente, donde las proteínas están expuestas al medio, se observa un pico de fluorescencia a los 34 °C que va disminuyendo hasta los 50 °C. Lo curioso de este resultado, es que para el híbrido por adsorción que presenta menor estabilidad, con respecto al de unión covalente, y las proteínas están superficiales, no se observa pico alguno. Podría deberse a que, las VLP estaban agregadas al momento de efectuar la unión haciendo que las mismas sean más estables que estando en solución, por lo que al unir estos agregados pudieran aumentar su grado de estabilidad térmica aún más. Es esperable que el proceso de unión les confiera una mayor estabilidad tridimensional a las proteínas, siendo una ventaja frente a la utilización de las mismas en solución, pero no es real la carencia alguna de fluorescencia en todos los híbridos. La falta de fluorescencia podría deberse a que, el fluoróforo utilizado disminuye su fluorescencia cuando las proteínas están agregadas. Por esta razón, se debería estudiar otras condiciones para la realización de dicha técnica que permita obtener resultados más acordes a lo que sucede realmente.

Además de la técnica de DSF, la estabilidad de los híbridos podría ser evaluada mediante la técnica de *nanoindentation*. La misma consiste en un *tip* extremadamente filoso unido al extremo de un soporte flexible, en una posición que presenta una precisión por debajo de 1 nm. La distancia entre el *tip* y la muestra es controlada por la aplicación de voltaje a un cristal eléctrico, que se expande o contrae. Mientras ocurre el contacto del *tip* con la muestra, un láser diodo refleja los movimientos del soporte flexible a un sensor. Esto nos permite observar la resistencia mecánica de las muestras a la deformación por la aplicación de una fuerza mecánica externa. En la **Figura 60** se observa de forma esquemática en que consiste el experimento (222).

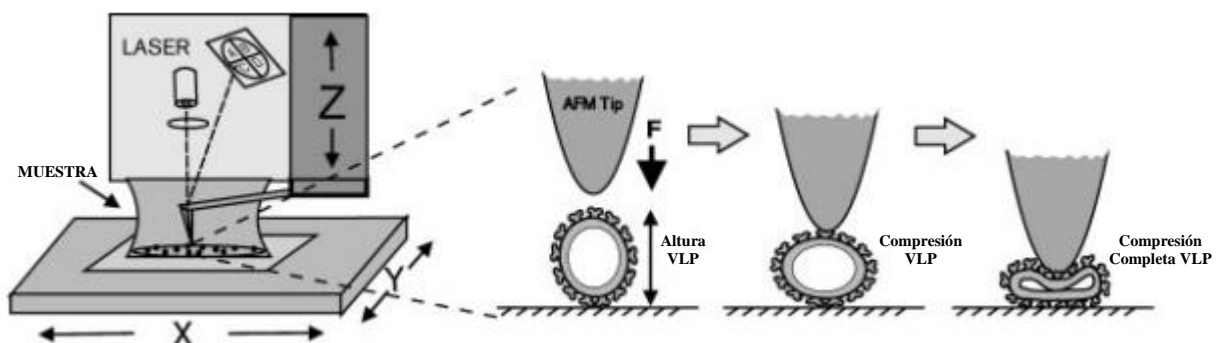


Figura 60. Esquema del experimento de *nanoindentation*. En donde se presionan las VLP con un tip para obtener parámetros de su resistencia. Extraído del artículo: *Size and mechanical stability of norovirus capsids depend on pH: a nanoindentation study* (222).

Por último, se podría evaluar los híbridos a diferentes pH para obtener información acerca de la estabilidad a otras condiciones. Esta información es esencial si en un futuro se desea aplicar estos materiales en el campo de *delivery* de drogas.

5.8 Híbridos por atrapamiento con VLP cepa GII-12

Se realizaron los híbridos previamente mencionados para la DLS y se agregó un híbrido por atrapamiento. Esta última muestra, se decidió añadir por el hecho de que esta reportado que aquellas proteínas que exhiban la capacidad de autoensamblarse pueden constituir un *template* para la formación de sílica. Las interacciones asociadas a la sílica con cápsides virales han sido descritas por varios autores mediante la afinidad de los precursores de sílica con los componentes externos de los virones. Por esta razón, al realizar la síntesis no se agregó el reactivo PEI para determinar si la cepa GII-12 era capaz de catalizar la síntesis de sílica. Lamentablemente esto no ocurrió, por lo que fue necesario agregar dicho reactivo para llevar a cabo la formación de sílica. Esto podría deberse a que el virus no tiene la capacidad de catalizar dicha reacción o a la baja concentración en la que se encuentra siendo muy difícil que pueda llevar a cabo la catálisis. Por lo que en estudios futuros se debería realizar dicho experimento con una muestra más concentrada (13).

El inconveniente que tuvo el híbrido por atrapamiento es que no se logró determinar la concentración proteica que fue unida. Esto es debido a que al realizar el experimento de BCA, hubo una interferencia del sobrenadante de la unión por esta técnica con algún reactivo de dicha técnica, dando una coloración azulada bastante atípica. El resultado fue observado por varios colegas en el laboratorio que trabajan con atrapamiento, deduciendo que es el excedente del reactivo PEI que queda luego de la unión, el que genera la interferencia con algún reactivo del BCA. Por dicha razón se recurrió a realizar una electroforesis SDS PAGE de los sobrenadantes de las muestras para verificar si se logró unir o no VLP. Según los resultados obtenidos, la unión fue exitosa.

5.9 DLS

Los resultados obtenidos para la muestra de VLP cepa GII-12 no fueron los esperados, debido a que dependiendo de la cepa, el diámetro de Norovirus fluctúa entre 27 nm a 40 nm, aproximadamente. En nuestro caso, el diámetro hidrodinámico fue de 1739 nm con un desvío estándar muy alto de 1004 nm. Se reportó que las VLP de Norovirus expresadas en *Pichia pastoris*, que fueron caracterizadas por TEM y DLS en medio de cultivo, tenían diámetros que varían entre 40 nm a 100 nm por ambas técnicas. Destacándose que por DLS se obtuvo un diámetro hidrodinámico de 40 nm, en muestras liofilizadas y posteriormente resuspendidas en medio de cultivo, siendo este el más cercano al valor real del virus (217). Además, en otro artículo se reportó que la cepa GI-1 en agua presenta un diámetro hidrodinámico de 60 nm, mientras que para la cepa GII-4 el diámetro es de 50 nm, aproximadamente (218). Por otra parte, usando como medio un solvente con 40 % de sacarosa permite obtener un diámetro

hidrodinámico de Norovirus de aproximadamente 36,8 nm (219). Teniendo en cuenta lo visto en la bibliografía, se podría esperar un valor de diámetro mayor dado que las proteínas son hidratadas causando que las medidas por DLS sean mayores a las obtenidas por TEM. Debido a que la muestra está contaminada con BSA se realizó una búsqueda bibliográfica para determinar el diámetro hidrodinámico de la misma, obteniéndose que varía entre 6 nm a 8 nm en *buffer* Tris-HCl pH 7,4 (223). Sin embargo, los valores obtenidos para la muestra de VLP GII-12 contaminada con BSA son extremadamente altos para los valores reportados, por lo que suponemos que la muestra se encontraba agregada. Por otra parte, valores altos de PDI indican que las nanopartículas generadas en el sistema presentan baja homogeneidad en la distribución de tamaño. En este caso, el valor de PDI es más cercano a 0 que a 1, indicando que la muestra es bastante homogénea y el potencial zeta da un poco menor a 30 mV por lo que podría mostrar indicios de agregación. Esto se debe a que los valores de potencial zeta recomendados para una suspensión coloidal deben ser mayores a 30 mV, dado que este parámetro indica la estabilidad potencial del sistema coloidal en estudio. Si todas las partículas en suspensión presentan un potencial zeta grande, ya sea positivo o negativo, van a tender a repelerse entre sí, por ende las mismas no se van a agregar. Sin embargo, si las partículas presentan un valor bajo de potencial zeta no hay fuerza que impida la agregación de las mismas (216).

En el caso de las nanopartículas de sílica, el diámetro hidrodinámico obtenido es de 838 nm con un desvío estándar de 239 nm. Se buscó en bibliografía reportes de DLS realizado a nanopartículas de sílica con *core* de BSA para comparar, encontrándose un artículo donde obtuvieron un diámetro hidrodinámico de 374,4 nm con un desvío estándar de 36,4 nm. La diferencia en el tamaño obtenido con el reportado puede deberse a la preparación de la muestra, dado que en el artículo las nanopartículas fueron liofilizadas y posteriormente resuspendidas en PBS, mientras que en el presente trabajo no fueron liofilizadas y se resuspendieron en agua destilada (164). El valor de PDI indica que las nanopartículas de sílica son homogéneas, mientras que el potencial zeta dio negativo. Este último resultado no es factible dado que sabemos por datos reportados que el potencial zeta de las nanopartículas de sílica es positivo. Esto se debe a que se utiliza el reactivo PEI para la formación de nanopartículas de sílica, el cual le confiere carga positiva a las mismas. Por lo que, debería repetirse el experimento buscando las condiciones óptimas para realizar dicha técnica.

Para los diferentes híbridos, se obtuvieron diámetros hidrodinámicos mayores al obtenido para las nanopartículas de sílica, lo cual es esperable dado que se está uniendo proteínas en dichas partículas. Pero, comparándolos con el diámetro hidrodinámico de las VLP son menores, por lo que podemos constatar que los datos obtenidos para las VLP no son muy confiables. Es por esta razón que decidimos comparar con los datos de diámetro hidrodinámico reportados para nuestras VLP. Debido a que los híbridos son aproximadamente 30 veces más grandes en comparación al diámetro de la VLP, lo unido sería uno o varios agregados de VLP unidos a la sílica. En el caso de los híbridos que utilizan glutaraldehído, unión covalente y entrecruzamiento, podría existir una interacción simultánea de una VLP con más de una nanopartícula de sílica a través del glutaraldehído. Para el caso de la unión covalente, se debe a que dicho reactivo reacciona con el amino terminal dado que a pH 7 es el único que está ionizado, ya que su pKa se encuentra a 7,2, mientras que los aminos secundarios,

correspondientes a las lisinas, no están ionizados porque su pKa es cercano a 10,6. A diferencia del entrecruzamiento donde el glutaraldehído no sólo reacciona con los aminos terminales. Es por esta razón que pueden haberse formado uniones con las VLP mediante los múltiples aminos primarios ionizados o con otros aminos, esto último sólo para entrecruzamiento, ya sea que el glutaraldehído forme una malla por fuera o este funcionalizado directamente sobre la nanopartícula de sílica. En este último caso se consideraría que la superficie de la nanopartícula de sílica no esté completamente cubierta por VLP, dado que la concentración era muy baja. En ambos híbridos, si esto ocurre, se esperaría la formación de agregados y por eso se observa una población cuyo diámetro hidrodinámico es superior al resto. Es por estas razones que las condiciones de trabajo para dichas estrategias de unión no son óptimas para la obtención de nanohíbridos utilizando VLP. Los resultados para el entrecruzamiento fueron los esperados, ya que debido a que la malla de glutaraldehído externa tiende a comprimir lo que contiene, el diámetro hidrodinámico de este híbrido debería ser el menor comparado a los otros.

El diámetro hidrodinámico resultante para el híbrido por atrapamiento fue de 1677 nm, siendo el mayor comparado al resto y con un desvío estándar de 381 nm. Teniendo en cuenta que la muestra de VLP pareciera estar agregada, al momento de la formación de la malla de nanopartículas de sílica alrededor de las VLP agregadas va a implicar una superficie mayor, por ende el diámetro hidrodinámico va a resultar mayor. Por otra parte, para el híbrido por adsorción puede haber sucedido lo mismo que con el híbrido mencionado anteriormente. Es por esta razón que el diámetro hidrodinámico determinado es más grande de lo esperado.

Para todos los híbridos los valores de PdI fueron cercanos a cero, indicando que las muestras son homogéneas. Mientras que para el potencial zeta todos los valores obtenidos fueron mayores a 30 mV, indicando que las muestras están en suspensión y no dan indicios de agregación. Debido a que la unión no genera formas esféricas puede ocurrir que se sobreestime el diámetro hidrodinámico, por ende se debería realizar otro experimento, como ser TEM, para afirmar estos resultados. Además, es recomendable a futuro realizar estudios exhaustivos acerca de las condiciones de trabajo, buscando que las mismas eviten la agregación de los híbridos.

5.10 Imágenes de TEM

Debido a que se encontró en bibliografía que los valores de diámetro obtenidos por DLS son, dependiendo del medio en el que se midan, significativamente mayor a los obtenidos a TEM, se procedió a utilizar dicha técnica a modo comparativo. La mayor proporción de nanopartículas de sílica presenta un diámetro dentro del rango 350 nm a 370 nm, a diferencia del promedio obtenido en el DLS donde el diámetro hidrodinámico era de 838 nm. Dicha variación entre las técnicas se debe a que al realizar la DLS las nanopartículas de sílica se hidratan aumentando su diámetro hidrodinámico. Se observó en bibliografía que para nanopartículas de sílica con *core* de BSA, mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido los diámetros obtenidos rondan aproximadamente los 300 nm (164). Dichos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo, los cuales son de gran utilidad para el experimento de citotoxicidad ya que sabemos que las nanopartículas al ser menores de 500 nm de diámetro van a poder ingresar a las células

a través del proceso de endocitosis brindándonos más datos sobre su posible aplicación como sistema de *delivery* de drogas. En el caso de que estos nanohíbridos presenten un tamaño mayor a 500 nm se ha reportado que generalmente ocurre el proceso de fagocitosis para ingresar material a las células (203, 224). Dicha técnica nos permitió corroborar que las nanopartículas de sílica sintetizadas tenían una forma esférica homogénea. Por lo que se descarta que el motivo de la variación del diámetro por DLS con lo reportado se debiera a que su forma no fuera esférica sobreestimando su diámetro real.

5.11 Citotoxicidad

La mayoría de los experimentos realizados *in vitro* son utilizados para determinar la potencial citotoxicidad de la muestra a testear. Debido al potencial uso, de los híbridos generados, como sistemas de *delivery* de drogas es necesario demostrar que no son tóxicos. Gran parte de los productos, como ser nuevas drogas, deben pasar por ensayos de citotoxicidad extensos antes de ser liberados para su uso público. Estos experimentos, muchas veces, involucran la utilización de un alto número de animales, cuyas legislaciones limitan su uso. Por lo tanto, existe mucha presión humana, económica y ética en la utilización de animales, generando que parte de los experimentos de citotoxicidad se realicen *in vitro*. En particular los ensayos que se realizan en placas multipocillo permiten la evaluación de diversas condiciones en forma simultánea, por lo que resultan más económicos. Sumado a esto, la microtitulación permite la evaluación simultánea de un gran número de condiciones y empleando relativamente poca cantidad de muestra a testear. Las microtitulaciones más utilizadas se realizan en placas de 96 pocillos, como se utilizó en los ensayos de citotoxicidad del presente trabajo. La población de células se expone al agente en estudio y para determinar la viabilidad celular, generalmente, se utiliza la medición de un parámetro metabólico (225). Es de suma importancia el uso de diferentes métodos para determinar la viabilidad celular de las muestras, dado que dependiendo del mecanismo por el cual sea tóxico un compuesto, puede que un método sea más sensible que otro para detectarlo. Además, está reportado que ensayos como el de MTT que depende de reacciones enzimáticas puede ser afectado por inhibidores de enzimas. Por lo que, es importante considerar que efecto es el esperado con respecto al mecanismo de muerte y emplear más de un método de detección (226).

En el presente trabajo se emplearon dos métodos de detección: MTT y cristal violeta. La medición de la viabilidad celular a través de la reducción de MTT es ampliamente utilizada. El reactivo MTT es tetrazolio soluble en agua, con una coloración amarilla, que es reducido por células vivas a un producto de color púrpura que corresponde a formazan, el cual es insoluble en soluciones acuosas. Mientras que la técnica de coloración con cristal violeta permite determinar el cambio en el contenido de proteínas totales de la muestra. Si se encuentra afectado el crecimiento celular se reduce el número de células presentes en el cultivo tratado con respecto al control, por lo que la medida de la concentración de proteínas presentes en el cultivo constituye un índice de toxicidad (225).

La toxicidad de un compuesto no es igual para todas las líneas celulares, de hecho un mismo compuesto puede resultar tóxico para determinada línea e inocuo para otra, por esta razón en este trabajo se utilizaron dos líneas celulares diferentes, una correspondiente a ratón y otra humana, para evaluar los híbridos a fin de obtener una mejor comprensión de su comportamiento. El uso de la línea celular humana HaCaT es de suma importancia, dado a que esta línea proviene de células humanas normales inmortalizadas espontáneamente en cultivo, por lo que los resultados obtenidos, por más que sean preliminares, generan un gran aporte si en un futuro se desea usar los híbridos para el *delivery* de drogas (226).

Se considera conveniente hacer los estudios de citotoxicidad a diferentes tiempos de exposición de las muestras a testear, dado a que puede no haber toxicidad de las células en un período de exposición corto pero si en uno más largo. Según lo buscado en la bibliografía, los tiempos de exposición de 4 y 24 horas son los más utilizados para el caso de nanopartículas (227, 228). En nuestro caso, dado a la limitante de reactivos se decidió usar solamente un tiempo de exposición de 4 horas de forma de observar la citotoxicidad de las muestras a corto plazo. Otro factor considerado para llevar a cabo el experimento de citotoxicidad, fue la presencia de suero en el medio de cultivo, ya que está reportado que las nanopartículas pueden llegar a aumentar su tamaño en presencia del mismo. (229). Por esta razón, se sugiere para estudios posteriores evaluar la variación del diámetro de las nanopartículas de sílica mediante la técnica de DLS utilizando tanto medio completo como sin suero. Para no afectar el estado de las células por privación de suero, se trabajó en condiciones con 10% SFB. Se utilizaron las nanopartículas de sílica junto a casi todos los híbridos con VLP de la cepa GII-12 para testear su toxicidad. El híbrido por adsorción iónica fue el único que no se evaluó, dado que la unión de las VLP a la sílica no es muy fuerte, indicando que no sería un buen candidato para su utilización en sistemas de *delivery* de drogas. Además, no nos pareció relevante testear dicho híbrido ya que éste presenta las nanopartículas de sílica rodeadas por VLP al igual que el híbrido por unión covalente, solo que este último presenta una unión mucho más fuerte.

Teniendo en cuenta que se evaluó un amplio espectro de concentraciones, las cuales van de los 1000 μg a 3,90625 μg de híbrido por mL de medio completo, y no se observó una disminución de la viabilidad celular para ninguna condición testeada, se sugiere realizar ensayos a concentraciones superiores a las utilizadas. De esta forma se podrá determinar a qué concentraciones se logra ver un efecto citotóxico en las líneas celulares testeadas, si es que lo hubiera.

En el trabajo se observó que en general ninguna de las muestras de híbridos evaluadas en ambas líneas celulares resulta ser citotóxica a las concentraciones testeadas. Además, se observó que la sílica muestra valores cercanos al 100% de viabilidad celular, indicando que las nanopartículas sin VLP unida no presentan citotoxicidad para las líneas celulares utilizadas en las condiciones estudiadas. Dichos resultados obtenidos para las nanopartículas de sílica coinciden con lo reportado en varios artículos. Por ejemplo, está reportado por Brunner *et al* que las nanopartículas de sílica no resultaron tóxicas para células humanas de mesotelioma y células embrionarias de fibroblasto de ratón. Mientras que las células de fibroblasto de la piel

y pulmonares son más susceptibles a las lesiones de membrana causadas por las nanopartículas de sílica que las células tumorales. Esto se estudió a través de los métodos de MTT y la cuantificación de ADN por Hoechst, incubando por 3 y 6 días las muestras a un rango de concentraciones de 0 a 15 $\mu\text{g/mL}$ (230). Sin embargo, Mu *et al* estudiaron la citotoxicidad de nanopartículas de sílica de 14 nm de diámetro, las cuales observaron que se agregan en medio de cultivo DMEM sin suero resultando en un diámetro hidrodinámico de 500 nm. La citotoxicidad de las mismas se evaluó en distintas líneas celulares, entre ellas HaCaT, a través del método de MTT y Comet por 24 horas de incubación obteniendo como resultado que la citotoxicidad se observó a concentraciones de nanopartículas mayores a 1 $\mu\text{g/mL}$ (227). Este resultado no coincide con los obtenidos en el presente trabajo. La diferencia radica en el tiempo al cual estuvieron expuestas las células a las nanopartículas, por lo que en estudios a futuro podrían evaluarse tiempos de exposición mayores para determinar si son o no citotóxicas.

Considerando que los híbridos no fueron citotóxicos a las concentraciones evaluadas y que presentan un tamaño bastante grande, teniendo en cuenta los resultados de DLS y TEM, se puede sugerir que los resultados obtenidos coinciden con reportes previos. Los mismos establecen que las nanopartículas de menor tamaño resultan ser más tóxicas porque presentan mayor superficie de interacción, pueden ingresar en mayor cantidad a la célula y algunas podrían ingresar directamente al núcleo celular (203, 224). Debido al aporte que podría significar para trabajos futuros, se sugeriría realizar los experimentos de DLS, como se mencionó con anterioridad, con el fin de evaluar si las nanopartículas de sílica en los diferentes híbridos aumentan o no su tamaño. Además, mediante la metodología de TEM se podrían evaluar varios tiempos de exposición de las nanopartículas al medio con suero, observando si existe crecimiento paulatino. Por otra parte, si las nanopartículas de sílica con VLP se combinarán con nanopartículas metálicas se podría utilizar el TEM para determinar la cantidad de híbridos que fueron capaces de ingresar a la célula en diferentes tiempos de exposición (231).

6. ANÁLISIS ECONÓMICO

Los resultados obtenidos en el presente trabajo refieren a los primeros pasos de una posible herramienta nanotecnológica, aunque nos encontramos lejos de una aplicación o comercialización de la misma. Sin embargo, debido a los resultados motivadores que se obtuvieron esto podría ser la base de futuras aplicaciones en el campo de biomedicina.

Actualmente, hay un gran interés en el desarrollo de materiales nanohíbridos basados en VLP que puedan ser utilizados para mejorar la salud humana. Si bien aún no se ha logrado obtener ningún producto comercial, ha habido un enorme desarrollo en esta área de estudio. Existen una gran variedad de potenciales productos que hoy en día se encuentran en diferentes fases de ensayos preclínicos o en investigación. Por ejemplo, la empresa *Aura Biosciences* ha estado desarrollando un tratamiento para combatir el melanoma uveal, que es el tumor maligno más frecuente en el ojo (232). El producto que presentan está en fase pre-clínica y consiste en VLP que demuestran tener una alta selectividad para dirigirse a los tumores sólidos, sin actuar en el epitelio normal. A la VLP se le une a la superficie una molécula fluorescente no-tóxica que permite destruir al tumor una vez administrada la droga en el ojo. Esto se hace irradiando con un láser a longitudes de onda en el infrarrojo que activa a las moléculas fluorescentes, las cuales destruyen las membranas de las células tumorales. Hoy en día se utiliza una placa radioactiva como tratamiento, la misma es colocada sobre el exterior del ojo por días, pudiendo generar cataratas, retinopatía o pérdida de visión severa. Alternativamente, existe la cirugía denominada enucleación donde se remueve el ojo. Por lo que el desarrollo del material nanohíbrido mencionado podría ser una opción no-invasiva y altamente selectiva para la enfermedad de cáncer ocular. Además, esta empresa se ha focalizado mucho en la investigación de posibles *delivery* de drogas usando VLP para tratar aquellos tipos de cáncer que no son comunes en la población.

Otro ejemplo del estudio que se le ha dado a la generación de nanohíbridos basados en VLP es el proyecto que se llevó a cabo en el 2010 por el *Latvian Biomedical Research and Study Centre*. Por un período de tres años se estudió la generación de herramientas de *delivery* de drogas o de diagnóstico mediante la utilización de VLP (233). Además, existen otras compañías como *Genova Biotech Services* que se especializan en la producción de VLP para el área del descubrimiento de drogas (234). Tomando todo en consideración, aún estamos en un proceso de generación de conocimientos básicos para poder tener un mejor entendimiento de cómo funcionan y qué efectos generan estos materiales con el fin de poder desarrollar nuevas aplicaciones biomédicas.

7. CONCLUSIONES

- Se logró preparar híbridos de GNP-VLP de BMV y SNP-VLP de BMV de forma exitosa. Estos híbridos fueron parcialmente caracterizados encontrándose propiedades acordes a una posible utilización como herramienta para *delivery* de drogas.
- Se desarrollaron tres protocolos para la preparación de híbridos de sílica-VLP de Norovirus.
- Se desarrolló un protocolo nuevo en el laboratorio para la evaluación de la estabilidad de proteínas unidas a sílica.
- Estudios preliminares de los híbridos con sílica parecen demostrar una estabilidad mayor que las VLP en solución.
- Los híbridos sílica-VLP mostraron tamaños que indican agregación.
- Los estudios de citotoxicidad demostraron que los híbridos sílica-VLP no parecen ser tóxicos en las líneas celulares NIH 3T3 y HaCaT a concentraciones que van de 1000 µg/mL a 3,9 µg/mL, aproximadamente.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nanomaterials. 2006. Official website of the European Union: Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks; [citado 2015 Mayo 21]. http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/nanomaterials/en/
2. Nanomaterials. 2010. U.S Department of Health and Human Services: National Institute of Environmental Health Sciences; [citado 2015 Mayo 22]. <http://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/sya-nano/>
3. Alagarasi A. 2009. Introduction to nanomaterials. En: Viswanathan B, editor. Nanomaterials. United Kingdom: Alpha Science International Ltd. p. 1-76.
4. Tiwari JN, Tiwari RN, Kim KS. 2012. Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Prog Mater Science*. 57(4):724-803.
5. Taylor RA, Coulombe S, Otanicar TP, Phelan PE, Gunawan A, Lv W, Rosengarten G, Prasher R, Tyagi H. 2013. Small particles, big impacts: A review of the diverse applications of nanofluids. *J Appl Phys*. 113(1): 011301.
6. Taylor RA, Otanicar TP, Rosengarten G. 2012. Nanofluid-based optical filter optimization for PV/T systems. *Light: Science & Applications*. 1(10):e34.
7. Taylor RA, Otanicar TP, Herukerrupu Y, Bremond F, Rosengarten G, Hawkes ER, Jiang X, Coulombe S. 2013. Feasibility of nanofluid-based optical filters. *Appl Optics*. 52(7):1413–1422.
8. The Royal Society. 2004. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. Plymouth: Latimer Trend Ltd.
9. de la Fuente JM, Grazu V. 2012. Nanobiotechnology: Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles. Great Britain: Elsevier.
10. Nanoparticle Fabrication and Characterization for Biomedical Research Applications. 2012. Wilmington: Thermo Scientific; [citado 2015 Mayo 15]. <http://www.nanodrop.com/library/MP013-Nanoparticle-fabrication-for-biomedical-research.pdf>
11. Liu J, Yu S, Yin Y, Chao J. 2012. Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. *Trend Anal Chem*. 33:95-106.
12. Abou El-Nour KMM, Eftaiha A, Al-Warthan A, Ammar RAA. 2010. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arab J Chem*. 3(3):135-140.
13. Fernandes FM, Coradin T, Aimé C. 2014. Self-assembly in biosilicification and biotemplated silica materials. *Nanomaterials*. 4(3):792-812.
14. Banin U, Ben-Shahar Y, Vinokurov K. 2014. Hybrid semiconductor-metal nanoparticles: From architecture to function. *Chem Mater*. 26(1):97-110.
15. Haiqing L, Johnson VJ, Seong JB, Min SH, Jun HS, Kwang-Ho K, Il K. 2014. Controlled accommodation of metal nanostructures within the matrices of polymer architectures through solution-based synthetic strategies. *Prog Polym Sci*. 39(11):1878-1907.
16. Cogley CM, Chen J, Cho EC, Wang LV, Xia Y. 2011. Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications. *Chem Soc Rev*. 40(1):44-56.

17. Schwartzberg AM, Zhang JZ. 2008. Novel optical properties and emerging applications of metal nanostructures. *J Phys Chem C*. 112(28):10323-10337.
18. Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. 2008. Nobel metal on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology and medicine. *Acc Chem Res*. 41(12):1578-1586.
19. Sun Y, Mayers B, Xia Y. 2003. Metal nanostructures with hollow interiors. *Adv Mater*. 15(7-8):641-646.
20. Li H, Han L, Cooper-White JJ, Kim I. 2012. A general and efficient method for decorating graphene sheets with hyperbranched polymers. *Nanoscale*. 4(4):1355-1361.
21. He J, Liu Y, Hood TC, Zhang P, Gong J, Nie Z. 2013. Asymmetric organic/metal(oxide) hybrid nanoparticles: synthesis and applications. *Nanoscale*. 5(12):5151-5166.
22. Sun Y, Xia Y. 2002. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science*. 298(5601):2176-2179.
23. Tan Y, Dai X, Li Y, Zhu D. 2003. Preparation of gold, palladium and silver nanoparticles by the reduction of their salts with a weak reductant-potassium bitartrate. *J Master Chem*. 13(5):1069-1075.
24. Crook RM, Zhao M, Sun L, Chechik V, Yeung LK. 2001. Dendrimer-encapsulated metal nanoparticles: synthesis, characterization, and applications to catalysts. *Acc Chem Res*. 34(3):181-190.
25. Li H, Jo JK, Zhang LD, Ha CS, Suh H, Kim I. 2010. Hyperbranched polyglycidol-assisted green synthetic protocols for the synthesis of multifunctional metal nanoparticles. *Langmuir*. 26(23):18442-18456.
26. Li H, Jo JK, Wang J, Zhang L, Kim I. 2010. Hyperbranched polyglycidol-assisted green approach to the fabrication of morphology-tunable gold architectures. *Cryst Growth Des*. 10(12):5319-5326.
27. Wang X, Zhuang J, Peng Q, Li Y. 2005. A general strategy for nanocrystal synthesis. *Nature*. 437(7055):121-124.
28. Tan SJ, Campolongo MJ, Luo D, Cheng W. 2011. Building plasmonic nanostructures with DNA. *Nat Nanotechnol*. 6(5):268-276.
29. Virkutyte J, Varma RS. 2011. Green synthesis of metal nanoparticles: biodegradable polymers and enzymes in stabilization and surface functionalization. *Chem Sci*. 2(5):837-847.
30. Jancar J, Douglas JF, Starr FW, Kumar SK, Cassagnau P, Lesser AJ, Sternstein SS, Buehler MJ. 2010. Current issues in research on structure-property relationships in polymer nanocomposites. *Polymer*. 51(15):3321-3343.
31. Alexandridis P, Tsianou M. 2011. Block copolymer-directed metal nanoparticle morphogenesis and organization. *Eur Polym J*. 47(4):569-583.
32. Balazs AC, Emrick T, Russell TP. 2006. Nanoparticle polymer composites: where two small worlds meet. *Science*. 314(5802):1106-1110.
33. Bleach R, Karagoz B, Prakash SM, Davis TP, Boyer C. 2014. In situ formation of polymer-gold composite nanoparticles with tunable morphologies. *ACS Macro Lett*. 3(7):591-596.
34. Shenhar R, Norsten TB, Rotello VM. 2006. Polymer-mediated nanoparticle assembly: structural control and applications. *Adv Mater*. 17(6):667-669.
35. Sailor MJ. 2012. Hybrid nanoparticles for detection and treatment of cancer. *Adv Mater*. 24(28):3779-3802.

36. Pouget E, Dujardin E, Cavalier A, Moreac A, Valery C, Marchi-Artzner V, Weiss T, Renault A, Paternostre M, Artzner F. 2007. Hierarchical architectures by synergy between dynamic template self-assembly and biomineralization. *Nat Mater.* 6(6):434-439.
37. Patwardhan SV, Mukherjee N, Steinitz-Kannan M, Clarson SJ. 2003. Bioinspired synthesis of new silica structures. *Chem Commun.* 11(10):1122-1123.
38. Wang S, Xue J, Ge X, Fan H, Xu H, Lu JR. 2012. Biomimetic synthesis of silica nanostructures with controllable morphologies and sizes through tuning interfacial interactions. *Chem Commun.* 48(75):9415-9417.
39. Klug A. 1999. The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 354(1383):531-535.
40. Lin T, Chen Z, Usha R, Stauffacher CV, Dai JB, Schmidt T, Johnson JE. 1999. The refined crystal structure of cowpea mosaic virus at 2.8 Å resolution. *Virology.* 265(1):20-34.
41. Shenton W, Douglas T, Young M, Stubbs G, Mann S. 1999. Inorganic-organic nanotube composites from template mineralization of tobacco mosaic virus. *Adv Mater.* 11(3):253-256.
42. Fowler CE, Shenton W, Stubbs G, Mann S. 2001. Tobacco mosaic virus liquid crystals as templates for the interior design of silica. *Adv Mater.* 13(16):1266-1269.
43. Mao C, Wang F, Cao B. 2012. Controlling nanostructures of mesoporous silica fibers by supramolecular assembly of genetically modifiable bacteriophages. *Angew Chemie.* 124(26):6517-6521.
44. Yang JA, Murphy CJ. 2012. Evidence for patchy lipid layers on gold nanoparticle Surface. *Langmuir.* 28(12):5404-5416.
45. Hawe A, Sutter M, Jiskoot W. 2008. Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. *Pharm Res.* 25(7):1487-1499.
46. Xu ZP, Zeng QH, Lu GQ, Yu AB. 2006. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chem Eng Sci.* 61(3):1027-1040.
47. Bhirde AA, Patel V, Gavard J, Zhang G, Sousa AA, Masedunskas A, Leapman RD, Weigert R, Gutkind JS, Rusling JF. 2009. Targeted Killing of Cancer Cells in Vivo and in Vitro with EGF-Directed Carbon Nanotube-Based Drug Delivery. *ACS Nano.* 3(2):307-316.
48. Arvizo R, Bhattacharya R, Mukherjee P. 2010. Gold nanoparticles: opportunities and challenges in nanomedicine. *Expert Opin Drug Deliv.* 7(6):753-763.
49. Loo C, Lowery A, Halas N, West J, Drezek R. 2005. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nano Lett.* 5(4):709-711.
50. Gobin AM, Lee MH, Halas NJ, James WD, Drezek RA, West JL. 2007. Near-infrared resonant nanoshells for combined optical imaging and photothermal cancer therapy. *Nano Lett.* 7(7):1929-34.
51. Choi MR, Stanton-Maxey KJ, Stanley JK, Levin CS, Bardhan R, Akin D, Badve S, Sturgis J, Robinson JP, Bashir R, et al. 2007. A cellular Trojan Horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors. *Nano Lett.* 7(12):3759-3765.
52. Jin Y, Li A, Hazelton SG, Liang S, John CL, Selid PD, Pierce DT, Zhao JX. 2009. Amorphous silica nanohybrids: Synthesis, properties and applications. *Coordin Chem Rev.* 253(23-24):2998-3014.

53. Yavuz MS, Cheng Y, Chen J, Cobley CM, Zhang Q, Rycenga M. 2009. Gold nano-cages covered by smart polymers for controlled release with near-infrared light. *Nat Mater.* 8(12):935-939.
54. Panyam J, Labhasetwar V. 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev.* 55(3):329-347.
55. Uhrich K, Cannizzaro S, Langer R, Shakesheff K. 1999. Polymeric systems for controlled drug release. *Chem Rev.* 99(11):3181-3198.
56. Kuruppu D, Dorfman JD, Tanabe KK. 2007. HSV-1 viral oncolysis and molecular imaging with PET. *Curr Cancer Drug Targets.* 7:175-180.
57. Kangasniemi L, Koskinen M, Jokinen M, Toriseva M, Ala-Aho R, Kähäri VM, Jalonen H, Ylä-Herttua S, Moilanen H, Stenman UH. 2009. Extended release of adenovirus from silica implants *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther.* 16(1):103–110.
58. Conde J, Doria G, Baptista P. 2012. Noble metal nanoparticles applications in cancer. *J Drug Deliv.* 2012(751075):1-12.
59. Manchester M, Singh P. 2006. Virus-based nanoparticles (VNPs): Platform technologies for diagnostic imaging. *Adva Drug Deliver Rev.* 58(14):1505-1522.
60. Prabhu S, Poulose EK. 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Lett.* 2:32-41.
61. Alkilany AM, Murphy CJ. 2010. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanopart Res.* 12(7):2313–2333.
62. Slowing II, Vivero-Escoto JL., Wu CW, Lin VS. 2008. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 60:1278–1288.
63. Malvindi MA, Brunetti V, Vecchio G, Galeone A, Cingolani R, Pompa PP. 2012. SiO₂ nanoparticles biocompatibility and their potential for gene delivery and silencing. *Nanoscale.* 4:486–495.
64. Graves EE, Weissleder R, Ntziachristos V. 2004. Fluorescence molecular imaging of small animal tumor models. *Curr Mol Med.* 4(4):419-430.
65. Grgacic EV, Anderson DA. 2006. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods.* 40(1):60–65.
66. Garcea RL, Gissmann L. 2004. Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. *Curr Opin Biotechnol.* 15(6):513–517.
67. Ludwig C, Wagner R. 2007. Virus-like particles—universal molecular toolboxes. *Curr Opin Biotechnol.* 18(6):537–545.
68. Crisci E, Bárcena J, Montoya M. 2012. Virus-like particles: The new frontier of vaccines for animal viral infections. *Vet Immunol Immunopathol.* 148(3-4):211-225.
69. Andrew L, Zhongwei N, Qian W. 2009. Viruses and virus-like particles protein assemblies chemically programmable nanoscale building blocks. *Nano Res.* 2(5):349-364.
70. Awram P, Gardner RC, Forster RL, Bellamy AR. 2002. The potential of plant viral vectors and transgenic plants for subunit vaccine production. *Adv Virus Res.* 58:81–124.
71. Fuxiao L, Shengqiang G, Lin L, Xiaodong W, Zengshan L, Zhiliang W. 2012. Virus-like particles: potencial veterinary vaccine immunogens. *Res Vet Sci.* 93(2):553-559.
72. Molino NM, Wang SW. 2014. Caged protein nanoparticles for drug delivery. *Curr Opin Biotechnol.* 28:75-82.

73. Zeltins A. 2013. Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Mol Biotechnol.* 53(1):92-107.
74. Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, Middleberg APJ. 2014. Nanoparticles vaccines. *Vaccine.* 32(3):327-337.
75. Douglas T, Young M. 2006. Viruses: making friends with old foes. *Science.* 312(5775):873-875.
76. Zhou Z, Bedwell GJ, Li R, Prevelige PE, Gupta A. 2014. Formation mechanism of chalcogenide nanocrystals confined inside genetically engineered virus-like particles. *Sci Rep.* 4(3832):1-6.
77. Evans DJ. 2008. The bionanoscience of plant viruses: templates and synthons for new materials. *J Mater Chem.* 18(32):3746-3754.
78. Young M, Willits D, Uchida M, Douglas T. 2008. Plant viruses as biotemplates for materials and their use in nanotechnology. *Annu Rev Phytopathol.* 46:361-384.
79. Steinmetz NF. 2010. Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices. *Nanomedicine.* 6(5):634-641.
80. Manchester M, Steinmetz NF. 2009. *Viruses and Nanotechnology.* Heidelberg (Alemania): Springer Verlag Berlin Heidelberg.
81. Virus-like particles. 2015. James Swartz Research group; [citado 2015 Mayo 21]. <http://swartz.openwetware.org/Research/VLPs.html>
82. Pokorski JK, Steinmetz NF. 2011. The Art of engineering viral nanoparticles. *Mol Pharm.* 8(1):29-43.
83. Flynn CE, Lee S-W, Peelle BR, Belcher AM. 2003. Viruses as vehicles for growth, organization and assembly of materials. *Acta Mater.* 51:5867-5880.
84. Klem MT, Young MJ, Douglas T. 2005. Biomimetic magnetic nanoparticles. *Mater Today.* 8(9):28-37.
85. Uchida M, Klem MT, Allen M, Suci P, Flenniken ML, Gillitzer E, Varpness Z, Liepold LO, Young M, Douglas T. 2007. Biological containers: Protein cages as multifunctional nanoplatforms. *Adv Mater.* 19(8):1025-1042.
86. Bauerlein E. 2003. Biomineralization of unicellular organisms: an unusual membrane biochemistry for the production of inorganic nano- and microstructures. *Angew Chem Int Ed Engl.* 42(6):614- 641.
87. Tseng RJ, Tsai C, Ma L, Ouyang J, Ozkan CS, Yang Y. 2006. Digital memory device based on tobacco mosaic virus conjugated with nanoparticles. *Nat Nanotechnol.* 1:72-77.
88. Halford B. 2004. Advancing toward fimer circuitry. *News of the week.* 82(2):1-5.
89. Maloy OC, Murray TD. 2001. *Encyclopedia of Plant Pathology.* Ontario (Canada): John Wiley & Sons.
90. Miller WA, Bujarski JJ, Dreher TW, Hall TC. 1986. Minus-strand initiation by brome mosaic virus replicase within the 3' tRNA-like structure of native and modified RNA templates. *J Mol Biol.* 187(4):537-546.
91. Lucas RW, Larson SB, McPherson A. 2002. The crystallographic structure of brome mosaic virus. *J Mol Biol.* 317(1):95-108.
92. Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L. 1996. *Viruses of plants.* Cambridge (United Kingdom): CAB International, University Press.
93. Howorka S. 2011. Molecular Assembly in Natural and Engineered Systems. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 103:xi-xii.
94. Casjens S, King J. 1975. Virus Assembly. *Annu Rev Biochem.* 44:555-611.

95. Casjens S. 1985. Virus structure and assembly. Boston: Jones and Barlett.
96. Bancroft JB, Hills GJ, Markham R. 1967. A study of self-assembly process in a small spherical virus – formation of organized structures from protein subunits *in vitro*. *Virology*. 31(2):354-379.
97. Hawe A, Sutter M, Jiskoot W. 2008. Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. *Pharm Res*. 25(7):1487–1499.
98. Steinberg TH, Jones LJ, Haugland RP, Singer VL. 1996. SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. *Anal Biochem*. 239(2):223–237.
99. Steinberg TH, Haugland RP, and Singer VL. 1996. Application of SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains. *Anal Biochem*. 239(2):238–245.
100. Hofmann A, Simon A, Grkovic T, Jones M. 2014. *Methods of Molecular Analysis in the Life Sciences*. Cambridge (United Kingdom): Cambridge University Press.
101. Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, Parashar UD, Bresee JS, Monroe SS. 2000. The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis*. 181 Suppl 2: S254-S261.
102. Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*. 346(2):312-323.
103. Siebenga JJ, Vennema H, Zheng DP, Vinjé J, Lee BE, Pang XL, Ho EC, Lim W, Choudekar A, Broor S, et al. 2009. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of Norovirus GII.4 Variants, 2001-2007. *J Infect Dis*. 200(5):802-812.
104. Lindesmith LC, Donaldson EF, Lobue AD, Cannon JL, Zheng D, Vinje J, Baric RS. 2008. Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med*. [citado 2015 Abril 16];5(2): e31. <http://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0050031> doi:10.1371/journal.pmed.0050031.
105. Hardy ME. 2005. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett*. 253(1):1-8.
106. Prasad BV, Rothnagel R, Jiang X, Estes MK. 1994. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J Virol*. 68(8):5117-5125.
107. Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK. 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*. 286(5438):287-290.
108. Bertolotti-Ciarlet A, White LJ, Chen R, Prasad BV, Estes MK. 2002. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *J Virol*. 76(8):4044-4055.
109. Sosnovtsev SV, Belliot G, Chang KO, Onwudiwe O, Green KY. 2005. Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *J Virol*. 79(7):4012-4024.
110. Seah EL, Gunesekere IC, Marshall JA, Wright PJ. 1999. Variation in ORF3 of genogroup 2 Norwalk-like viruses. *Arch Virol*. 144(5):1007-1014.
111. Huang D, Liao F, Molesa S, Redinger D, Subramanian V. 2003. Plastic-Compatible Low Resistance Printable Gold Nanoparticle Conductors for Flexible Electronics. *J Electrochem Soc*. 150(7):G412-G417.
112. Stuchinskaya T, Moreno M, Cook MJ, Edwards DR, Russell DA. 2011. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody–phthalocyanine–gold nanoparticle conjugates. *Photochem Photobiol Sci*. 10(5), 822-831.
113. Brown SD, Nativo P, Smith J, Stirling D, Edwards PR, Venugopal B, Flint D J, Plumb JA, Graham D, Wheate NJ. 2010. *J Am Chem Soc*. 132(13):4678-4684.

114. Peng G, Tisch U, Adams O, Hakim M, Shehada N, Broza YY, Bilan S, Abdah-Bortnyak R, Kuten A, Haick H. 2009. Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. *Nature Nanotech.* 4:669-673
115. Ali ME, Hashim U, Mustafa S, Che Man YB, Islam KN. 2012. Gold nanoparticle sensor for the visual detection of pork adulteration in meatball formulation. *J Nanomaterials.* 2012:1-7.
116. Perrault SD, Chan WCW. 2010. *In vivo* assembly of nanoparticle components to improve targeted cancer imaging. *Proc Nat Acad Sci USA.* 107(25):11194-11199.
117. Thompson DT. 2007. Using gold nanoparticles for catalysis. *Nano Today.* 2(4):40-43.
118. Muller-Dethlefsand P, Hobza K. 2000. Noncovalent Interactions: A Challenge for Experiment and Theory. *Chem Rev.* 100(1):143-167.
119. Sastry M, Rao M, Ganesh KN. 2002. Electrostatic assembly of nanoparticles and biomacromolecules. *Acc Chem Res.* 35(10):847-855.
120. Levyand JN, Onuchic Y. 2006. Mechanisms of protein assembly: Lessons from minimalist models. *Acc Chem Res.* 39(2):135-142.
121. Boca SC, Astilean S. 2010. Detoxification of gold nanorods by conjugation with thiolated poly(ethylene glycol) and their assessment as SERS-active carriers of Raman tags. *Nanotechnology.* 21(23):235601.
122. Niidome T, Akiyama Y, Yamagata M, Kawano T, Mori T, Niidome Y, Katayama Y. 2009. Poly(ethylene glycol)-modified gold nanorods as a photothermal nanodevice for hyperthermia. *J Biomater Sci Polym Ed.* 20(9):1203-1215.
123. Niidome T, Yamagata M, Okamoto Y, Akiyama Y, Takahashi H, Kawano T, Katayama Y, Niidome Y. 2006. PEG-modified gold nanorods with a stealth character for *in vivo* applications. *J Control Release.* 114(3):343-347.
124. Bain CD, Evall J, Whitesides GM. 1989. Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent. *J Am Chem Soc.* 111(18):7155-7164.
125. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. 2005. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem Rev.* 105(4):1103-1169.
126. Cobley CM, Chen J, Cho EC, Wang LV, Xia Y. 2011. Gold nanostructures: a class of multifunctional materials for biomedical applications. *Chem Soc Rev.* 40(1):44-56.
127. Jeong S, Choi H, Kim JY, Lee T. 2015. Silver-based nanoparticles for surface plasmon resonance in organic optoelectronics. *Part Part Syst Char.* 32(2):164-175.
128. Westphalen M, Kreibig U, Rostalski J, Luth H, Meissner D. 2000. Metal cluster enhanced organic solar cells. *Sol Energ Mat Sol C.* 61(1):97-105.
129. Pillai S, Catchpole KR, Trupke T, Green MA. 2007. Surface plasmon enhanced silicon solar cells. *J Appl Phys.* 101(9):093105.
130. Catchpole KR, Pillai S. 2006. Surface plasmons for enhanced silicon light-emitting diodes and solar cells. *J Lumin.* 121(2):315-318.
131. Warriar P, Teja A. 2011. Effect of particle size on the thermal conductivity of nanofluids containing metallic nanoparticles. *Nanoscale Res Lett.* 6(1):247-252.
132. Warriar P, Yuan Y, Beck MP, Teja AS. 2010. Heat Transfer in Nanoparticle Suspensions: Modeling the Thermal Conductivity of Nanofluids. *AIChE J.* 56(12):3243-3256.

133. Li W, Yuea X, Guo C, Lv J, Liu S, Zhang Y, Xu J. 2015. Synthesis and characterization of magnetically recyclable Ag nanoparticles immobilized on Fe₃O₄@C nanospheres with catalytic activity. *Appl Surf Sci.* 335:23–28.
134. Bosetti M, Massè A, Tobin E, Cannas M. 2002. Silver coated materials for external fixation devices: *in vitro* biocompatibility and genotoxicity. *Biomaterials.* 23(3):887-892.
135. Jain P, Pradeep T. 2005. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnol Bioeng.* 90(1):59-63.
136. Li Q, Mahendra S, Lyon DY, Brunet L, Liga MV, Li D, Alvarez PJJ. 2008. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Res.* 42(18):4591-4602.
137. Benezra M, Penate-Medina O, Zanzonico PB, Schaer D, Ow H, Burns A, DeStanchina E, Longo V, Herz E, Iyer S, et al. 2011. Multimodal silica nanoparticles are effective cancer-targeted probes in a model of human melanoma. *J Clin Invest.* 121(7):2768-2780.
138. Niu Y, Popat A, Yu M, Karmakar S, Gu W, Yu C. 2012. Recent advances in the rational design of silica-based nanoparticles for gene therapy. *Therapeutic Delivery.* 3(10):1217-1237.
139. Yu M, Jambhrunkar S, Thorn P, Chen J, Gu W, Yu C. 2013. Hyaluronic acid modified mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery to CD44-overexpressing cancer cells. *Nanoscale.* 5(1):178-183.
140. Xia T, Kovochich M, Liong M, Meng H, Kabehie S, George S, Zink JI, Nel AE. 2009. Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs. *ACS Nano.* 3(10):3273-3286.
141. Mody KT, Popat A, Mahony D, Cavallaro AS, Yu C, Mitter N. 2013. Mesoporous silica nanoparticles as antigen carriers and adjuvants for vaccine delivery. *Nanoscale.* 5(12):5167-5179.
142. Carvalho LV, Ruiz RC, Scaramuzzi K, Marengo EB, Matos JR, Tambourgi DV, Fantini MCA, Sant-Anna OA. 2010. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. *Vaccine.* 28(50):7829-7836.
143. Guo HC, Feng XM, Sun SQ, Wei YQ, Sun DH, Liu ZX, Luo JX, Yin H. 2012. Immunization of mice by hollow mesoporous silica nanoparticles as carriers of porcine circovirus type 2 ORF2 protein. *Virology.* 9:108-117.
144. Chen K, Zhang J, Gu H. 2012. Dissolution from inside: a unique degradation behavior of core-shell magnetic mesoporous silica nanoparticles and effect of polyethyleneimine coating. *J Mater Chem.* 22(41):22005-22012.
145. Luckarift HR, Spain JC, Naik RR, Stone MO. 2004. Enzyme immobilization in biomimetic silica support. *Nat Biotechnol.* 22(2):211-213.
146. Kröger N, Deutzmann R, Sumper M. 1999. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science.* 286(5442):1129-1132.
147. Kröger N, Lorenz S, Brunner E, Sumper M. 2002. Self-assembly of highly phosphorylated silafins and their function in biosilica morphogenesis. *Science.* 298(5593):584-586.
148. Fernandes FM, Coradin T, Aimé C. 2014. Self-assembly in biosilicification and biotemplated silica materials. *Nanomaterials.* 4(3):792-812.

149. Hedrich R, Machill S, Brunner E. 2013. Biomineralization in diatoms—phosphorylated saccharides are part of *Stephanopyxis turris* biosilica. *Carbohydr Res.* 365:52-60.
150. Patwardhan SV. 2011. Biomimetic and bioinspired silica: recent developments and applications. *Chem Commun.* 47(27):7567-7582.
151. Zamora P, Domínguez E, Narváez A. 2009. Enzyme-modified nanoparticles using biomimetically synthesized silica. *Bioelectrochemistry.* 76(1-2):100-106.
152. Betancor L, Luckarift HR. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. 2008. *Trends Biotechnol.* 26(10):566-572.
153. Slowing II, Trewyn BG, Giri S, Lin VSY. 2007. Mesoporous silica nanoparticles for drug delivery and biosensing applications. *Adv Funct Mater.* 17(8):1225-1236.
154. Barbé C, Bartlett J, Kong L, Finnie K, Lin HQ, Larkin M, Calleja S, Bush A, Calleja G. 2004. Silica particles: a novel drug-delivery system. *Adv Mater.* 16(21):1959-1966.
155. Tan W, Wang K, He X, Zhao XJ, Drake T, Wang L, Bagwe RP. 2004. Bionanotechnology based on silica nanoparticles. *Med Res Rev.* 24(5):621-638.
156. Xianoging L, Tingting Y, Qing G, Jianjun Y, Shiyuan C. 2009. Biomimetic synthesis of copolymer-silica nanoparticles with tunable compositions and Surface property. *J Colloid Interf Sci.* 338(1):99-104.
157. Zhong Z, Li M, Xiang D, Dai N, Qing Y, Wang D, Tang D. 2009. Signal amplification of electrochemical immunosensor for the detection of human serum IgG using double-codified nanosilica particles as labels. *Biosens Bioelectron.* 24(7):2246-2249.
158. Soleimani M, Khani A, Najafzadeh K. 2012. α -Amylase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents. *J Mol Catal B Enzym.* 74(1-2):1-5
159. Carturan G, Dal Toso R, Boninsegna S, Dal Monte R. 2004. Encapsulation of functional cells by sol-gel silica: actual progress and perspectives for cell therapy. *J Mater Chem.* (14):2087- 2098.
160. Jaramillo N. 2013. Encapsulación de un fármaco en nanopartículas de sílice sintetizadas via sol-gel asistido por microemulsión de micelas inversas. [Tesis] Universidad Nacional de Colombia.
161. López-Gallego F. 2006. Desarrollo de nuevos catalizadores enzimáticos para la producción directa de cefalosporinas semisintéticas a partir de cefalosporina C. [Tesis] Universidad Autónoma de Madrid.
162. Arroyo M. 1998. Inmovilización de enzimas: fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica.* 39(2):23-39.
163. Jackson E, Ferrari M, Cuestas-Ayllon C, Fernandez-Pacheco R, Perez-Carvajal J, Martinez de la Fuente J, Grazu V, Betancor L. 2015. Protein templated biomimetic silica nanoparticles. *Langmuir.* [citado 2015 Junio 11];31(12):3687–3695. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021%2F1a504978r>. doi: 10.1021/1a504978r.
164. Loo L, Guenther RH, Lommel SA, Franzen S. 2008. Infusion of dye molecules into red clover necrotic mosaic virus. *Chem Commun.* (1):88–90.
165. Nanoparticle drug delivery system. 2015. Leong cancer research lab: Translational cancer research on urogenital malignancies; [citado 2015 Mayo 30]. <http://leonglab.com/research-projects/nanoparticle-drug-delivery-systems/>
166. Douglas T, Young M. 1998. Host-Guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages. *Nature.* 393:152–155.

167. Sherman MB, Guenther RH, Tama F, Sit TL, Brooks CL, Mikhailov AM, Orlova EV, Baker TS, Lommel SA. 2006. Removal of divalent cations induces structural transitions in red clover necrotic mosaic virus, revealing a potential mechanism for RNA release. *J Virol.* 80(21):10395–10406.
168. Ren Y, Wong SM, Lim LY. 2006. *In vitro*-reassembled plant virus-like particles for loading of polyacids. *J Gen Virol.* 87:2749–2754.
169. Hu Y, Zandi R, Anavitarte A, Knobler CM, Gelbart WM. 2008. Packaging of a polymer by a viral capsid: the interplay between polymer length and capsid size. *Biophys J.* 94(4):1428–1436.
170. Ren Y, Wong SM, Lim LY. 2007. Folic acid-conjugated protein cages of a plant virus: a novel delivery platform for doxorubicin. *Bioconjugate Chem.* 18(3):836–843.
171. Comellas-Aragones M, Engelkamp H, Claessen VI, Sommerdijk NA, Rowan AE, Christianen PC, Maan JC, Verduin BJ, Cornelissen JJ, Nolte RJ. 2007. A virus-based single-enzyme nanoreactor. *Nat Nanotechnol.* 2(10):635–639.
172. Zhiu L, Jing Q, Zhongwei N, Qian W. 2012. Natural supramolecular building blocks from virus coat proteins to viral nanoparticles. *Chem Soc Rev.* 41(18):6178–6194.
173. Sit TL, Vaewhongs AA, Lommel SA. 1998. RNA-mediated trans-activation of transcription from a viral RNA. *Science.* 281(5378):829–832.
174. Loo L, Guenther RH, Basnayake VR, Lommel SA, Franzen S. 2006. Controlled encapsidation of gold nanoparticles by a viral protein shell. *J Am Chem Soc.* 128(14):4502–4503.
175. Loo L, Guenther RH, Lommel SA, Franzen S. 2007. Encapsidation of nanoparticles by red clover necrotic mosaic virus. *J Am Chem Soc.* 129(36):11111–11117.
176. Chen C, Daniel M-C, Quinkert ZT, De M, Stein B, Bowman VD, Chipman PR, Rotello VM, Kao CC, Dragnea B. 2006. Nanoparticle-templated assembly of viral protein cages. *Nano Lett.* 6(4):611–615.
177. Dragnea B, Chen C, Kwak ES, Stein B, Kao CC. 2003. Gold nanoparticles as spectroscopic enhancers for *in vitro* studies on single viruses. *J Am Chem Soc.* 125(21):6374–6375.
178. Dixit SK, Goicochea NL, Daniel MC, Murali A, Bronstein L, De M, Stein B, Rotello VM, Kao CC, Dragnea B. 2006. Quantum dot encapsulation in viral capsids. *Nano Lett.* 6(9):1993–1999.
179. Huang X, Bronstein LM, Retrum J, Dufort C, Tsvetkova I, Aniagyei S, Stein B, Stucky G, McKenna B, Remmes N, et al. 2007. Self-assembled virus-like particles with magnetic cores. *Nano Lett.* 7(8):2407–2416.
180. Sun J, DuFort C, Daniel MC, Murali A, Chen C, Gopinath K, Stein B, De M, Rotello VM, Holzenburg A, et al. 2007. Core-controlled polymorphism in virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(4):1354–1359.
181. Aniagyei SE, DuFort C, Kao CC, Dragnea B. 2008. Self-assembly approaches to nanomaterial encapsulation in viral protein cages. *J Mater Chem.* 18(32):3763–3774.
182. Lin HK, van der Schoot P, Zandi R. 2012. Impact of charge variation on the encapsulation of nanoparticles by virus coat proteins. *Phys Biol.* 9(6):1–11.
183. Singh BD. 2008. *Biotechnology expanding horizons*. 2nda edición. India: Kalyani Publishers.
184. Kim J, Jia H, Wang P. 2006. Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnol Adv.* 24(3):296–308.

185. Dai D, Xia L. 2006. Effect of lipase immobilization on resolution of (R, S)-2-octanol in non aqueous media using modified ultrastable-Y molecular sieve as support. *Appl Biochem Biotechnol*. 134(1):39-49.
186. Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech*. 3(1):1-9.
187. Gupta MN. 1991. Thermostabilization of proteins. *Biotechnol Appl Bioc*. 14:1-11.
188. Guisan JM. 2012. Purificación e inmovilización de enzimas industriales. Madrid (España): Real Academia Nacional de Farmacia.
189. Spahn C, Minter SD. 2008. Enzyme immobilization in biotechnology. *Recent Pat Eng*. 2:195-200.
190. Popat A, Hartono SB, Stahr F, Liu J, Qiao SZ, Lu GQ. 2011. Mesoporous silica nanoparticles for bioadsorption, enzyme immobilization and delivery carriers. *Nanoscale*. 3(7):2801-2818.
191. Hsieh HJ, Liu PC, Liao W.J. 2000. Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance thermal stability. *Biotechnol Lett*. 22(18):1459-1464.
192. Cunha AG, Fernández-Lorente G, Bevilaqua JV, Destain J, Paiva LM, Freire DM, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. 2008. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase—a comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques. *Appl Biochem Biotechnol*. 146(1-3):49-56.
193. Burteau N, Burton S, Crichton RR. 1989. Stabilisation and immobilisation of penicillin amidase. *FEBS Lett*. 258(2):185-189.
194. Barros RM, Extremina CI, Goncalves IC, Braga BO, Balcao VM, Malcata FX. 2003. Hydrolysis of α -lactalbumin by cardosin A immobilized on highly activated supports. *Enzym Microb Technol*. 33(7):908-916.
195. D'Souza SF, Kubal BS. 2002. A cloth strip bioreactor with immobilized glucoamylase. *J Biochem Biophys Methods*. 51(2):151-159.
196. Balcao VM, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Malcata FX, Guisan JM. 2001. Structural and functional stabilization of L-asparaginase via multisubunit immobilization onto highly activated supports. *Biotechnol Prog*. 17(3):537-542.
197. dos Reis-Costa L, Soares AM, Franca SC, Trevisan HC, Roberts TJ. 2003. Immobilization of lipases and assay in continuous fixed bed reactor. *Protein Pept Lett*. 10(6):619-628.
198. Magnan E, Catarino I, Paolucci-Jeanjean D, Preziosi-Belloy L, Belleville MP. 2004. Immobilization of lipase on a ceramic membrane: activity and stability. *J Membr Sci*. 241(1):161-166.
199. Fernández-Lafuente R, Rodríguez V, Mateo C, Fernández-Lorente G, Arminsen P, Sabuquillo P, Guisan JM. 1999. Stabilization of enzymes (-amino acid oxidase) against hydrogen peroxide via immobilization and post-immobilization techniques. *J Mol Catal B Enzym*. 7(1):173-179.
200. Betancor L, López-Gallego F, Hidalgo A, Alonso-Morales N, Mateo G, Fernández-Lafuente R, Guisan JM. 2006. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme Microb Tech*. 39(4):877-882.
201. Educación Virtual de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad de Rosario. Inmovilización de enzimas. 2015. Argentina: Universidad de Rosario; [citado 2015 Marzo 11].

http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/5983/mod_resource/content/0/INMOVILIZACION_DE_ENZIMAS.pdf

202. Schoevaart R, Wolbers MW, Golubovic M, Ottens M, Kieboom AP, van Rantwijk F, van der Wielen LA, Sheldon RA. 2004. Preparation, optimization and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnol Bioeng.* 87(6):754-762.
203. Xu ZP, Zeng QH, Lu GQ, Yu AB. 2006. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chem Eng Sci.* 61(3):1027–1040.
204. Porley D. 2013. Construcción de un Baculovirus recombinante para la expresión de la proteína VP1 de Norovirus. [Tesis] Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay.
205. Cesar Llave C, Kasschau KD, Carrington JC. 2000. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *PNAS.* 97(24):13401-13406.
206. Slot JW, Geuze HJ. 1985. A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Eur J Cell Biol.* 38:87-93
207. Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ. 2001. Wet Chemical Synthesis of High Aspect Ratio Cylindrical Gold Nanorods. *J Phys Chem B.* 105:4065-4067.
208. Chen Y, Wang X. 2008. Novel phase-transfer preparation of monodisperse silver and gold nanoparticles at room temperature. *Mater Lett.* 62:2215-2218.
209. Li X, Zhang J, Xu W, Jia H, Wang X, Yang B, Zhao B, Li B, Ozaki Y. 2003. Mercaptoacetic acid-capped silver nanoparticles colloid: Formation, morphology and SERS activity. *19:4285-4290.*
210. Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual.* 3era edición. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
211. Kang D, Gho YS, Suh M, Kang C. 2002. Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie Brilliant Blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis bull. *Korean Chem Soc.* 23(11):1511-1512.
212. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 9(6):255-262.
213. Chen C, Kwal E, Stein B, Kao CC, Dragnea B. 2005. Packaging of gold particles in viral capsids. *J Nanosci Nanotechnol.* 5(12):2029-2033.
214. Valiño V, Fresnedo M, Ibañez R, Ortiz I. 2014. Improved separation of bovine serum albumin and lactoferrin mixtures using charged ultrafiltration membranes. *Separ Purif Technol.* 125:163-169.
215. Ausar SF, Foubert TR, Hudson MH, Vedvick TS, Middaugh CR. 2006. Conformational stability and disassembly of norwalk virus-like particles effect of pH and temperature. *J Biol Chem.* 281(28):19478-19488.
216. Romero-Pérez A, García-García E, Zavaleta-Mancera A, Ramírez-Bribiesca JE, Revilla-Vázquez A, Hernández-Calva LM, López-Arellano R, Cruz-Monterrosa RG. 2010. Designing and evaluation of sodium selenite nanoparticles *in vitro* to improve selenium absorption in ruminants. *Vet Res Commun.* 34(1):71-79.
217. Tomé-Amat J, Fleischer L, Parker SA, Bardliving CL, Batt CA. 2014. Secreted production of assembled norovirus virus-like particles from *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fac.* 13(134):1-9.

218. Da Silva AK, Kavanagh O, Estes MK, Elimelech M. 2011. Adsorption and aggregation properties of norovirus GI and GII virus-like particle demonstrate differing responses to solution chemistry. *Environ Sci Technol.* 45(2):520-526.
219. Koho T, Huhti L, Blazevic V, Nurminen K, Butcher SJ, Laurinmäki P, Kalkkinen N, Rönholm G, Vesikari T, Hytönen VP, et al. 2012. Production and characterization of virus-like particles and the P domain protein of GII.4 norovirus. *J Virol Methods.* 179(1):1-7.
220. Differential scanning fluorimetry on Optim using SYPRO Orange dye. Menlo Park: Pall ForteBio Corporation; [citado 2015 Junio 10]. <http://www.fortebio.com/>
221. Tan M, Hegde RS, Jiang X. 2004. The P domain of norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors. *J Virol.* 78(12):6233-6242.
222. Cuellar JL, Meinhoewel F, Hoehne M, Donath E. 2010. Size and mechanical stability of norovirus capsids depend on pH: a nanoindentation study. *J Gen Virol.* 91(10):2449-2456.
223. Li Y, Yang G, Mei Z. 2012. Spectroscopic and dynamic light scattering studies of the interaction between pterodonic acid and bovine serum albumin. *Acta Pharma Sin B.* 2(1):53-59.
224. Buzea C, Pacheco-Blandino II, Robbie K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases.* 2(4):MR17-MR172.
225. Freshney RI. 2010. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6ta edicion. Hoboken (New Jersey): John Wiley & Sons.
226. Weyermann J, Lochmanna D, Zimmer A. 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm.* 288:369-376.
227. Mu Q, Hondow NS, Krzeminski L, Brown AP, Jeuken LJ, Routledge MN. 2012. Mechanism of cellular uptake of genotoxic silica nanoparticles. *Part Fibre Toxicol.* 9(1):29-39.
228. Dechsakulthorn F, Hayes A, Bakand S, Joeng L, Winder C. 2008. *In vitro* cytotoxicity assessment of selected nanoparticles using human skin fibroblasts. *Jpn Soc Altern Anim Exp.* 14:397-400.
229. Izak-Naul E, Voetzl M, Eidenl S, Duschl A, Puntès VF. 2013. Altered characteristics of silica nanoparticles in bovine and human serum: the importance of nanomaterial characterization prior to its toxicological evaluation. *Part Fibre Toxicol.* 10(56):1-12.
230. Brunner TJ, Wick P, Manser P, Spohn P, Grass RN, Limbach LK, Bruinink A, Stark WJ. 2006. *In vitro* cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos and silica and the effect of particle solubility. *Environ Sci Technol.* 40:4374-4381.
231. Stone JW, Sisco PN, Goldsmith EC, Baxter SC, Murphy CJ. 2007. Using gold nanorods to probe cell-induced collagen deformation. *Nano Lett.* 7(1):116-119.
232. Aurora Bioscience Incorporated. Therapeutic programs: ocular melanoma. 2015. United States of America: Cambridge; [citado 2015 Junio 28]. <http://www.aurabiosciences.com/therapeutic-programs/>
233. Latvian Biomedical Research and Study Centre. Virus-like particle (VLP) nanotechnology for the generation of drug and diagnostics tools. 2015. Latvia: Riga; [citado 2015 Junio 28]. <http://bmc.biomed.lu.lv/en/research/projects/all-projects/virus-like-particle-vlp-nanotechnology-for-the-generation-of-drug-and-diagnostics-delivery-tools/>.
234. Geneva Biotech. Customs assay development and drug discovery services. 2015. Switzerland: La Tulipe; [citado 2015 Junio 28]. <http://geneva-biotech.com/services/>.

9.1 Anexo 1: Preparación de soluciones

- **Soluciones:**

Medio LB

Para la preparación de 1L:

- 10 g Triptona
- 5 g de extracto de levadura
- 10 g de NaCl

Se resuspende en 1L de agua destilada y se autoclava.

Medio de infiltración

- 10 mM MgCl₂, 10 mM MES, pH 5.9 y 150 μM acetosiringona.

Virus buffer

- 0,25 M de NaOAc
- 0,01 M de MgCl₂
- pH 4.5 (preparar antes de uso y mantenerlo en la heladera)
- Antes de usarlo se debe agregar β-mercaptoethanol a una concentración de 2 mM (140 μL para 1 L de virus *buffer*)

Solución de sacarosa 10 %

- 10 g de sacarosa por cada 100 mL de virus *buffer*

Solución de CsCl 40%

- Para 20 mL de volumen total, se pesan 8 g y se disuelven en 20 mL de virus *buffer*.

SAMA buffer

- 0,05 M de NaOAc
- 0,008 M de Mg(OAc)₂
- pH 4,5

Buffer de desensamblaje

- 5 M CaCl₂·2H₂O
- pH 7,4

TKM buffer

- 1 M KCl
- 0,01 M Tris
- 0,005 M MgCl₂
- pH 7,4

TNKM buffer

- 0,01 M KCl
- 0,05 M Tris-HCl
- 0,05 M NaCl
- 0,005 M MgCl₂
- pH 7,4

Buffers para análisis de proceso de desensamblado de BMV

pH	Ácido cítrico 0,1 M (mL)	Na ₂ HPO ₄ 0,2 M (mL)
4	6,1	3,9
4,6	5,3	4,7
5	4,9	5,1
5,6	4,2	5,8
6	3,7	6,3
6,6	2,7	7,3
7	1,8	8,2
7,4	0,6	9,4

Preparación de geles de poliacrilamida al 15%

Es necesario preparar una solución de poliacrilamida 30 %, para ello se pesan 29 g de acrilamida y 1 g de bisacrilamida, y se disuelven en 100 mL de agua destilada. Posteriormente, se prepara una solución de APS 10 % pesando 50 mg de APS y agregando 500 μ L de agua destilada.

Para la preparación de dos geles se deben mezclar las siguientes soluciones en el orden que se disponen:

- Gel Separador (15 mL):
 - 3,4 mL de agua destilada
 - 7,5 mL de acrilamida 30 %
 - 3,8 mL 1,5M Tris pH 8,8
 - 150 μ L SDS 10 %
 - 150 μ L APS 10%
 - 6 μ L TEMED

- Gel Concentrador (5 mL):
 - 3,4 mL de agua destilada
 - 830 μ L de acrilamida 30 %
 - 630 μ L 1,5M Tris pH 6,8
 - 50 μ L SDS 10 %
 - 50 μ L APS 10 %
 - 5 μ L TEMED

Una vez armado el soporte se coloca la mitad de la solución del gel separador hasta 1 cm por debajo del borde superior del vidrio del soporte y se le agrega 1 mL de butanol en la superficie. Al corroborarse que gelificó, se retira el butanol y se le agrega el TEMED a la solución de gel concentrador. Posteriormente, se agrega la mitad del volumen al soporte, se le coloca el peine con cuidado de no formar burbujas y se lo deja gelificar.

Buffer de carga 5X

- 1 mL de 1% azul de bromofenol
- 4 mL de 1.5 M Tris-HCl pH 6.8
- 10 mL de glicerol
- 2 g de SDS
- 5 mL de β -mercaptoetanol

Agregar las soluciones en el orden que aparecen y mezclar. Posteriormente almacenar a 4 °C. A partir de dicha solución se realizan alícuotas al 1X.

Azul de Coomassie Brilliant Blue

Tabla 9. Reactivos necesarios para la preparación de azul de *Coomassie Brilliant Blue*.

Componentes	Concentración final	Cantidad
Agua destilada	--	650 mL
Sulfato de Amonio	10 %	100 g
Coomasie G-250	0.1 %	20 mL de una solución al 5% en H ₂ O
Ácido fosfórico	3 %	30 mL
Etanol	20 %	200 mL
Volumen Final	--	1000 mL

Deben mezclarse en el orden establecido en la **Tabla 9**, teniendo en cuenta que el sulfato de amonio este bien disuelto antes de agregarle el *Coomassie*.

Soluciones para tinción de geles con solución de nitrato de plata:

- Solución de Lavado I: mezclar 80 mL de metanol absoluto con 20 mL de ácido acético glacial y 100 mL de agua destilada.
- Solución de Lavado II: mezclar 40 mL de etanol con 20 mL de ácido acético glacial y 340 mL de agua destilada.
- Solución Reductora: pesar 2 mg de DTT y disolver en 400 mL de agua destilada
- Solución de Nitrato de Plata: pesar 0.68 g de nitrato de plata en 400 mL de agua destilada.
- Solución Reveladora: pesar 7.95 g de carbonato de sodio anhidro y disolver en 250 mL de agua destilada mezclada con 250 mL de formaldehido
- Solución de ácido acético: mezclar 12.5 mL de ácido acético glacial con 237.5 mL de agua destilada.

9.2 Anexo 2: Medidas de diámetros de nanopartículas y VLP usando ImageJ

Hay dos maneras de medir diámetro de una partícula usando ImageJ, una es manualmente y otra es con la herramienta *threshold*.

Primero si se quiere hacer las medidas manuales, la cual es la opción más precisa pero toma mucho más tiempo, se debe presionar la herramienta *Straight* y marcar el diámetro a medir de la partícula. Luego se presiona *control + M* y aparece un cuadro con una variedad de parámetros determinados, entre los que se encuentra *Length* que corresponde a la medida del diámetro en escala nanométrica (**Figura 61**).

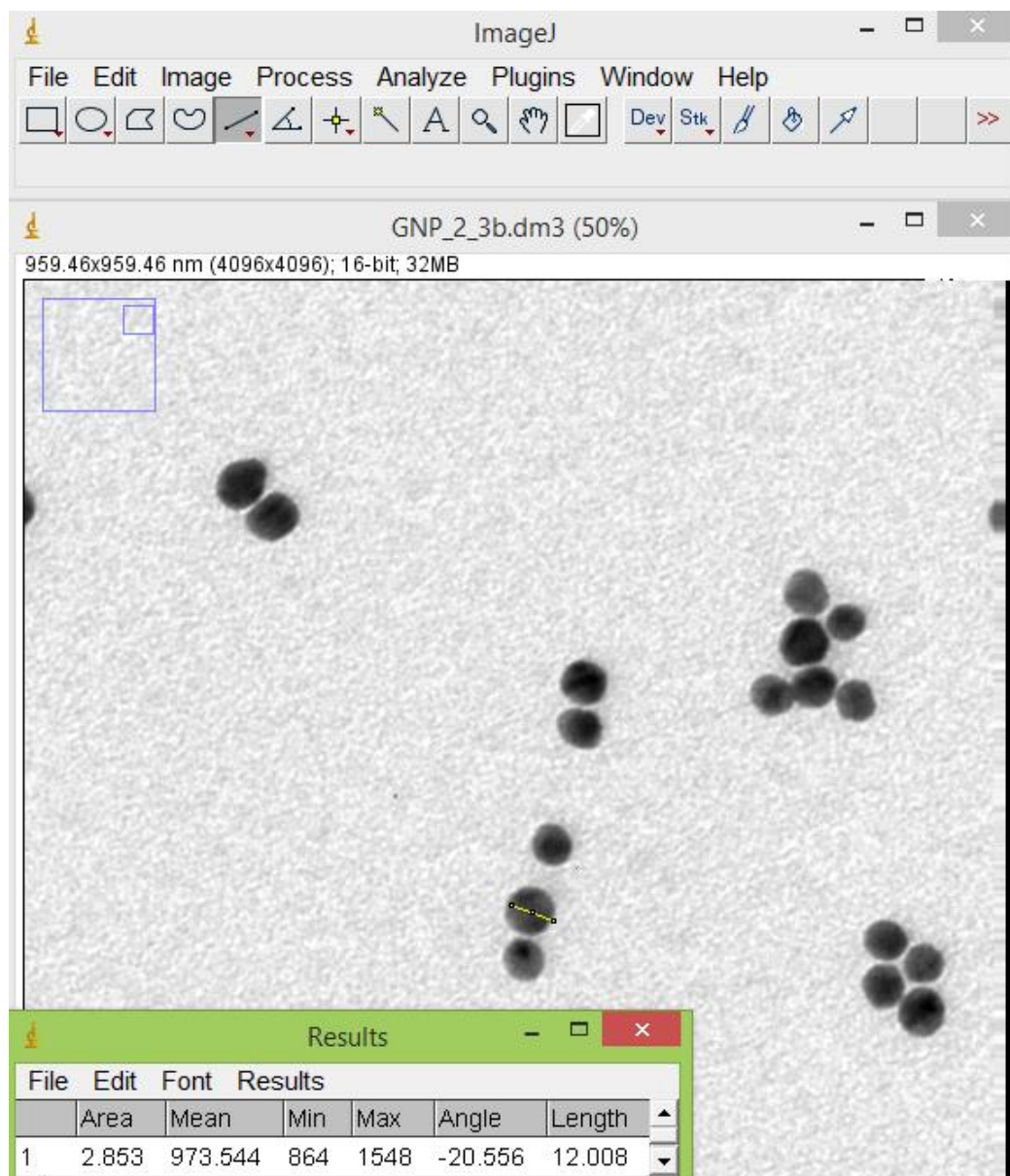


Figura 61. Determinación del diámetro de una nanopartícula de oro usando el programa ImageJ con la herramienta manual.

Por otro lado, con la herramienta *threshold* se procede distinto. Primero se selecciona un área de la imagen con la herramienta *Rectangular*, generalmente se toma en cuenta que en ese espacio las partículas no estén amontonadas y se puedan diferenciar una de otra y que no haya problema de iluminación en la imagen. Luego se presiona la opción *Image/ Adjust/ Threshold* (**Figura 62**).

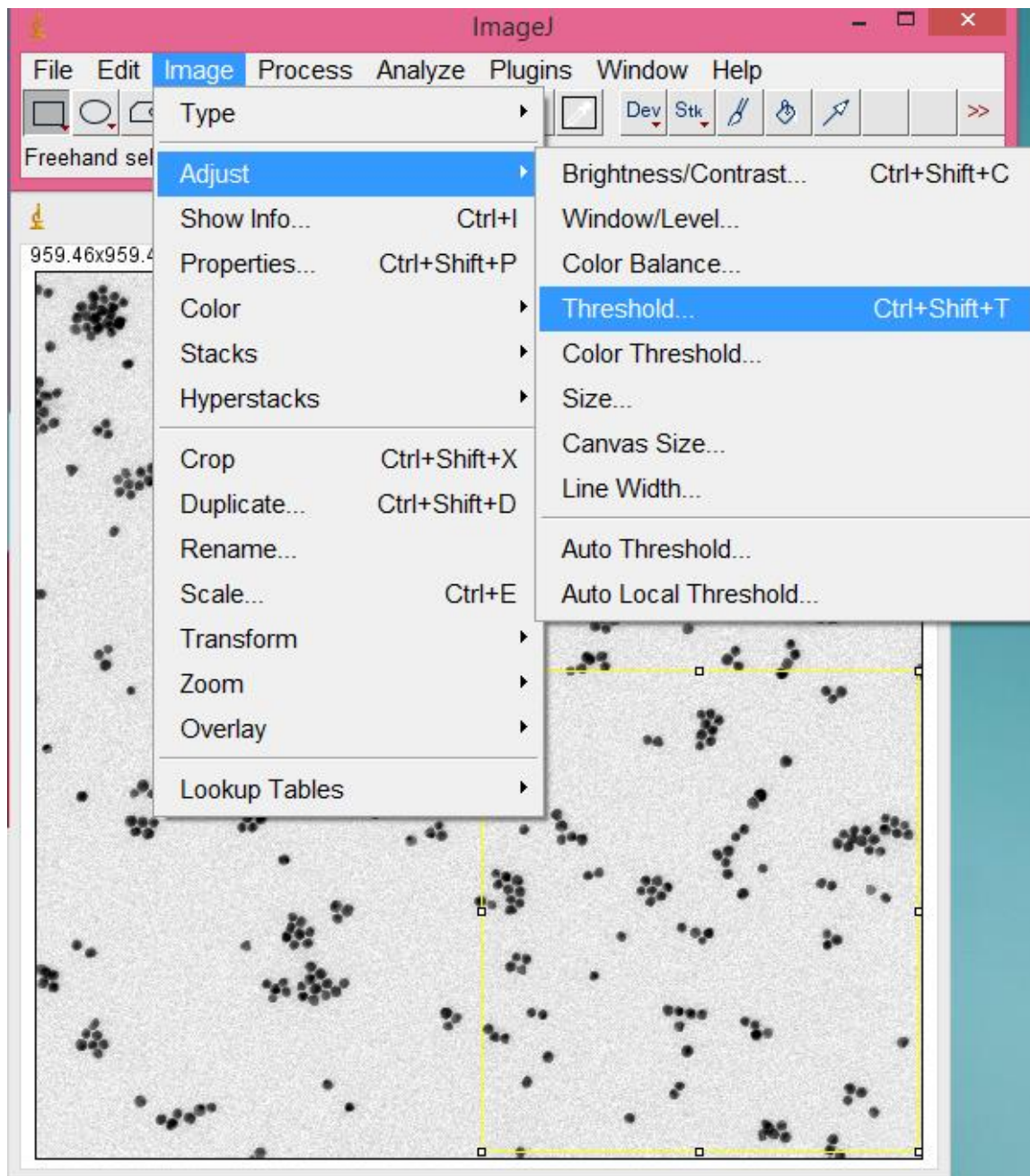


Figura 62. Determinación de diámetro de nanopartículas de oro con la herramienta *threshold*.

Una vez seleccionada la herramienta *threshold* las partículas se colorean de color rojo, entonces se debe chequear que se tome de dicho color solo la partícula y no de más o de menos (**Figura 63**). Luego se presiona la opción *Analyze/ Analyze Particles* y se setean determinados parámetros, los cuales son: *Size (nm²): 5- Infinity*, se marca la opción de *pixel units*, *Circularity: 0,5-1,0*, *Show: Outlines* y por ultimo también se marcan las opciones de *Display Results* y

Exclude on edges. Habiendo seteado dichos parámetros se obtiene una tabla similar a la obtenida con el método manual donde se toma el valor de área y suponiendo que las partículas que medimos son circulares se puede determinar el diámetro de las mismas usando la ecuación del área de un círculo (**Ecuación 1**), teniendo en cuenta que el diámetro es el doble del radio (r).

Ecuación 1. $\text{Área} = \pi \cdot r^2$

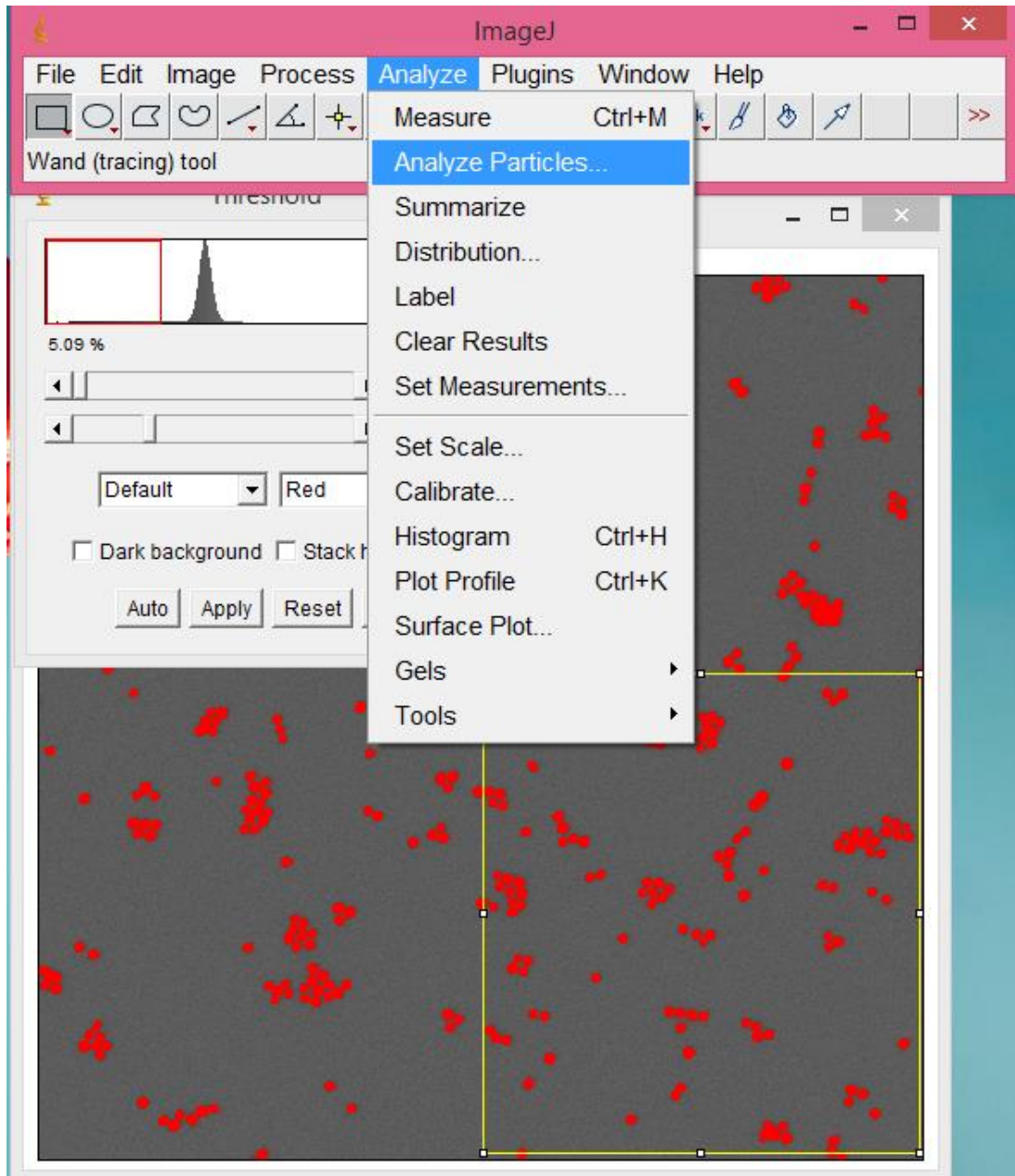


Figura 63. Determinación de diámetro de nanopartículas de oro usando la herramienta *threshold*. Se chequea la correcta coloración de las partículas y se procede a analizarlas.

9.3 Anexo 3: Procedimiento para recuento celular y determinación proteica por BCA

Recuento celular

Se prepara la muestra mezclando 20 μL de la suspensión celular y 20 μL de azul de tripán, el cual es un colorante que tiñe de color azul las células muertas en la muestra. Se homogeniza, se cargan 10 μL en la cámara de Neubauer y se procede a realizar el recuento inmediatamente. Utilizando el objetivo de 10X se enfoca el cuadrante, que corresponde a un área de 1 mm x 1 mm, y se cuenta el número de células presentes en los cuatro cuadrantes de las esquinas de la cámara de Neubauer (**Figura 64**). A partir de la ecuación mostrada a continuación se obtiene el número de células por mL:

Número de células/mL = 10^4 * factor de dilución * (número de células contadas)/4

Donde el factor de dilución corresponde al inverso de la dilución realizada a la suspensión celular.

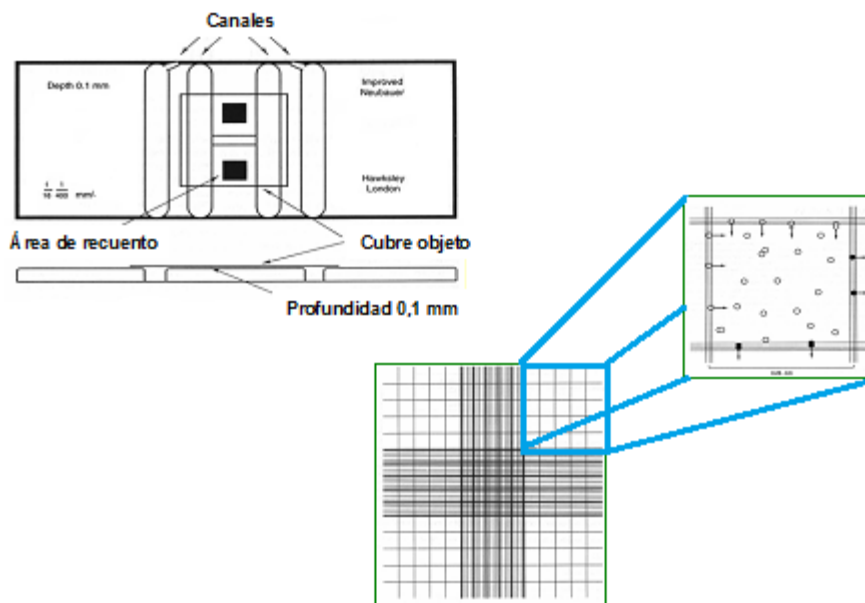


Figura 64. Esquema de la cámara de Neubauer. En celeste se muestra un cuadrante de 1 mm x 1 mm que presenta divisiones para facilitar el recuento.

Determinación de concentración proteica por método de BCA

La determinación se llevó a cabo según especificaciones del proveedor (Sigma Aldrich). En una placa de 96 pocillos se colocan 200 μL de la mezcla reactiva y se agregan 25 μL de las muestras. Una vez que se siembran todas las muestras se procede a incubar a 37 °C por media hora y posteriormente se mide absorbancia a 595 nm. Para la concentración proteica se realizó una curva de la calibración con BSA, a partir de una solución estándar con una concentración de 2 mg/mL.

9.4 Anexo 4: Análisis de datos en el GraphPad Prism 6

Primero, cuando se abre el programa se debe de elegir para trabajar en un gráfico X vs Y, donde se tienen 3 columnas para Y. También se selecciona que se grafique con promedio (*mean*) y SD (*standard deviation*) tal como muestra la **Figura 65**.

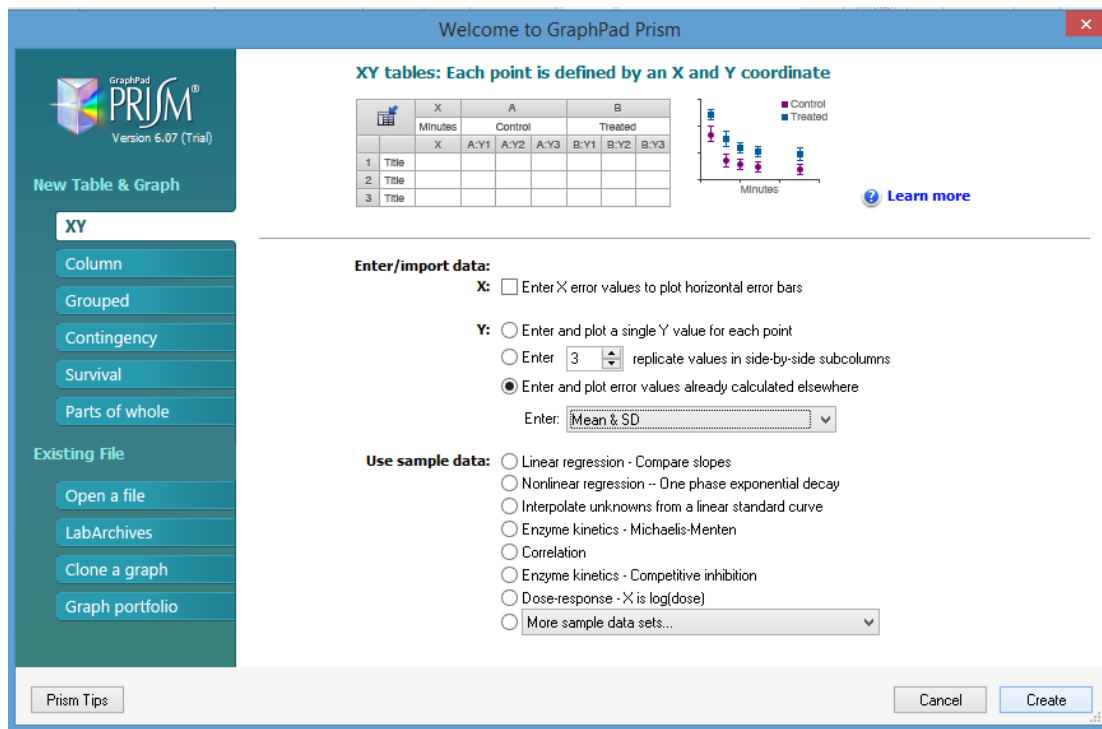


Figura 65. Selección de gráfico en el programa GraphPad Prism.

Luego, para cada ensayo se agregan todas las concentraciones de híbrido utilizado en el eje X, las cuales van a ir de 1000 $\mu\text{g/mL}$ a 3,90625 $\mu\text{g/mL}$ y en el eje Y se agregan los resultados obtenidos de las medidas de absorbancia que se encuentran por triplicado para cada condición. El programa va a generar un gráfico de forma automática en base a dichos datos. Seguido de esto, se elige la opción *Analyze* que se encuentra en la barra de herramientas y se selecciona la opción de *Normalize* a los datos de interés. El programa va a pedir que se defina un valor para 0%, el cual va a ser el promedio de lo obtenido en el control de muerte, y un valor para 100% que va a ser el promedio calculado del control de células (**Figura 66 (a)**). A partir de esto se va a generar un gráfico con los valores de absorbancia normalizados en base a los controles y presentados en forma de porcentaje en función al logaritmo de la concentración de la muestra (**Figura 66 (b)**).

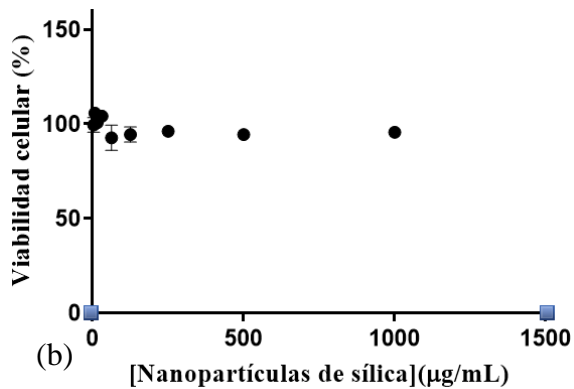
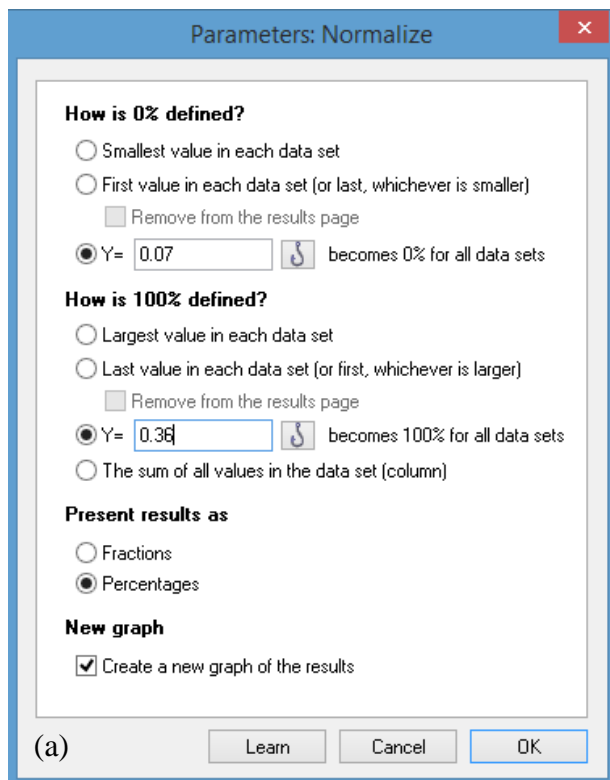


Figura 66. Normalización de datos de absorbancia. (a) Muestra cómo se definen los valores máximos (100%) y mínimo (0%) para llevar a cabo la normalización. (b) Grafico normalizado del porcentaje de viabilidad celular en función de la concentración de nanopartículas de sílica.

Posteriormente se procede a cambiar la escala del eje de las X, pasándola de lineal a logarítmica. Para ello se selecciona el eje haciendo click, se presiona botón derecho y se despliega un menú, donde elegimos la opción *Format Axes*. Esto nos abre una nueva ventana (**Figura 67 (a)**) donde seleccionamos *Scale* y cambiamos *Linear* por *Log 10* y nos queda la gráfica que se muestra en la **Figura 67 (b)**.

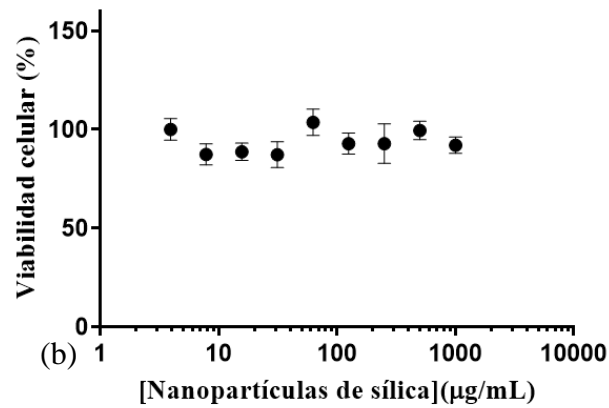
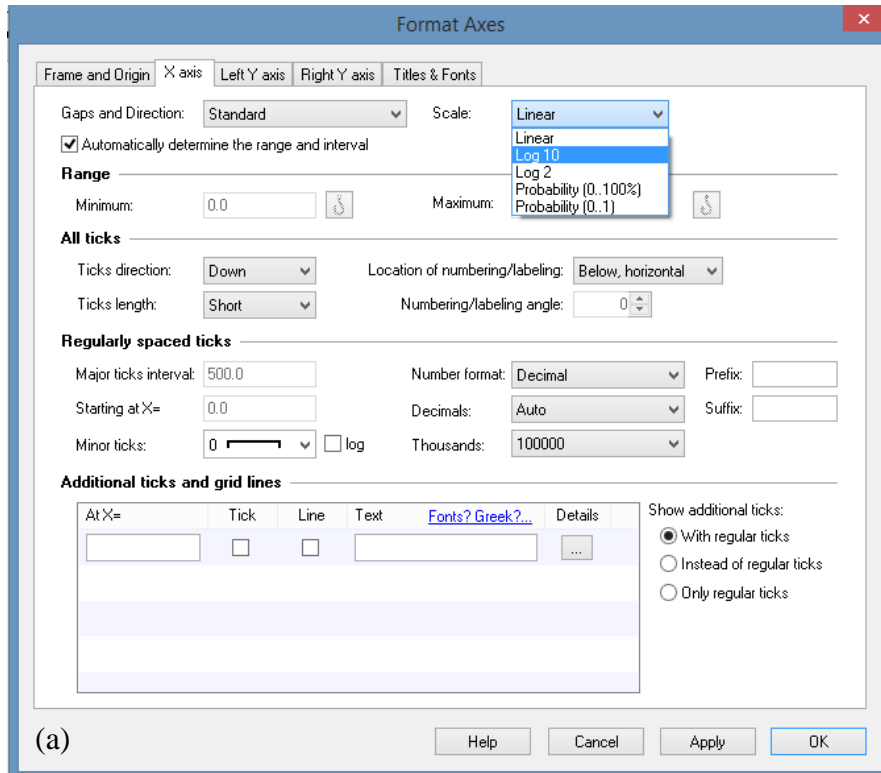


Figura 67. Cambio de escala del eje X. (a) Muestra cómo se realiza el cambio de escala del eje X. (b) Grafico normalizado del porcentaje de viabilidad celular en función de la concentración de nanopartículas de sílica en escala logarítmica.